

Klonierung und Charakterisierung von Säugerhomologen des für die Muskelkontraktion relevanten Unc-93 aus *Caenorhabditis elegans*

Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Biochem. Astrid Kollwe,
geboren am 24. Juni 1973 in Hildesheim

Hannover, Juni 2001

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit eigenständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hannover, den 9. Juni 2001

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: PD Dr. T. Tamura-Niemann
Institut für Physiologische Chemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 9. Juli 2001

Danksagung

Ich möchte allen danken, die in irgendeiner Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. H. Niemann danke ich dafür, daß er mir dieses spannende Thema anvertraut hat und jederzeit ein offenes Ohr für alle Probleme hatte.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. T. Binz für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Müller möchte ich mich dafür bedanken, daß er nach dem Tod von Herrn Prof. Dr. H. Niemann die Betreuung dieser Arbeit übernommen hat.

Danksagen möchte ich Frau PD Dr. Teruko Tamura-Niemann für viele hilfreiche Ratschläge und die Übernahme des Korreferats.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. R. Bauerfeind, Herrn Dr. R. Niedenthal und Frau Dr. B. Sodeik bedanken, die immer die Zeit fanden, meine Fragen zu beantworten.

Tina Schaper, Stefanie Feldhege, Martina Enge und Karsten Heidrich danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. T. Binz für ihre Hilfsbereitschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre und viel Spaß.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Christian, die an meiner gesamten Ausbildung Anteil genommen haben und mir immer zur Seite standen.

Zusammenfassung

Unc-93 ist eines von 130 Unc-Proteinen des Nematoden *C. elegans*, die alle am Zustandekommen der Schlängelbewegung, mit der sich das Tier fortbewegt, beteiligt sind. Mutation oder Deletion eines der zugehörigen Gene führt zu einer unkoordinierten (engl.: uncoordinated) Fortbewegung, dem Unc-Phänotyp, und im schlimmsten Fall zu einer völligen Lähmung. Während es sich bei einigen Unc-Proteinen um Strukturproteine der Muskelzellen handelt oder um solche, die für die Übertragung von Aktionspotentialen von einer Nervenzelle zur nächsten zuständig sind, kommt Unc-93 im Komplex mit Sup-10 und Sup-9, einem vermeintlichen zweiporigen K^+ -Kanal, eine Rolle bei der Kopplung von Muskelanregung und Kontraktion an der neuromuskulären Endplatte zu. Eine Mutation in einem dieser drei Proteine hat einen Gummiband-Phänotyp zur Folge, das bedeutet, der Nematode reagiert auf eine Berührung am Kopf mit einer wiederholten Kontraktion und Relaxation aller Körperlängsmuskelzellen, durch die eine Rückwärtsfluchtbewegung unmöglich wird. Durch Deletion eines der beiden anderen Gene oder des mutierten selbst kann der Defekt kompensiert werden, und die Mutante ist nicht mehr vom Wildtyp zu unterscheiden.

In dieser Arbeit sollten Säugergene mit Homologie zu *unc-93* kloniert und charakterisiert werden, da der generelle Mechanismus der Muskelkontraktion bei Säuger und *C. elegans* übereinstimmt (Waterston, 1988) und bisher zu 43 % der Proteine aus *C. elegans* homologe Säugergene gefunden wurden (Rubin, 2001).

Durch computergestützte Suchen in Sequenzgenbanken konnten zwei homologe menschliche (*hmunc-93* und *hmunc-93B*; für human mammalian unc-93), zwei murine (*mmunc-93* und *mmunc-93B*) und zwei Gene aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (GH10120 und GH09628) identifiziert werden.

Aus Northernblotanalysen geht hervor, daß *hmunc-93B* und *mmunc-93B* ubiquitär exprimiert werden, während sich die Expression von *hmunc-93* und *mmunc-93* auf wenige Organe beschränkt. *hmunc-93* wird am stärksten in der Leber transkribiert, geringere mRNA Mengen sind in der Niere, dem Herzen und dem Skelettmuskel vorhanden. Die größte Menge *mmunc-93* mRNA ist in der Leber und den Testis vertreten, geringere auch im Skelettmuskel und der Lunge. Die unterschiedliche Gewebeverteilung und eine Homologie von 81 % zwischen *hMunc-93* und *mMunc-93* lassen den Schluß zu, daß diese beiden Proteine im Menschen und der Maus nicht die gleiche Funktion ausüben.

Alle Säuger- und Drosophilaproteine haben 41 bis 57 % Homologie zur 460 Aminosäuren langen hydrophoben Domäne von Unc-93. Sequenzen mit Homologie zur N-terminalen hydrophilen Domäne (Aminosäuren 1 – 245) von Unc-93 existieren nicht und konnten auch bei einer erneuten Suche, die sich gerade auf diesen Bereich beschränkte, nicht identifiziert werden.

Ein Vergleich der Hydrophobizitätsplots von Unc-93 und seinen homologen Proteinen deutet auf die Existenz von 10 oder 12 Transmembrandomänen hin. Dies steht im Einklang mit der Sequenzähnlichkeit mit 12-Transmembrandomänenproteinen, die als Transporter für Zucker oder andere Metabolite fungieren.

In vitro Translationsexperimente, Zellfraktionierungen und Immunfluoreszenzfärbungen an transient transfizierten Säugerzelllinien bestätigen, daß hMunc-93 ein integrales Protein der Plasmamembran ist.

Im Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden verschiedene Wechselwirkungspartner von mMunc-93 ermittelt, darunter das hypothetische Protein FLJ12923, Fettsäuresynthase, das Ubiquitin konjugierende Enzym BRUCE, das Autoantigen 1 für Polymyositis und Sklerodermie (PM-SCL 1), DOCK180, das in eine CRK-abhängige Signaltransduktionskaskade involviert ist, sowie die Gerüstproteine Shank3b und MAGI3. Die stärkste Interaktion lag mit MAGI3 vor. Sie konnte durch *in vitro* Bindungsstudien mit mMunc-93 und mit hMunc-93 untermauert werden.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, die in dieser Arbeit gewonnen wurden, kommen mehrere Funktionen für Munc-93 in Betracht:

- Die Interaktion mit dem Gerüstprotein MAGI3 könnte eine Wechselwirkung mit weiteren Proteinen erlauben, die für die Regulation der Kanalaktivität eines Sup-9 homologen zweiporigen K⁺-Kanals und damit für die Einstellung eines bestimmten Membranpotentials zuständig sind.
- Im Zusammenspiel mit Shank3b und DOCK180, die an der Reorganisation des Aktinzytoskeletts beteiligt sind, könnte mMunc-93 eine Rolle bei der Fusion oder der Internalisierung rezeptorbeladener Vesikel mit bzw. von der Plasmamembran zukommen.
- Durch die Bindung oder den Transport eines Metaboliten könnte Munc-93 Signaltransduktionsprozesse initiieren.

Schlagworte: Unc-93-Homologe, Multitransmembranprotein, MAGI-3

Summary

Unc-93 is one of 130 Unc-proteins of the nematode *C. elegans*, that are involved in the sinusoidal movement of the animal. Mutation or deletion of one of the corresponding genes leads to an uncoordinated movement called unc phenotype. In the worst case the nematode is completely paralyzed. Some Unc proteins are structural constituents of muscle cells or are involved in the propagation of an action potential from one nerve cell to the adjacent one. Unc-93 forms a complex with Sup-10 and the putative two pore K⁺-channel Sup-9 and plays a role in excitation contraction coupling at the neuromuscular junction. A mutation in one of these three proteins leads to a `rubberband-phenotype`. When prodded at its head the mutant worm doesn't move backwards, but responds with repeated cycles of simultaneous contraction and relaxation of all body wall muscle cells. Deletion of one of the other two genes or of the mutated one itself rescues the `rubberband-phenotype`.

The aim of this thesis was the cloning and characterization of mammalian genes with homology to unc-93, since the general mechanism of muscle contraction in *C. elegans* and mammals is identical (Waterston, 1988) and mammalian homologues to 43 % of *C. elegans* genes have already been identified (Rubin, 2001).

Computer-assisted screening of sequence databases revealed two human homologues (hmunc-93 and hmunc-93B, for human mammalian unc-93), two murine ones (mmunc-93 and mmunc-93B) and two genes of the fruitfly *Drosophila melanogaster* (GH10120 and GH09628).

Northernblot analyses showed that hmunc-93B and mmunc-93B are ubiquitously expressed whereas expression of hmunc-93 and mmunc-93 is restricted to a few tissues with the highest level of hmunc-93 expression in liver and lesser levels in kidney, heart and skeletal muscle. mmunc-93 mRNA is mainly detectable in liver and testis, lower amounts exist in skeletal muscle and lung. The dissimilar tissue distribution and a homology of only 81 % between hMunc-93 and mMunc-93 suggests that these two proteins may have different functions in human and mouse.

The identified mammalian and *Drosophila* homologues display 41 to 57 % similarity to the hydrophobic domain (amino acid 246 - 705) of Unc-93, however, they don't exhibit any similarity to its N-terminal hydrophilic domain (amino acid 1 - 245). Also a second screen focussing especially on this region didn't reveal any related amino acid sequence.

A comparison of hydrophobicity plots of Unc-93 and its homologous proteins predicts 10 or 12 membrane spanning domains. Such a model is compatible with sequence similarities identified in transporters for sugars or other metabolites, which contain twelve transmembrane regions.

In vitro translation experiments, cellular fractionation and immunofluorescence staining of transiently transfected cells confirmed that hMunc-93 is indeed an integral plasma membrane protein.

In a yeast two hybrid screen several proteins interacting with mMunc-93 were determined, including the hypothetical protein FLJ12923, fatty acid synthase, the ubiquitin conjugating enzyme BRUCE, polymyositis and sclerodermia autoantigen1 (PM-SCL1), DOCK180, which is involved in a CRK dependent signal transduction cascade, and the scaffold proteins Shank3b and MAGI3. Munc-93 interacts strongest with one of these proteins and this interaction could be validated by *in vitro* binding studies for mMunc-93 and hMunc-93.

As a conclusion the results of this thesis suggest one of the following scenarios for the function of Munc-93:

- Interaction with the scaffold protein MAGI3 could admit contact to additional proteins that regulate the channel activity of a mammalian homologue of the two pore K⁺-channel Sup-9 and thereby influence the membrane potential
- In an interplay with Shank3b and DOCK180, which are involved in the reorganization of the actin cytoskeleton, Munc-93 could play a role in fusion or internalization of receptor containing vesicles with or from the plasma membrane.
- By binding or transporting a metabolite, Munc-93 could activate a yet unidentified signal transduction pathway.

Key words: Unc-93-homologues, multi transmembrane domain protein, MAGI-3

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Grundlagen der Muskelkontraktion im Vergleich zwischen <i>C. elegans</i> und Säuger	1
1.1.1	Der Aufbau der Muskulatur	1
1.1.2	Kontraktion von Muskelzellen	2
1.1.3	Der Unc-93 Phänotyp	6
1.1.4	Unc-93 und assoziierte Proteine	8
1.2	Aufgabenstellung	10
2	MATERIALIEN	11
2.1	Chemikalien	11
2.2	Systeme	13
2.3	Oligonukleotide	13
2.4	Standards	14
2.5	Enzyme	15
2.6	Antikörper	15
2.7	Bakterien	16
2.8	Hefestämme	17
2.9	Zelllinien	17
2.10	Plasmide	18
2.11	weitere Materialien	24
2.12	Firmen	24
3	METHODEN	26
3.1	Arbeiten mit DNA	26
3.1.1	Restriktionsspaltung	26
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.1.3	Dephosphorylierung des Vektors	28
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	29
3.1.5	Reinigung von DNA	29
3.1.6	Ligation	31
3.1.7	Transformation	31
3.1.8	Plasmid-Präparation	36
3.1.9	Hybridisierung von Northernblots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	39
3.1.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA	41
3.2	Analyse der Genprodukte	42
3.2.1	<i>In vitro</i> Transkription und Translation	42
3.2.2	Isolierung von Membranproteinen	42
3.2.3	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	43
3.2.4	Bindungstests mit GST-Fusionsproteinen	45
3.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
3.2.6	Coomassiefärbung	48
3.2.7	Westernblot	49

3.3	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	51
3.3.1	Genbankamplifikation.....	52
3.3.2	Genbankscreening.....	53
3.3.3	Selektive Amplifikation von pVP16 aus einem pVP16-pBTM116-Gemisch.....	54
3.3.4	Interaktionstests	54
3.4	Zellkultur.....	55
3.4.1	Passagieren adhärenter Zellen.....	55
3.4.2	Auftauen und Einfrieren von Eukaryontenzellen	55
3.5	Transfektion	56
3.5.1	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	56
3.6	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	56
3.6.1	Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	57
3.6.2	Fluoreszenzfärbung.....	57
3.6.3	Isolierung von anti hMunc-93 Antikörpern aus dem hMunc-93 Antiserum	58
3.6.4	Bestimmung des Proteingehaltes	59
3.6.5	Computergestützte Analysen	59
4	ERGEBNISSE	61
4.1	<i>C. elegans</i> unc-93 Homologe aus Säugergenbanken	61
4.2	Unc-93 Homologe werden teils gewebespezifisch, teils ubiquitär exprimiert.....	66
4.3	Analyse der Aminosäuresequenz der identifizierten Unc-93 Homologen	67
4.4	hMunc 93 ist ein integrales Membranprotein in der Plasmamembran.....	72
4.4.1	Membranintegration von hMunc-93 <i>in vitro</i>	72
4.4.2	Subzelluläre Lokalisation von hMunc-93.....	74
4.5	Analyse der Membrantopologie von Munc93.....	79
4.6	Untersuchung einer möglichen N-Glykosylierung von hMunc-93	84
4.7	Suche nach Interaktionspartnern von hMunc-93 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems.....	84
4.7.1	Identifizierung von Bindungspartnern für Munc-93	84
4.7.2	Verifizierung der Bindung von MAGI3 an Munc-93 <i>in vitro</i>	87
5	DISKUSSION	90
5.1	Genstruktur und Transkripte von unc-93 Homologen	90
5.1.1	Aufbau der cDNAs.....	90
5.1.2	Analyse der Transkripte	91
5.2	Analyse der Unc-93 homologen Proteine	93
5.2.1	Molekülmassenermittlung des Translationsproduktes.....	93
5.2.2	Unc-93 und seine homologen Proteine sind Multitransmembranproteine	94
5.2.3	Intrazelluläre Lokalisation von hMunc-93.....	97
5.3	Interaktionspartner von mMunc-93 und Implikationen für die Funktion	98
5.3.1	Fettsäuresynthase	100
5.3.2	MAGI3	101
5.3.3	DOCK180	102
5.3.4	Shank3b.....	104
5.3.5	Mögliche Bedeutung der Wechselwirkung mit MAGI3, Shank3b und DOCK180 für die Funktion von Munc-93	105
6	AUSBLICK	107

7	LITERATUR.....	109
8	ANHANG.....	119
8.1	hMunc-93	119
8.2	mMunc-93	120
8.3	hMunc-93B	122
8.4	mMunc-93B Teilsequenz	123
8.5	GH10120	124
8.6	GH09628	126
8.7	Fettsäuresynthase	127
8.8	MAGI3	128
8.9	BRUCE	129
8.10	PM-SCL Autoantigen 1	130
8.11	FLJ12923	130
8.12	DOCK180	131
8.13	Shank3b	131

Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
A	Ampere
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bir	Baculovirus Inhibitor der Apoptose Wiederholung
bp	Basenpaare
BRUCE	Bir Repeat enthaltendes Ubiquitin Conjugierendes Enzym
BSA	Rinder Serumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Curie
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalovirus
CoA	Coenzym A
cpm	Impulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
D	Dalton
Dabco	1,4-Diazobicyclo[2.2.3]octan
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPS	Diethylpyrocarbonat
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DOCK180	Downstream of CRK 180 kDa Protein
DTAF	Dichlorotriazinylaminofluorescein
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	verstärkt (enhanced) grün fluoreszierendes Protein
EST	Beginn einer exprimierten Sequenz (<i>expressed sequence tag</i>)
F(ab') ₂	Antigenbindendes Fragment eines mit Pepsin gespaltenen Immunglobulinmoleküls (<i>fragment antigen binding</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell scan</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GABA	γ-Aminobuttersäure
GKAP	Guanylatkinase assoziiertes Protein

GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GuK	Guanylatkinase
h	human; Stunde[n]
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IgG; IgM	Immunglobulin G; Immunglobulin M
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
konz.	konzentriert
LiOAc	Lithiumacetat
m	murin; milli; Meter
M	molar
MAGI	<u>m</u> embran <u>a</u> ssoziierte <u>G</u> uanylatkinase mit <u>i</u> nvertierter Orientierung
min	Minute[n]
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten (messenger) RNA
munc-93	Säuger (<u>m</u> mammalian) Unc-93-Gen
Munc-93	Säuger (<u>m</u> mammalian) Unc-93-Protein
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	National Institutes of Health
OD ₂₆₀	Optische Dichte bei 260 nm
p. a.	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (<i>potentia hydrogenii</i>)
PIPES	1,4-Piperazindinethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
r	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
s	löslich (<i>soluble</i>); Sekunde[n]

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SH2	Src Homologie2
SH3	Src Homologie3
T-Tubulus	transversaler Tubulus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>unit[s]</i>
unc-93	Unc-93-Gen
Unc-93	Unc-93-Protein
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
YNB	Yeast Nitrogen Base

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Muskelkontraktion im Vergleich zwischen *C. elegans* und Säuger

C. elegans wird seit 1965 so intensiv erforscht, daß nicht nur seine zelluläre Anatomie genau bekannt ist, sondern auch die Entwicklung jeder einzelnen seiner 959 Zellen in der Ontogenese. Obwohl die Entwicklung direkt ist, wird der Lebenszyklus durch vier Häutungen in vier Larven- (L1, L2, L3 und L4) und ein adultes Stadium unterteilt. Das Genom von *C. elegans* mit einer Größe von einem Dreißigstel des menschlichen Genoms umfaßt etwa 97 Millionen Basenpaare, die für mehr als 19000 Proteine codieren. Damit ist es nach Viren, Bakterien und Hefe das erste Genom eines mehrzelligen Organismus, dessen Sequenzierung 1998 abgeschlossen werden konnte. Zu 43 % der *C. elegans* Proteine wurden homologe Proteine im *Homo sapiens* gefunden (Rubin, 2001). Aufgrund dieser Ähnlichkeit konnten in der Tat Erkenntnisse aus der Biologie des Nematoden auf die menschliche Biologie übertragen werden. So half z. B. die Analyse von Proteinen, die in *C. elegans* am programmierten Zelltod beteiligt sind, bei der Aufklärung des menschlichen Apoptosestoffwechselweges (Hengartner and Horvitz, 1994; Chinnaiyan *et al.*, 1997). Auch der generelle Mechanismus der Muskelkontraktion von *C. elegans* entspricht demjenigen im Säugermuskel.

1.1.1 Der Aufbau der Muskulatur

Der quergestreifte Säugermuskel besteht aus mehreren Muskelfasern, vielkernigen Synzytien, die durch Fusion zahlreicher Myoblasten entstanden sind. Jede Muskelfaser enthält parallel angeordnete Myofibrillen, deren Funktionseinheit, das Sarkomer, sich entlang der Fibrillenachse alle 2,3 µm wiederholt.

Die Längsmuskulatur des Nematoden *C. elegans* besteht aus einer einschichtigen Lage von 95 Muskelzellen, die sich in vier Quadranten aufgeteilt auf dorsaler und ventraler Seite jeweils rechts und links neben den Längsleisten der Epidermis befinden (Sulston and Horvitz, 1977). Die 24 bzw. 23 mononukleären Zellen jedes Quadranten sind über Gap Junctions miteinander verbunden (White *et al.*, 1986). Der periphere, der Epidermis ansitzende Abschnitt der Muskelzellen, birgt schräggestreifte Fibrillen als kontraktile Elemente. Die Streifung der Muskulatur durch A- und I-Banden (Anisotrop und Isotrop) verläuft in einem leichten Winkel zur Körperlängsachse. Die A-Banden enthalten die H-Zone, in der I-Bande sind dichte Körperchen zu finden, die der Z-Linie der Vertebraten entsprechen. Eine adulte Zelle besitzt neun Sarkomere. Die dicken und dünnen Filamente verlaufen parallel zur Längsachse des Tieres und leicht schräg zu der Reihe der dichten Körperchen, aber nicht senkrecht zu ihr wie bei den Vertebraten. Im keulenförmigen Teil der Zelle liegen der Kern und andere Organellen. Von dort aus ziehen sich ein oder mehrere Fortsätze zum dorsalen und ventralen Längsnervenstamm, die sich vom Gehirn aus nach hinten erstrecken und durch asymmetrisch

verteilte Kommissuren miteinander verbunden sind. An den Nervenbahnen nehmen immer mehrere Muskelzellen Verbindung mit einem einzelnen Axon auf. Der Aufbau der Motoneurone von Invertebraten unterscheidet sich von dem der Vertebraten. Während bei Wirbeltieren sowohl die Dendriten als auch das Axon am Zellkörper enden oder an ihm ihren Anfang nehmen, steht der Zellkörper von Invertebratenneuronen nur mit den Dendriten in Kontakt, nicht aber mit dem Axon.

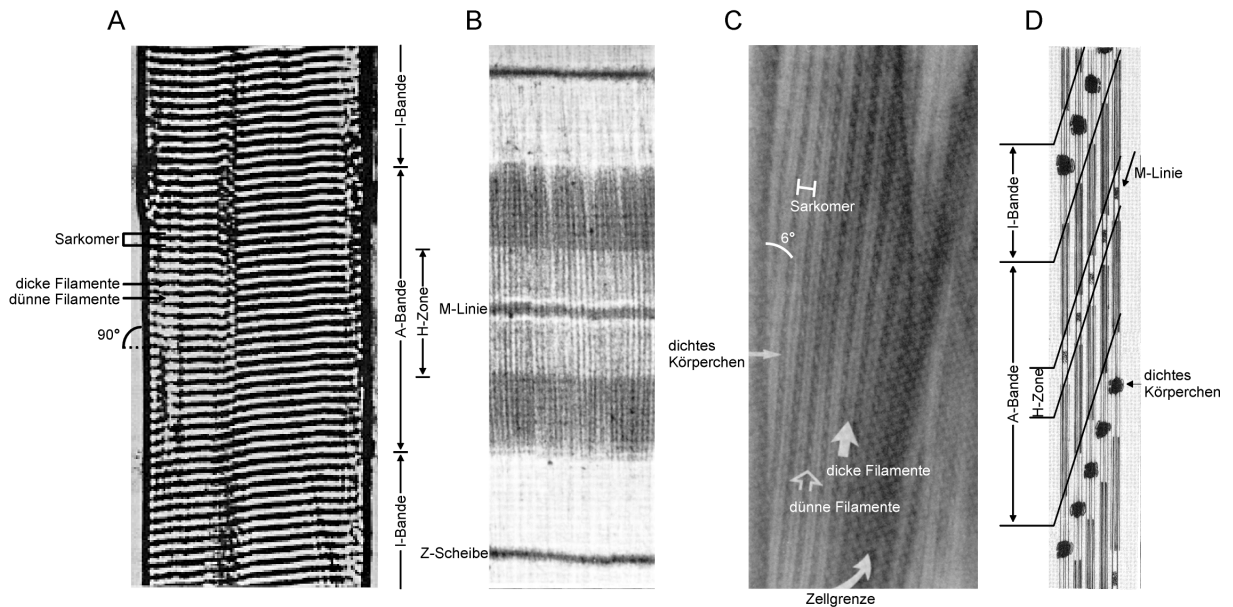


Abb. 1: Struktur des Skelettmuskels eines Säugers und der Körpermuskelzellen von *C. elegans*. a) Quergestreifte Säugermuskelfaser; b) Aufbau des Sarkomers einer Fibrille des Säugers; c) Ausschnitt aus einer Körpermuskelzelle von *C. elegans*; d) Schematische Darstellung der kontraktile Einheiten dieser Zelle. Durch die versetzte Anordnung der Myofilamente verlaufen die Sarkomere in einem Winkel von 6° zur Körperlängsachse des Tieres. Dieser Winkel ist in der Skizze übertrieben dargestellt. Die Bilder sind entnommen aus Stryer, 1988 und Waterston, 1988.

1.1.2 Kontraktion von Muskelzellen

1.1.2.1 Entstehung eines Aktionspotentials

Die Membran von Neuronen und Muskelfasern ist elektrisch erregbar. Im Ruhezustand hat sie ein Membranpotential von -60 mV. Dieses wird hauptsächlich vom Verhältnis der K^+ -Ionen innerhalb und außerhalb einer Zelle bestimmt. Öffnen sich Na^+ -Kanäle in der Membran, wird sie durch einen Einstrom von Na^+ -Ionen aus dem Extrazellularraum depolarisiert. Die Öffnung benachbarter spannungsabhängiger Na^+ -Kanäle ermöglicht eine Ausbreitung der Depolarisierung entlang der Membran. Hat die Depolarisation einen Schwellenwert erreicht, öffnen sich spannungsabhängige K^+ -Kanäle und der Ausstrom von K^+ -Ionen aus der Zelle, begleitet von einer spontanen Schließungen der Na^+ -Kanäle, bewirkt eine Repolarisierung der

Membran, die in einer Hyperpolarisierung mündet. Durch die Aktivität von Na^+/K^+ -ATPasen und verschiedenen K^+ -Kanälen wird das Ruhepotential wieder eingestellt.

Ein Aktionspotential, das sich entlang des Axons eines Motoneurons ausbreitet, wird im Axonhügel, der sich am Übergang vom Zellkörper zum Axon befindet, nach Summation von Signalen vieler verschiedener Neurone generiert, die mit dem Motoneuron über Synapsen in Kontakt stehen. Auch an diesen Synapsen erfolgt die Signalweiterleitung durch die Ausschüttung von Neurotransmittern an der präsynaptischen Membran, wobei hier mit verschiedenen Überträgersubstanzen gearbeitet wird. Abhängig vom Rezeptor, der den Neurotransmitter bindet, werden unterschiedliche Ionenkanäle in der postsynaptischen Membran geöffnet. Exzitatorische Synapsen lösen einen Einstrom von Na^+ -Ionen in die postsynaptische Zelle aus, was zu einer Depolarisierung der Membran führt. Bei inhibitorischen Synapsen dagegen erfolgt ein Einstrom von Cl^- - oder ein Ausstrom von K^+ -Ionen, die eine Hyperpolarisation der Membran bewirken. Zu den exzitatorischen Neurotransmittern im Zentralnervensystem zählen Glutamat und Acetylcholin; γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin haben inhibitorische Wirkung. Am Axonhügel werden sowohl die Frequenz verschiedener postsynaptischer Potentiale als auch die Summe gleichzeitig eintreffender exzitatorischer und inhibitorischer Signale verrechnet. Nur wenn die Membran am Axonhügel durch die Summe aller synaptischen Eingänge über das Schwellenpotential hinaus depolarisiert wird, entsteht ein Aktionspotential. Erreicht dieses eine Muskelzelle, so kontrahiert sie nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip. Die Stärke und Dauer der Kontraktion wird durch die Frequenz von aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen bestimmt. Eine weitere Kontrolle der Stärke einer Muskelkontraktion im Wirbeltiermuskel erfolgt durch motorische Einheiten. Darunter versteht man das Motoneuron und alle von ihm innervierten Muskelfasern. Diese kontrahieren alle gleichzeitig, so daß die Stärke einer Kontraktion von der Anzahl der mit einem Axon verbundenen Muskelzellen abhängt.

Im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen, die nur durch Impulse aus dem Zentralnervensystem zur Kontraktion angeregt werden können, hat die Membran des rechten Herzvorhofs selbst Schrittmachereigenschaften, die eine rhythmische Depolarisation der Membran und die Entstehung eines Aktionspotentials bedingen. Dieses kann sich über Kommunikationskontakte (Gap Junctions) in alle weiteren Herzmuskelzellen ausbreiten. Gap Junctions sind Zytoplasmakanäle, durch die ein Austausch von Salzen, Zuckern, Aminosäuren und kleineren Molekülen zwischen benachbarten Zellen erfolgen kann. Im Herzmuskel sorgen sie für die schnelle Weiterleitung des Ionenstromes, so daß ein Aktionspotential, daß in einem Teil des Herzens generiert wurde, eine synchrone Kontraktion des ganzen Herzens einleiten kann. Ein weiterer Unterschied zwischen Skelett- und Herzmuskel zeigt sich darin, daß im Herzmuskel die Länge einer Kontraktion von der Dauer der Aktionspotentiale abhängt.

1.1.2.2 Molekularer Mechanismus der Muskelkontraktion

Für die Stimulation einer Muskelkontraktion muß ein solches Aktionspotential entlang des Axons eines Motoneurons, dessen Zellkörper beim Säuger im Rückenmark liegt, bis zur neuromuskulären Endplatte wandern, an der das Axon mit einer Muskelfasern in Kontakt steht. Erreicht das Aktionspotential das Ende des Axons, so öffnen sich in der Plasmamembran spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, durch die Ca^{2+} -Ionen in das Endköpfchen einströmen (Abb. 2 (1)). Dort lösen sie die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran aus, wodurch der Neurotransmitter Acetylcholin in den synaptischen Spalt sezerniert wird (Abb. 2 (2)). Seine Bindung an einen entsprechenden Rezeptor auf der postsynaptischen Muskelzelle führt zum Einstrom von Na^+ -Ionen in die Muskelzelle (Abb. 2 (3)). Die dadurch bedingte Depolarisierung der Plasmamembran erzeugt durch die Öffnung spannungsgesteuerter Na^+ -Kanäle (Abb. 2 (4)) ein neues Aktionspotential, das sich entlang der transversalen Tubuli (T-Tubuli) in das Innere der Zelle ausbreitet. Dort wo die T-Tubuli mit dem sarkoplasmatischen Retikulum in Kontakt stehen, haben sich besondere Strukturen ausgebildet, die man als Triaden bezeichnet und an deren Aufbau dem Glycoprotein Triadin eine wichtige Rolle zukommt (Brandt et al., 1992; Guo and Campbell, 1995; Knudson et al., 1993). An diesen Stellen wird auf eine Membrandepolarisation hin Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum ins Zytosol freigesetzt. Dabei führt die α -Untereinheit des Dihydropyridinrezeptors (DHPR) auf den T-Tubuli spannungsabhängig eine Konformationsänderung durch. Das führt einerseits zum Durchtritt von Ca^{2+} -Ionen aus dem Extrazellulärraum durch den DHPR (Abb. 2 (5)) und andererseits zu einer direkten Interaktion mit dem in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums gelegenen Ryanodinrezeptor (Leong and MacLennan 1998). Dieser läßt daraufhin Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol strömen (Abb. 2 (6)). Der Öffnung dieses Kanals geht möglicherweise eine Ca^{2+} -Freisetzung vom Calsequestrin voraus (Ikemoto et al., 1989; Donoso et al., 1995), einem Protein, das im sarkoplasmatischen Retikulum viele Ca^{2+} -Ionen niederaffin bindet (Yano and Zarain-Herzberg, 1994). Der erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Spiegel führt zur Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle weiterer Ryanodinrezeptoren, die nicht mit DHPR in Verbindung stehen (Abb. 2 (7)). Dieser Prozeß wird auch als calciuminduzierte Calciumfreisetzung bezeichnet. Durch die Bindung des zytosolischen Ca^{2+} an Troponin C ändert sich dessen Struktur und damit seine Wechselwirkung mit Tropomyosin. Tropomyosin wird so verschoben, daß es die Myosinbindungsstellen des Aktins nicht länger blockiert und der Muskel durch ATP-getriebene Wanderung der Myosinköpfchen entlang des Aktins kontrahieren kann. Die Kontraktion wird beendet, indem das Ca^{2+} aus dem Zytosol unter ATP-Hydrolyse zurück in das sarkoplasmatische Retikulum gepumpt wird (Abb. 2 (8)), da sich mit abnehmender Ca^{2+} -Konzentration der Troponin C-Tropomyosin-Komplex wieder ausbildet. Im Herzmuskel werden Ca^{2+} -Ionen hauptsächlich durch einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in das sarkoplasmatische Retikulum zurücktransportiert, im Skelettmuskel handelt es sich um einen sekundär aktiven Transport, der durch die Na^+/K^+ -ATPase in der Plasmamembran angetrieben wird und dessen

Funktionsweise noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Froemming and Ohlendieck, 2001). Die Reduktion der Ca^{2+} -Ionenkonzentration ist jedoch nicht nur für die Beendigung der Muskelkontraktion notwendig, sondern schützt die Zelle auch vor Schäden, die durch eine zu hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auftreten können.

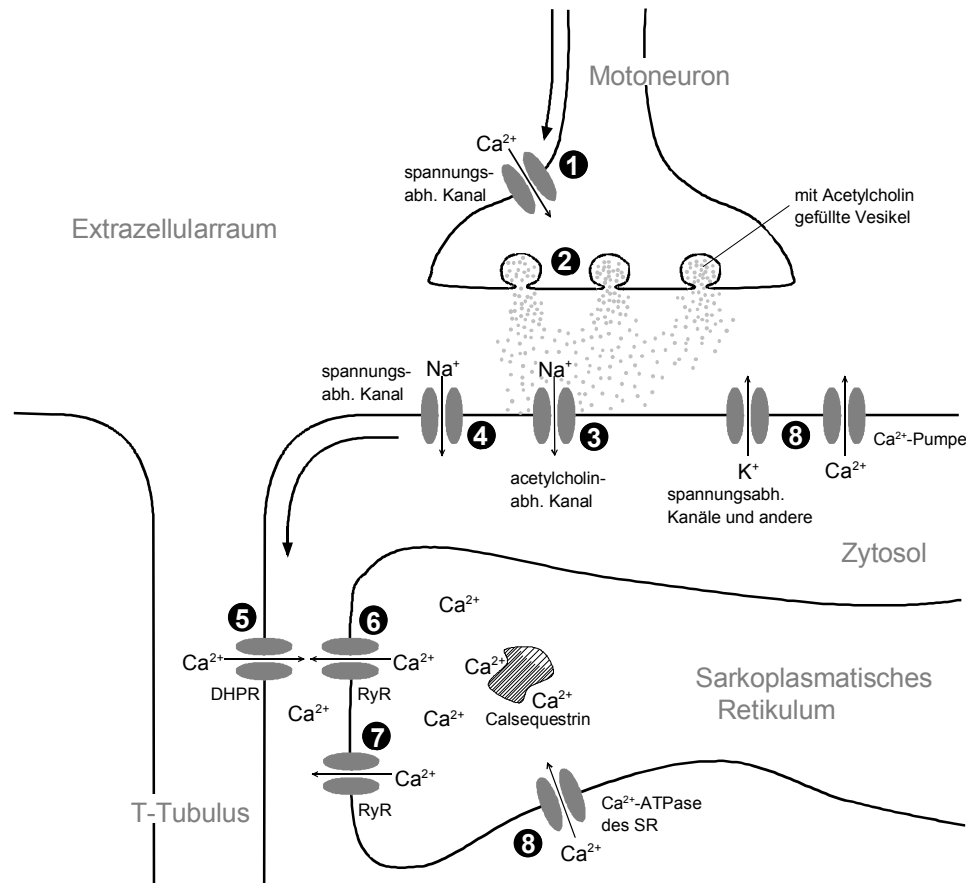


Abb. 2: Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Freisetzungprozesses bei der Kopplung von Muskelanregung und Kontraktion Beschreibung im Text. DHPR: Dihydropyridinrezeptor; RyR: Ryanodinrezeptor; SR: sarkoplasmatisches Retikulum; T-Tubulus: transversaler Tubulus

In *C. elegans* erfolgt die Muskelkontraktion ebenfalls auf eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum hin. Der Nematode besitzt jedoch keine T-Tubuli, weil sie wahrscheinlich aufgrund der kurzen Distanz zwischen Plasmamembran und sarkoplasmatischem Retikulum überflüssig sind (Waterston, 1988). Die Trennung von sensorischen Nerven, Interneuronen und Motoneuronen ist nicht so strikt wie beim Säuger, so daß einzelne Neuronen mehrere dieser Funktionen ineinander vereinigen (Ward et al., 1975). Ein weiterer Unterschied zur Muskelkontraktion im Säuger besteht darin, daß die Membran von Muskelzellen in *C. elegans* neben Acetylcholinrezeptoren zahlreiche weitere Neurotransmitterrezeptoren enthält wie zum Beispiel für Serotonin oder γ -Aminobuttersäure. Während ein Aktionspotential, das die neuromuskuläre Endplatte eines Säugermuskels erreicht, immer zu einer Kontraktion führt, kann bei *C. elegans* die Sekretion von

γ -Aminobuttersäure in den synaptischen Spalt eine Relaxation der angesprochenen Muskelzelle bewirken.

1.1.3 Der Unc-93 Phänotyp

Für die Aufklärung der Signaltransduktionswege, die die Muskelbewegung beeinflussen, sind die *unc*-Gene aus *C. elegans* von besonderem Interesse. Zu dieser Gruppe werden 130 verschiedene Gene zusammengefaßt, deren Mutation oder Deletion zu einer unkoordinierten (engl.; uncoordinated) Fortbewegung des Nematoden führt. Einige der Defekte haben eine vollständige Lähmung zur Folge, während andere nur die Vorwärts- oder nur die Rückwärtsbewegung beeinträchtigen. Bei wieder anderen ist die für eine gerichtete Bewegung notwendige Koordination der Muskelbewegung gestört.

Bisher sind Säugerproteine mit 27 % bis 70 % Homologie zu 22 verschiedenen *Unc*-Proteinen, identifiziert worden, wie z. B. Myosin schwere Kette (*Unc-54*), Myosin leichte Ketten Kinase (*Unc-22*) oder Syntaxin 1A (*Unc-64*).

Wie schon aus diesen Beispielen hervorgeht, können Mutationen in Proteinen, die an ganz unterschiedlichen Punkten in den Prozeß der Muskelkontraktion eingreifen, einen unkoordinierten Phänotyp auslösen. Liegt der Defekt in einem Protein vor, das am Muskelaufbau beteiligt ist, kommt es zu Veränderungen in der Ultrastruktur des Muskels, was häufig licht- oder elektronenmikroskopisch nachweisbar ist.

Ein unkoordinierter Phänotyp tritt auch auf, wenn eine Innervierung der Muskelzellen unmöglich ist, weil ein Fehler in der Signalweiterleitung von Nervenzelle zu Nervenzelle oder vom Motoneuron zur motorischen Endplatte vorliegt. Solche neuronal bedingten Muskeldefekte sind in frühen Embryonalstadien oft nicht zu erkennen, da die Muskelkontraktion zu diesem Zeitpunkt noch muskulär reguliert wird. Erst wenn die Verbindung der Motoneurone mit den motorischen Endplatten erfolgt ist, tritt der unkoordinierte Phänotyp in Erscheinung (Hall and Hedgecock, 1991; Rand and Russel, 1984; Levin and Horvitz, 1993).

Letzteres ist z. B. bei einem Phänotyp der Fall, den Mutationen im *unc-93*-Gen hervorrufen. Man bezeichnet das Erscheinungsbild als Gummiband (rubber band)-Phänotyp, da die Nematoden auf eine Berührung am Kopf hin nicht in einer Rückwärtsbewegung flüchten, sondern statt dessen mehrmals alle Muskeln zeitgleich kontrahieren und sofort wieder relaxieren. Weitere Merkmale dieses Phänotyps sind die Unfähigkeit, Eier zu legen, eine langgestreckte Körperform und weniger scharf ausgeprägte A- und I-Banden. Diese strukturelle Veränderung ist allerdings so gering, daß sie nicht der Auslöser für den Gummibandphänotyp sein kann (Greenwald and Horvitz, 1980; Waterston, 1988).

Die Bewegungsweise des Wildtyp-Nematoden ist sehr charakteristisch. Sie ist in allen vier Larvenstadien und beim adulten Tier gleich. Es handelt sich um ein sinusförmiges Vorwärts- und Rückwärtsschlängeln ohne jede Veränderung der Körperlänge oder -dicke. Die

Bewegung kommt durch eine Welle von abwechselnder Kontraktion dorsaler oder ventraler Muskelzellen zustande, die sich entlang der Längsachse des Wurmes von vorn nach hinten zieht. Zu einem bestimmten Zeitpunkt müssen Zellen auf dorsaler Seite kontrahieren, während die gegenüberliegenden auf ventraler Seite relaxieren. Gleichzeitig müssen benachbarte dorsale Zellen relaxieren und die ihnen entsprechenden ventralen kontrahieren (Calfie and White, 1988). Erreicht wird dies dadurch, daß Motoneurone, die die Kontraktion der Muskelzellen auf der einen Körperseite induzieren, gleichzeitig auch ein Aktionspotential in inhibitorischen Neuronen auslösen, die die Muskelzellen auf der gegenüberliegenden Seite innervieren. Dort führt die Ausschüttung des Neurotransmitters GABA zur Relaxation der angesprochenen Zellen. Bei einer Störung des inhibitorischen Reizes durch einen Defekt in den GABA-Rezeptoren in der Membran der Muskelzellen oder bei der GABA-Ausschüttung kontrahieren alle Muskelzellen gleichzeitig (McIntire et al., 1993).

Die Eiablage von *C. elegans* wird von zwei Serotonin sezernierenden Neuronen (HSN) gesteuert, die bilateral symmetrisch in der Nähe der Vulva positioniert sind (Trent et al., 1983). Sie sind über Synapsen direkt mit je zwei Muskelzellen der Vulva verbunden, die wiederum mit den übrigen Muskelzellen der Vulva und des Uterus über Gap Junctions in Kontakt stehen (White et al., 1986). Die gleichen Zellen werden noch von zwei weiteren Neuronen innerviert (VC), deren Funktion unbekannt ist und deren Fehlen keine nachweisbaren Auswirkungen hat (Waterston, 1988). Durch eine koordinierte Kontraktion aller 16 Muskelzellen des Uterus und der Vulva, wird der Uterus verengt und die Vulva geöffnet, so daß die befruchteten Eier nach außen gelangen können (Trent et al., 1983). Liegt ein Defekt bei der Eiablage vor, so sind die Nematoden nicht unfruchtbar. Stattdessen bilden sich Taschen, in denen die Eier heranreifen und die Larven schlüpfen. Das Muttertier stirbt dabei (Greenwald and Horvitz, 1986).

Erstaunlicherweise ist der Phänotyp von Nematoden, bei denen *unc-93* vollständig deletiert ist, nicht von dem des Wildtyps zu unterscheiden. Der gleiche Gummiband-Phänotyp ist auch bei Mutationen in den Genen *sup-9* oder *sup-10* zu beobachten. Wird durch Mutation von *unc-93*, *sup-9* oder *sup-10* der Gummiband-Phänotyp hervorgerufen, tritt nach Deletion eines der anderen beiden Gene wieder der Wildtyp-Phänotyp in Erscheinung. Des weiteren kann ein durch eine Mutation in *Unc-93* hervorgerufener Gummiband-Phänotyp durch eine entsprechende Mutation in den Genen für *Sup-9* oder *Sup-10* verstärkt oder abgeschwächt werden. Dies läßt den Schluß zu, daß *Unc-93*, *Sup-9* und *Sup-10* in einem Komplex zusammenwirken und die Funktion jedes einzelnen der drei Proteine die Funktion des gesamten Komplexes beeinflusst. Eine Fehlfunktion des Komplexes löst den *Unc*-Phänotyp aus. Kann der Komplex aber nicht gebildet werden, weil eines der drei Proteine fehlt oder Mutationen in mehreren eine Wechselwirkung miteinander unmöglich machen, so kann seine Funktion höchstwahrscheinlich von einem redundanten Stoffwechselweg übernommen werden. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, daß ein zu *Unc-93* homologes Protein die Funktion des fehlenden übernimmt, wozu aber eine Interaktion mit *Sup-9* und *Sup-10*

notwendig wäre. Da die korrekte Funktion aber auch dann gegeben ist, wenn Sup-9 oder Sup-10 fehlen, muß es sich um zwei getrennte Stoffwechselwege handeln (Levin and Horvitz, 1992).

1.1.4 Unc-93 und assoziierte Proteine

Das unc-93 Gen ist aus 16 Exons aufgebaut, einer für *C. elegans* ungewöhnlich hohen Zahl. Es existieren zwei Splicevarianten, deren Translationsprodukte sich nur in den 5 N-terminalen Aminosäuren unterscheiden. Sie sind aus 700 bzw. 705 Aminosäuren aufgebaut, von denen die 240 bzw. 245 N-terminalen zu 40 % geladene Seitengruppen enthalten, während die übrigen 460 einen ausgeprägt hydrophoben Charakter haben und 5 bis 10 Transmembrandomänen ausbilden könnten (Levin and Horvitz, 1992). Die Expression ist schwach und abhängig vom Entwicklungsstadium. Die größte mRNA-Menge von unc-93 findet sich im ersten Larvenstadium, aber auch im adulten Tier ist noch unc-93 mRNA vorhanden. Die Expressionsstärke steht in Korrelation mit der Ausprägung des Gummiband-Phänotyps in Unc-93 Mutanten: adulte Tiere können sich besser bewegen als L1-Larven.

Das Sup-10 Transkript liegt im Nematoden ebenfalls nur in sehr geringer Menge vor (Cummins and Anderson, 1991). Das Protein wird in Zellen der Körperlängsmuskulatur exprimiert (Herman, 1984). Es besitzt eine N- und eine C-terminale Transmembrandomäne und enthält eine Carboxypeptidasedomäne unbekannter Funktion (Abb. 3).

Sup-9 ist zur Untereinheit eines zweiporigen K^+ -Kanals homolog (de la Cruz and Horvitz, 1997). Das Genom von *C. elegans* codiert für mindestens 58 verschiedene Untereinheiten zweiporiger K^+ -Kanäle, im Säuger wurden bisher 15 verschiedene identifiziert. Die größte Homologie (40 %) besteht zwischen n2pore38 aus *C. elegans* und menschlichem Task-1. Zweiporige Kaliumkanäle sind aus vier Transmembrandomänen aufgebaut, wobei sich zwischen der ersten und zweiten sowie der dritten und vierten je eine P-Domäne befindet, die den Selektivitätsfilter des Kanals ausbildet. In einem funktionstüchtigen K^+ -Kanal müssen vier P-Domänen zusammenwirken. Ströme, die durch zweiporige Kaliumkanäle fließen, sind in der Regel Hintergrundströme, die für die Einstellung des Ruhepotentials verantwortlich sind. Exprimiert wird Sup-9 in den Zellen der Körperwandmuskulatur und in den Muskelzellen der Vulva (de la Cruz et al., 1998)

Zwei weitere Proteine, die möglicherweise mit dem Komplex aus Unc-93, Sup-9 und Sup-10 interagieren, für seine Funktion aber nicht essentiell sind, sind Sup-11 und Sup-18. Mutanten zeigen ebenfalls Gummiband-Phänotypen, können aber durch Unc-93, Sup-9 oder Sup-10 Mutationen hervorgerufene Gummiband-Phänotypen nur zum Teil revertieren (Greenwald and Horvitz, 1986; Greenwald and Horvitz, 1982).

Sup-18 besitzt eine Transmembrandomäne und einen extrazellulär gelegenen N-Terminus (Abb. 3). Die Sequenz seiner intrazellulären Domäne zeigt Ähnlichkeit mit der bakterieller NADH Oxidasen. Exprimiert wird Sup-18 wie Sup-9 in den Zellen der

Körperlängsmuskulatur und den Muskelzellen der Vulva (de la Cruz et al., 1998). Fehlt Sup-18 ganz, verhält sich das Tier wie der Wildtyp und kann einen durch Sup-10 Mutation hervorgerufenen Gummiband-Phänotyp unterdrücken (Greenwald and Horvitz, 1986).

Sup-11 Nullmutationen führen zum Tod des Embryos, der wahrscheinlich durch Nährstoffmangel verursacht wird (Greenwald and Horvitz, 1982). Mutationen, die nicht lethal sind, können den Gummiband-Phänotyp von Sup-9 und Sup-10 Mutanten teilweise revertieren, den von Unc-93-Mutanten vollständig. Die Tiere sind allerdings kleiner und dürr (Greenwald and Horvitz, 1982; Greenwald and Horvitz, 1986).

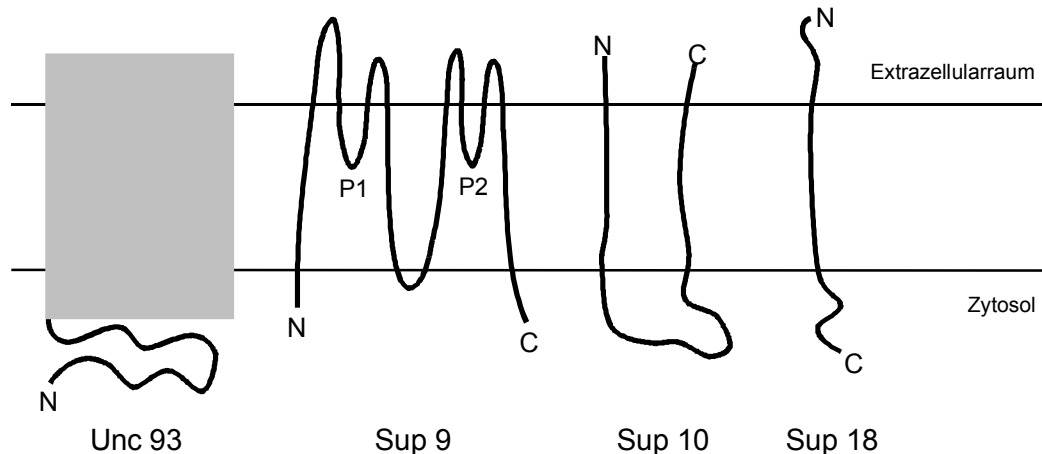


Abb. 3: Schematisch Darstellung der Membrantopologie von Unc-93, Sup-9, Sup-10 und Sup-18. Die Anzahl der Transmembrandomänen von Unc-93 ist unbekannt.

Die Rolle, die der Komplex aus Unc-93, Sup-9 und Sup-10 bei der Koordination der Muskelkontraktion spielt, ist bisher unbekannt. Die Reaktion von Mutanten auf Berührung am Kopf zeigt, daß sie in der Lage sind, ihre Muskeln zu kontrahieren. Das macht es unwahrscheinlich, daß der Komplex eine Bedeutung für das primäre exzitatorische Signal für die Muskelkontraktion hat. Wenn es sich bei Sup-9 tatsächlich um die Untereinheit eines zweiporigen Kaliumkanals handelt, scheint es naheliegend, daß Unc-93 und Sup-10 die Aktivität dieses Kanals regulieren und damit die Erregbarkeit der Muskelzellen aus dem Ruhezustand beeinflussen. Die Regulation könnte durch Signaltransduktionswege erfolgen, die durch modulatorische Neurotransmitter in Gang gesetzt werden oder auf Rückkopplungs- oder Adaptationsprozessen beruhen. Der Gummiband-Phänotyp könnte dann auf einen Ionenkanal mit verändertem Öffnungsverhalten zurückzuführen sein.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß der Komplex aus Unc-93, Sup-9 und Sup-10 die Kommunikation der Muskelzellen untereinander beeinflusst, indem er zum Beispiel einen Einfluß auf die Gap Junctions ausübt. Diese verbinden Muskelzellen der Körperwand genauso miteinander wie die von Vulva und Uterus (Levin and Horvitz, 1992).

Da pharmakologisch unterscheidbare Muskeltypen von den Mutationen betroffen sind, scheint es sich um Komponenten zu handeln, die bei unterschiedlichen Muskeln gleich sind.

Eine Konservierung solcher generellen Regulationsprozesse bis hin zum Säuger ist deshalb wahrscheinlich. Die Klonierung und Charakterisierung der entsprechenden, bisher unbekanntenen Säugergene könnte deshalb langfristig entscheidende Erkenntnisse über Kontrollmechanismen der Muskelbewegung liefern, wie dies nach der Identifizierung der Säugerhomologen von Unc-13 und Unc-18 (Munc-13 bzw. Munc-18) bereits für den Prozeß der Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran der Fall war (Hata et al., 1993; Brose et al., 1995).

1.2 Aufgabenstellung

Unc-93 spielt im Komplex mit Sup-9 und Sup-10 eine Rolle bei der Regulation der Kontraktion von Körperlängsmuskulatur, Vulva- und Uterusmuskeln des Nematoden *C. elegans* (Greenwald an Horvitz, 1980; 1992; 1986; Waterston 1988). Als integrales Membranprotein der Muskelzellen leistet es dabei seinen Beitrag möglicherweise durch Modulation der Aktivität des zweiporigen K⁺-Kanals, der von sup-9 kodiert wird. Mutationen in einem der drei Gene beeinflussen nicht die Muskelkontraktion an sich, sondern das kontrollierte Zusammenspiel verschiedener Muskelzellen, was sich in einer unkoordinierten Fortbewegung und dem Verlust der Fähigkeit zur Eiablage manifestiert.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Säugerhomologes von Unc-93 zu klonieren und zu charakterisieren, um Grundlagen zu schaffen, die es ermöglichen, unter Berücksichtigung des Wissens über den Modellorganismus *C. elegans* neue Erkenntnisse über die Muskelbewegung im Säuger zu gewinnen.

Nach Identifizierung eines zu unc-93 homologen Gens sollten Northernblotanalysen Aufschluß über die Gewebeverteilung und die Transkriptgröße der mRNA geben.

Erkenntnisse über posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung oder Abspaltung einer Signalsequenz sollten aus *in vitro* Translationsversuchen gewonnen werden. Des Weiteren sollten *in vitro* Translationsexperimente zeigen, ob es sich bei dem Protein, wie für Unc-93 vermutet, um ein integrales Membranprotein handelt.

Die zelluläre Lokalisation sollte dann durch Transfektion von Eukaryontenzelllinien mit EGFP-Fusionskonstrukten oder durch Immunfluoreszenzfärbung nach Transfektion der cDNA bestimmt werden.

Unter Anwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems sollten Bindungspartner gesucht werden, um aus deren physiologischer Bedeutung möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von Unc-93 und seinem Homologen bei der Kontrolle der Muskelkontraktion ziehen zu können.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

1,4-Diazobicyclo[2.2.3]octane (Dabco)	Sigma
1,4-Piperazindinethansulfonsäure (PIPES)	Roche Diagnostics
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Merck
2-Propanol, p. a.	Merck
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Roth
6-Amino-n-hexansäure	Sigma
8-Hydroxychinolin	Merck
Aceton, reinst	Riedel-DeHaën
α -[³⁵ S]-Methionin, 37 TBq/mmol	Amersham Pharmacia Biotech
α -D(+)-Glucose	Roth
α -[³² P]-dCTP, 110 TBq/mmol	Amersham Pharmacia Biotech
β -Mercaptoethanol, zur Synthese	Merck
Acrylamid 2 x, research grade	Serva
Adenin	Roth
Adenosintriphosphat	Roche Diagnostics
Agarose	Qbiogene
Ammoniumchlorid, p. a.	Merck
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin, Natriumsalz	Sigma
Arginin	Roth
Bacto Pepton, enzymatisch verdaut	Difco Laboratories
Bacto-Agar	Difco Laboratories
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories
Benzamidin	Sigma
bis-Benzimidazol	Hoechst
Bromphenolblau, Natriumsalz reinst	Serva
Calciumchlorid, getrocknet	Merck
Chloroform, p. a., stabilisiert mit ca. 0,75 % Ethanol	J. T. Baker
Coomassie Brilliant Blue R 250, für die Elektrophorese	Merck
Cytosintriphosphat	Roche Diagnostics
D(+)-Galactose, für die Bakteriologie	Merck
DEAE-Dextran, mittleres Molekulargewicht: 500000	Sigma
Desoxyadenosintriphosphat	Roth
Desoxycytosintriphosphat	Roth
Desoxyguanosintriphosphat	Roth
Desoxythymidintriphosphat	Roth
Diethylpyrocarbonat, research grade	Serva
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid für die Molekularbiologie	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei, p. a.	Merck
Dithiothreitol	Sigma
DNA aus Lachshoden	Sigma
Essigsäure, reinst	Riedel-DeHaën

Ethanol, p. a.	J. T. Baker
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Dinatriumsalz, p. a.	Serva
Glutathion Sepharose [®] 4B	Amersham Pharmacia Biotech
Glutathion, reduziert	Sigma
Glycerin, doppelt destilliert p. a.	Serva
Glycin, p. a.	Roth
Guanosintriphosphat	Roche Diagnostics
Harnstoff, p. a.	Roth
Hefeextrakt, für die Bakteriologie	Roth
HEPES	Sigma
Histidin	Roth
Isoleucin	Roth
Isopropanol reinst	Riedel DeHaën
Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (IPTG), dioxanfrei	Merck
Kaliumacetat, reinst	Riedel DeHaën
Kaliumchlorid, p. a.	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat, p. a.	Merck
Kanamycin, 781 μ g/mg Pulver	USB
Leucin	Roth
Leupeptin	Roche Diagnostics
Lithiumacetat	Roth
Lysin	Roth
Magermilchpulver	Glücksklee
Magnesiumchlorid, reinst	Riedel DeHaën
Magnesiumsulfat, p. a.	Merck
Methanol, p. a.	J. T. Baker
Methionin	Roth
m-Kresol	Merck
Mowiol 40 – 88	Aldrich
N, N, N', N', Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
N',N'-Methylen-bisacrylamid, 2x krist. research grade	Serva
Natriumacetat, wasserfrei, p. a.	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat p. a.	Riedel DeHaën
Natriumhydroxid	Merck
Paraformaldehyd, reinst	Merck
Pepstatin A	Sigma
Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Roth
Phenol pH 7,5 – 8,0	Roth
Phenolrot	Merck
Phenylalanin	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglycol 4000	Merck
Poly-L-Lysin	Sigma
Ponceau S	Merck

p-Phenylendiamin	Sigma
Protein G Agarose	Santa Cruz Biotechnology
Ribonukleaseinhibitor	MBI Fermentas
Rinderserumalbumin (BSA), lyophilisiert, pH 7,0, standard grade	Serva
Saccharose	Merck
SeaKem ME Agarose, reines Agarosepulver aus Agar	FMC BioProducts
Sorbitol	Sigma
Sulfosalicylsäure, p. a.	Riedel DeHaën
Threonin	Roth
Thymidintriphosphat	Roche Diagnostics
Trichloressigsäure p. a.	Roth
Triton® X-100, für Szintillationstechnik	Serva
Tryptophan	Roth
Tween 20®	Sigma
Tyrosin	Merck
Uracil	Merck
Valin	Roth
Xylen Cyanol FF	Sigma
Yeast Nitrogen Base (YNB), aminosäurefrei, ammoniumsulfatfrei	Difco Laboratories

2.2 Systeme

Anionenaustauschersäule tip-500	Qiagen
BigDye™ Terminator	Perkin-Elmer
CnBr-aktivierte Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech
dem <i>DC Protein Assay Kit</i>	Biorad
ECL-System	Amersham Pharmacia Biotech
Hundepankreasmembranen	Promega
Megaprime DNA Labelling Kit RPN 1606/7	Amersham Pharmacia Biotech
QIAEX II Agarose-Gel-Extraktion Kit	Qiagen
QIAprep Spin-Säulen	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
TNT® Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega

2.3 Oligonukleotide

SP6-Primer	5'-CGATTTAGGTGACACTATAG-3'
T3-Primer	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
T7-Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
Munc93 A179S XhoI (FW)	5'-CCTGTGGCTCGAGTGACTGCCTGATGGCC-3'
Munc93 G178NA179S XhoI (RV)	5'-GCAGTCACTCGAGTTACAGGACGTGAGCTGCTCT-3'
m Munc 93 RV (458-452)	5'-CACGGATCCGCTCGAGATTTTTGTTTTCAATTCCTCC TCT-3'
m Munc 93 RV (392-387)	5'-GCGGGATCCTTATCCAAGGCGGTAGTTGGC-3'
m Munc 93 FW (345-350)	5'-GCGGAATTCAACACCAACCAACTGCCTG-3'
m Munc 93 FW (431-436)	5'-GCGGAATTCGAGTACCTGGAAGTCAAGG-3'
m Munc 93 RV (284-278)	5'-GCGGGATCCTTAATAAGACTTTGTGTACTCTCC-3'
m Munc 93 FW (225-231)	5'-GCGGAATTCTTGGAAGATAAGCTTGA-3'

366N23 (54002-53989)	5'-CTTGATCTCTGTAAAGATGG-3'
366N23 FW (34387-34405)	5'-TTTGATCCCCACCTCCATA-3'
366N23 RV	5'-TAATGGGCGAAGGCAGCTT-3'
366N23 FW	5'-CTGTCGACTTTCAAGCTATA-3'
mouse Unc-93 FW	5'-CTTTGCCTGCACTGGTTTT-3'
mouse Unc-93 RV	5'-GTAAGCTGTGAGCAGGTAT-3'
Munc-93 (2) FW	5'-CACACCTCGAGATGGACAGAAGTCTAAGGAAC-3'
mouse Unc-93 (2) FW	5'-GCCCTGGGCTACGGCG-3'
mouse Unc-93 (2) RV	5'-GCCAGTCGCTCCAGCC-3'
GST-Munc-93 FW	5'-AATTCTAGGACAGGTCAACCAGGCAGAGGATGAA GAAATACAAACAAAAATGTGA-3'
GST-Munc-93 RV	5'-AGCTTCACATTTTTGTTTGTATTTCTTCATCCTCTGC CTGGTTGACCTGTCCTAG-3'
Munc-93 FW Xba I	5'-GCGCTCTAGAGCCGCCACCATGGACAGAAGTCTAA GGAAC-3'
Munc-93 RV EcoR I	5'-CCGGAATTCACATTTTTGTTTGTATTTCTT-3'
Munc-93 RV Hind III	5'-CGCGCGAAGCTTCATTTTTGTTTGTATTTCTTCAT-3'
NSS #4 (FW)	5'-AACTCGAGTGG-3'
NSS #5 (FW)	5'-CAACTCGAGTC-3'
NSS #6	5'-ACTCGAGT-3'
NSS #4 (RV)	5'-CCACTCGAGTT-3'
NSS #5 (RV)	5'-GACTCGAGTTG-3'
HA XhoI (FW)	5'-TCGAATTACCCATATGACGTACCCGATTACGCCAGC CTG-3'
HA XhoI (RV)	5'-TCGACAGGCTGGCGTAATCGGGTACGTCATATGGG TAAT-3'
#Nss-1	5'-CAACTCGAGTTG-3'

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Roth synthetisiert.

2.4 Standards

DNA-Standard:

Lambda DNA/*EcoRI/HindIII*

Eigene Herstellung

Fragmentgrößen: 21226, 5148, 4973, 4277, 3530, 2027, 1904,
1580, 1330, 983, 831, 564 und 125 bp

Proteinstandards:

Molekulargewichtsstandard (26,8 kDa – 180 kDa), vorgefärbt Fluka

Molekulargewichtsstandard (6,5 kDa – 175 kDa), vorgefärbt New England Biolabs

Molekulargewichtsstandard (14,4 kDa – 97,4 kDa) Biorad

Molekulargewichtsstandard (14,4 kDa – 116 kDa) Fermentas

2.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase aus Kalbsdarm	Roche Diagnostics
Klenow Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech
Oxalyticase	Enzogenetics
Pfu-DNA-Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
	Roche Diagnostics
	MBI Fermentas
Ribonuklease A aus Rinderpankreas, 5 x kristallisiert	Sigma
SP6-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase (400 U/ μ l)	New England Biolabs
T7-RNA-Polymerase	Fermentas

2.6 Antikörper

anti HA	Affinitätsgereinigter monoklonaler IgG _{2a} Antikörper (Maus) gegen ein Peptid aus einer internen Region des Influenza Hämagglutininproteins Verdünnung in Westernblotanalysen: 1:200 Verdünnung in der Immunfluoreszenzfärbung: 1:10 Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti hMunc93	Polyklonales Antiserum (Kaninchen), hergestellt gegen die 15 C-terminalen Aminosäuren von hMunc93 gekoppelt an das Hämocyanin der Napfschnecke <i>Megathura crenulata</i> (keyhole limpet) Verdünnung in Westernblotanalysen: 1:500 Verdünnung für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie: 1:25 aus eigener Herstellung
anti LexA (2 – 12)	Monoklonaler IgG ₁ Antikörper (Maus) gegen ein Epitop in der DNA Bindungsdomäne von LexA Verdünnung in Westernblotanalysen: 1:200 Santa Cruz Biotechnology, Inc.

DTAF anti rabbit	DTAF markierter, affinitätsgereinigter Antikörper (Ziege) gegen die leichte Kette des F(ab') ₂ -Fragmentes von Kaninchen IgG Verdünnung für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie: 1:200 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
POD anti mouse	Peroxidase gekoppelter, affinitätsgereinigter Antikörper (Kaninchen) gegen das Fc-Fragment von Maus IgG Verdünnung in Westernblotanalysen: 1:5000 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
POD anti rabbit	Peroxidase gekoppelter, affinitätsgereinigter Antikörper (Ziege) gegen die leichte Kette des F(ab') ₂ -Fragmentes von Kaninchen IgG Verdünnung in Westernblotanalysen: 1:5000 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.
Rhodamin anti mouse	Affinitätsgereinigter Antikörper (Schaf) gegen Maus-Immunglobuline, konjugiert mit 5(6)-Carboxy-rhodamin 101-N-hydroxysuccinimidester Verdünnung für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie: 1:100 – 1:500 Roche Diagnostics
Rhodamin anti rabbit	Rhodamin markierter, affinitätsgereinigter Antikörper (Ziege) gegen die leichte Kette des F(ab') ₂ -Fragmentes von Kaninchen IgG Verdünnung für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie: 1:1000 Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.

2.7 Bakterien

Alle verwendeten Bakterienstämme stammen des *E. coli* Sicherheitsstamm K12 ab.

TG1: F' traD36 lacI^q Δ(lacZ)M15 proA⁺B⁺/supE, Δ(hsdM-mcrB)5 (r_K⁻ m_K⁻ McrB⁻) thi Δ(lac-proAB), Stratagene

Dieser Bakterienstamm wird zur Proteinexpression verwendet. Durch eine Mutation im Promotorbereich des *lac*-Repressorgens produziert TG1 zehnmal so viel *lac*-Repressor wie

der Wildtypstamm. Eine hoch effiziente Expression von Genen, die unter der Kontrolle des *lac*-Promotors stehen, wird deshalb erst durch Zugabe von IPTG ermöglicht, das den *lac*-Repressor bindet.

DH5 α : F⁻ ϕ 80dlacZDM15 D(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 Γ thi-1 gyrA96 relA1, Gibco BRL

In DH5 α -Bakterien werden Arbeiten wie die Transformation von Ligationsansätzen sowie Amplifikation und Reinigung von DNA durchgeführt, da sie durch ihre Rekombinasedefizienz für eine hohe Insertstabilität sorgen und außerdem die Präparation sehr reiner DNA ermöglichen.

HB101: F⁻, hsdS20 (r-B, m-B), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK-2, rpsL20(str_R), xyl-5, mtl-1, supE44, (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969, Bolivar et al., 1977), (ATCC 33694)

HB101 Bakterien lassen sich mit hoher Effizienz durch Elektroporation transformieren. Außerdem ermöglichen sie durch eine Leucinauxotrophie auf entsprechenden Mangelmedien das selektive Wachstum solcher Bakterien, die ein Plasmid mit einem Gen aufgenommen haben, das für β -Isopropyl-Malatdehydrogenase kodiert, ein Enzym im Stoffwechselweg der Leucinsynthese. Genutzt wird diese Selektion, um die Plasmide pVP16 und pBTM116 nach einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen voneinander trennen zu können.

2.8 Hefestämme

L40: MATa his3 Δ 200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2:(lexAop)₄-HIS3 URA3:(lexAop)₈-LacZ (Vojtek et al., 1993)

Bei diesem Stamm wurden das his3- und das lacZ-Reportergen unter Kontrolle des LexA-Operators ins Genom integriert.

YRN974: MATa trp1-289 leu2-3,112 his3-1 URA3::lexAop-EGFP MAL2-8^o SUC2 (Mancini et al., 1997)

YRN974 enthält genomisch γ EGFP3 als Reportergen unter der Kontrolle des LexA-Operators (Cormack et al., 1996, 1997)

2.9 Zelllinien

CHO-K1: Zelllinie aus dem Eierstock eines erwachsenen chinesischen Hamsters (ATCC CCL-61)

HEK 293: Humane embryonale Nierenzelllinie (DSMZ ACC 305)

Hep-G2: Humane Leberkarzinomzelllinie (DSMZ ACC 180)

Vero-B4: Fibroblastenähnliche Nierenzelllinie aus der afrikanischen Grünen Meerkatze (DSMZ ACC33)

MDCK: Nieren-Epithelzelllinie aus einem weiblichen adulten Cockerspaniel (ATCC CCL-34)

2.10 Plasmide

pIMAGE2791017

Größe: 5950 bp

pIMAGE2791017 (I.M.A.G.E. Consortium CloneID 2791017, IMAGp998J106905Q2) enthält cDNA von hmunc-93B kloniert in die Sall/NotI Schnittstellen von pCMV-SPORT6. Das Plasmid stammt vom I.M.A.G.E Consortium [LLNL] cDNA Clones (<http://www-bio.llnl.gov/bbrp/image/image.html>, Lennon et al., 1996).

pIMAGE 557640

Größe: 7137 bp

pIMAGE557640 (I.M.A.G.E. Consortium CloneID 5576407, IMAGp998I011342Q2) enthält mmunc-93 kloniert in die Sall/NotI Schnittstellen von pCMV-SPORT2. Das Plasmid stammt vom I.M.A.G.E Consortium [LLNL] cDNA Clones (<http://www-bio.llnl.gov/bbrp/image/image.html>, Lennon et al., 1996).

pIMAGE415697

Größe: 4949 bp

pIMAGE415697 (I.M.A.G.E. Consortium CloneID 415697, IMAGp998N18972) enthält hmunc-93 kloniert in die PacI/EcoRI-Schnittstellen von pT7T3D. Das Plasmid stammt vom I.M.A.G.E Consortium [LLNL] cDNA Clones (<http://www-bio.llnl.gov/bbrp/image/image.html>, Lennon et al., 1996).

pcDNA3

Größe: 5446 bp

Das Plasmid pcDNA3 (Invitrogen) dient der Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen. Die Transkription steht dabei unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) Promotors. Als Selektionsmarker für die Amplifikation in Bakterienzellen trägt das Plasmid das β -Lactamasegen, für eine stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen ist ein Aminoglykosid-3'-phosphotransferasegen vorhanden, dessen Translationsprodukt eine G418 Resistenz vermittelt.

pcDNA3 hMunc-93

Größe: 3934 bp

Für die Herstellung von pcDNA3 hMunc-93 wurde das hmunc-93 Gen aus dem Plasmid pSP72 hMunc-93 durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* isoliert und in den ebenso geschrittenen Vektor pcDNA3 kloniert.

pcDNA3 hMunc-93 HA1

Größe: 6862 bp

Nach einem Partialverdau des Plasmids pcDNA3 hMunc-93 mit *NcoI* wurden die überhängenden Enden durch Einsatz von Klenow Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt und dann die Oligonukleotidkassette NSS#4 in die Schnittstelle am 5'-Ende der kodierenden Sequenz von hmunc-93 eingesetzt. Das Plasmid wurde anschließend mit *XhoI* geschnitten und die Oligonukleotidkassette HA-*XhoI* in die neu generierte *XhoI*-Schnittstelle ligiert.

pcDNA3 hMunc-93 HA102

Größe: 6962

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA3 hMunc-93 mit *AvaI* verdaut und die Oligonukleotidkassette NSS#5 nach dem Auffüllen der überhängenden Enden mit Klenow Polymerase zu glatten Enden in die Schnittstelle eingefügt. An der dadurch neu generierten *XhoI* Schnittstelle wurde das Plasmid erneut gespalten, um dann die Oligonukleotidkassette HA-*XhoI* hineinzuligieren.

pcDNA3 hMunc-93 HA179

Größe: 6847

Zur Herstellung des Plasmids pcDNA3 hMunc-93 HA179 wurde zunächst mit dem Primerpaar Munc-93 FW *XbaI* und Munc93 G178NA179S *XhoI* (RV) bzw. Munc93 A179S *XhoI* (FW) und Munc-93 RV *EcoRI* je eine PCR an pIMAGE 415697 durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *XbaI/XhoI* bzw. *XhoI/EcoRI* behandelt und in den *XbaI/EcoRI* geschnittenen Vektor pSP72 ligiert. Nach dem Einfügen der Oligonukleotidkassette HA-*XhoI* in die auf diese Weise im hmunc-93 Gen generierte *XhoI*-Schnittstelle, wurde das Gen durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *HindIII* wieder isoliert und in den ebenso geschnittenen Vektor pcDNA3 umgesetzt.

pcDNA3 hMunc-93 HA247

Größe: 6859

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde die Oligonukleotidkassette NSS#6 in das mit *SalI* geschnittene und mit Klenow Polymerase und Nukleotiden behandelte Plasmid pcDNA3 hMunc-93 eingefügt. Anschließend wurde das Plasmid mit *XhoI* verdaut und die

Oligonukleotidkassette HA-*XhoI* in die neu generierte *XhoI* Schnittstelle im hmunc-93 Gen ligiert.

pcDNA3 hMunc-93 HA355

Größe: 6856

Zur Herstellung von pcDNA3 hMunc-93 HA355 wurde das Plasmid pcDNA3 hMunc-93 mit dem Restriktionsenzym BglII verdaut und die überstehenden Enden durch Inkubation mit Klenow Polymerase zu glatten Enden abgedaut. In das linearisierte Plasmid wurde die Oligonukleotidkassette #NSS1 eingefügt. Anschließend wurde die Oligonukleotidkassette HA-*XhoI* in die auf diese Weise generierte *XhoI* Schnittstelle im hmunc-93 Gen eingesetzt.

pcDNA3 hMunc-93 HA422

Größe: 6862

Nach einem Partialverdau des Plasmids pcDNA3 hMunc-93 mit *NcoI* wurden die überhängenden Enden durch den Einsatz von Klenow Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt und dann die Oligonukleotidkassette NSS#4 in die Schnittstelle am 3'-Ende der kodierenden Sequenz von hmunc-93 eingesetzt. Das Plasmid wurde anschließend mit *XhoI* geschnitten und die Oligonukleotidkassette HA-*XhoI* in die neu generierte *XhoI*-Schnittstelle ligiert.

pEGFP-C3

Größe: 4728 bp

pEGFP-C3 (Clontech) kodiert eine rotverschobene Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mit verstärkter Fluoreszenzintensität. Gene, die in den Polylinker von pEGFP-C3 kloniert werden, stehen unter der Kontrolle des CMV Promotors und werden als Fusionsproteine mit N-terminalem EGFP exprimiert. Das Plasmid enthält ein Kanamycinresistenzgen für die Selektion in Bakterienzellen. Stabil transfizierte eukaryotische Zellen zeichnen sich durch eine plasmidvermittelte Resistenz gegen G418 aus.

pEGFP-C3 hMunc-93

Größe: 6088 bp

Für die Herstellung von pEGFP-C3 hMunc-93 wurde mit den Primern Munc-93 (2) FW und Munc-93 RV *EcoRI* eine PCR am Plasmid pIMAGE 415697 durchgeführt. Nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *XhoI* wurde das erhaltene hMunc-93 Gen in den ebenso geschnittenen Vektor pEGFP-C3 kloniert.

pEGFP-N1

Größe: 4734 bp

pEGFP-N1 (Clontech) kodiert eine rotverschobene Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) mit verstärkter Fluoreszenzintensität. Gene, die in den Polylinker von pEGFP-N1 kloniert werden, stehen unter der Kontrolle des CMV Promotors und werden als

Fusionsproteine mit C-terminalem EGFP exprimiert. Das Plasmid enthält ein Kanamycinresistenzgen für die Selektion in Bakterienzellen. Stabil transfizierte eukaryotische Zellen zeichnen sich durch eine plasmidvermittelte Resistenz gegen G418 aus.

phMunc-93 EGFP-N1

Größe: 6103 bp

Für die Herstellung von phMunc-93 EGFP-N1 wurde das hMunc-93 Gen mit dem Primerpaar Munc-93 FW XbaI und Munc-93 RV HindIII aus dem Plasmid pIMAGE 415697 isoliert und nach einem Restriktionsverdau mit den Enzymen XbaI und HindIII in den NheI/HindIII geschnittenen Vektor N1 kloniert

pSP72:

Größe: 2464 bp

pSP72 (Promega) ist ein Standardklonierungsvektor, der sich auch für *in vitro* Transkriptionen eignet. RNA kann von einem Strang als Matrize durch die SP6 RNA-Polymerase, vom anderen durch die T7 RNA-Polymerase synthetisiert werden. Zur Selektion von transformierten Bakterien besitzt das Plasmid das β -Lactamasegen Amp^r.

pSP72 hMunc-93

Größe: 3834 bp

Das hmunc-93 Gen wurde durch eine PCR mit den Primern Munc-93 FW XbaI und Munc-93 RV EcoRI aus dem Plasmid pIMAGE 415697 isoliert; mit den Restriktionsenzymen XbaI und EcoRI behandelt und in den mit den gleichen Enzymen linearisierten Vektor pSP72 ligiert.

pSP72 MAGI3

Größe: 2832 bp

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde der Vektor pSP72 mit *AccI* geschnitten, die überstehenden Enden mit Mung Bean Nuklease zu glatten Enden abgedaut und der linearisierte Vektor anschließend mit *EcoRI* behandelt. Ein Fragment des MAGI3 Gens, das die Aminosäure 737 – 861 kodiert, wurde durch Restriktionsverdau mit den Enzymen *SmaI* und *EcoRI* aus dem Plasmid pVP16 MAGI3 isoliert und in den vorbereiteten Vektor pSP72 ligiert.

pGEX-KG:

Größe: 5006 bp

Das Plasmid für die bakterielle Expression basiert auf dem Vektor pGEX-2T (Pharmacia Biotech), dessen Polylinkerregion um 58 bp erweitert wurde (Guan und Dixon, 1991).

Gene, die in dieses Plasmid hineinkloniert werden, werden als Fusionsproteine exprimiert, die am N-Terminus die Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* tragen.

Glutathion S-Transferase ermöglicht eine schnelle Aufreinigung der Proteine über eine Affinitäts-Chromatographiesäule aus Glutathionsepharose. Zwischen der Glutathion S-Transferase und dem fusionierten Protein befinden sich eine Thrombinspaltstelle und eine glycinreiche Aminosäuresequenz. Letztere sorgt dafür, daß sich die beiden Proteine des Fusionsproteins unabhängig voneinander falten können. Durch Thrombinspaltung kann das rekombinante Protein nach der Aufreinigung freigesetzt werden. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und des *lacI^q*-Gens, das für einen mutierten *lac*-Repressor codiert. Dadurch wird eine gezielte Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG zum Medium möglich. Als Selektionsmarker verfügt pGEX-KG über das β -Lactamasegen Amp^r.

pGEX-KG Munc-93

Größe: 5036 bp

Für die Herstellung von pGEX-KG Munc-93 wurde eine Oligonukleotidkassette bestehend aus GST-Munc-93 FW und GST-Munc-93 RV in den mit *EcoRI* und *XhoI* geschnittenen Vektor pGEX-KG ligiert.

pGEX-5X-1

Größe: 4970 bp

Gene, die in dieses Plasmid hineinkloniert werden, werden als Fusionsproteine exprimiert, die am N-Terminus die Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* tragen. Zwischen der Glutathion S-Transferase und dem fusionierten Protein befinden sich eine Faktor Xa Erkennungssequenz, so daß das rekombinante Protein nach der Aufreinigung vom GST-Fusionsteil abgespalten werden kann. Die Expression des Fusionsproteins steht unter der Kontrolle des *tac*-Promotors und des *lacI^q*-Gens, das für einen mutierten *lac*-Repressor codiert. Dadurch wird eine gezielte Induktion der Expression durch Zugabe von IPTG zum Medium möglich. Als Selektionsmarker verfügt pGEX-5X-1 über das β -Lactamasegen Amp^r.

pGEX-5X-1 MAGI3

Größe: 5384 bp

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde ein Fragment des MAGI3 Gens, das für die Aminosäuren 737 – 861 kodiert, durch einen NotI-Schnitt aus dem Plasmid pVP16 MAGI3 isoliert und in den ebenso behandelten Vektor pGEX-5X-1 ligiert.

pGEX-5X-1 mMunc-93(345-392)

Größe: 5120 bp

Bei der Konstruktion von pGEX-5X-1 mMunc-93(345-392) wurde das mMunc-93(345-392) Insert durch einen *EcoRI/SalI* Schnitt aus dem Plasmid pBTM116 mMunc-93(345-392) isoliert und in den *EcoRI/XhoI* geschnittenen Vektor pGEX-5X-1 ligiert.

pVP16:

Größe: 7500 bp

Gene, die in dieses Plasmid hineinkloniert werden, werden als Fusionsproteine mit N-terminaler VP16 Promotoraktivierungsdomäne und Kernlokalisierungssequenz exprimiert. Zur selektiven Amplifikation in *E. coli* trägt das Plasmid das β -Lactamasegen. Für die Selektion von rekombinanten Hefezellen enthält das Plasmid das Gen für β -Isopropyl-Malatdehydrogenase (LEU2), so daß es die Leucinauxotrophie eines leu2-3, 112 mutierten Hefestammes komplementieren kann. Das Plasmid wurde dem Labor freundlicherweise von Dr. S. Fields (University of Washington, Seattle, USA) zur Verfügung gestellt (Bartel and Fields, 1995).

pVP16 MAGI3

Das Plasmid pVP16 MAGI3 enthält ein Fragment des MAGI3 Gens, das die Aminosäuren 737 – 861 von MAGI3 kodiert. Es ist in die *NotI* Schnittstellen des Vektors pVP16 kloniert worden. Das Plasmid stammt aus einer Mausembryo cDNA Bibliothek, die von Dr. S. Hollenberg (Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, USA) hergestellt worden ist und dem Labor freundlicher Weise von Dr. M. Funk zur Verfügung gestellt wurde.

pBTM116:

Das Plasmid pBM116 wird im Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendet, um Köderproteine mit N-terminaler LexA-Bindedomäne zu exprimieren. Die Selektion plasmidtragender Bakterienzellen geschieht über das Ampicillinresistenzgen Amp^r , in Hefezellen über die Komplementierung einer Tryptophanauxotrophie. Das Plasmid wurde dem Labor freundlicherweise von Dr. S. Fields (University of Washington, Seattle, USA) zur Verfügung gestellt (Bartel and Fields, 1995).

pBTM116 mMunc-93(228-284)

Das Plasmid pBTM116 mMunc-93(228-284) enthält ein Fragment aus mMunc-93, das für die Aminosäuren 228 – 284 kodiert. Gewonnen wurde es durch eine PCR an pIMAGE 415697 mit den Primern m Munc 93 FW (225-231) und m Munc 93 RV (284-278). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pBTM116 ligiert.

pBTM116 mMunc-93(345-392)

Das Plasmid pBTM116 mMunc-93(345-392) enthält ein Fragment aus mMunc-93, das für die Aminosäuren 345 – 392 kodiert. Gewonnen wurde es durch eine PCR an pIMAGE 415697 mit den Primern m Munc 93 FW (345-350) und m Munc 93 RV (392-387). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pBTM116 ligiert.

pBTM116 mMunc-93(431-459)

Das Plasmid pBTM116 mMunc-93(431-459) enthält ein Fragment aus mMunc-93, das für die Aminosäuren 431 – 459 kodiert. Gewonnen wurde es durch eine PCR an pIMAGE 415697 mit den Primern m Munc 93 FW (431-436) und m Munc 93 RV (458-452). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pBTM116 ligiert.

2.11 weitere Materialien

Deckgläschen rund, Ø 12 mm	Assistent
Elektroporationsküvetten, 2 mm	Eurogentec
Nitrocellulosemembran Protran BA83 Ø 2 µm	Schleicher & Schuell
Objektträger, 76 x 26 mm, Mattrand	Omnilab
MTN Northernblots	Clontech
Zellhomogenisator, 1 ml Fassungsvermögen	Braun
Whatman-3MM Papier	Whatman
Röntgenfilm Biomax II	Kodak

2.12 Firmen

Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ambion	Austin, USA
American Type Culture Collection	Middlesex, England
Amersham Pharmacia Biotech	Braunschweig, Deutschland
Assistent	Deutschland
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Bibco BRL	Eggenheim, Deutschland
Biometra	Göttingen, Deutschland
Biorad	Richmond, USA
Branson	Danbury, USA
Braun	Melsungen, Deutschland
Clontech	Palo Alto, USA
Dianova	Hamburg, Deutschland
Difco Laboratories	Detroit, USA
Enzogenetics	Corvallis, USA
Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eurogentec	Seraing, Belgien
Fluka	Neu-Ulm, Deutschland
FMC BioProducts	Vallensbaek Dänemark
Intas	Göttingen Deutschland
J. T. Baker	Deventer, Holland
MBI Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Merck	Darmstadt, Deutschland
New England Biolabs	Beverly, USA
Omnilab	Gehrden Deutschland
Perkin Elmer	Weiterstadt, Deutschland

Promega	Madison, USA
QBIogene	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Riedel-DeHaën	Seelze, Deutschland
Roche Diagnostics	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, USA
Savant	Frankfurt, Deutschland
Schleicher & Schuell	Dassel, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Sigma	München, Deutschland
Sorvall Instruments	Bad Homburg, Deutschland
Stratagene	La Jolla, USA
USB	Braunschweig, Deutschland
Whatman	Maidstone, England

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit DNA

3.1.1 Restriktionsspaltung

Restriktionsenzyme hydrolysieren die Bindung zwischen Phosphatgruppe und Desoxyribose im Zuckerphosphatrückgrad beider Stränge eines DNA-Doppelstranges. Die Spaltprodukte tragen an den 5'-Enden eine Phosphatgruppe, an den 3'-Enden eine Hydroxylgruppe.

In der Gentechnologie werden am häufigsten Typ II-Endonukleasen verwendet. Diese schneiden die DNA innerhalb einer für das Enzym charakteristischen Erkennungssequenz aus 4 – 6 Basenpaaren. Sie erzeugen dabei glatte bzw. 3'- oder 5'-überhängende Enden.

Die Verwendung von Restriktionsenzymen dient verschiedenen Zwecken. Mit ihrer Hilfe können DNA-Fragmente schnell aus Plasmiden herausgeschnitten werden, um sie in andere Vektoren einzufügen. Außerdem können erfolgreiche Subklonierungen dieser Art anhand des Spaltmusters bestimmter Restriktionsenzyme identifiziert werden.

Ein typischer analytischer Restriktionsansatz hat folgende Zusammensetzung:

5	µl	Plasmid-DNA (etwa 0,5 µg)
1,2	µl	10 x NE-Puffer
0,3	µl	Restriktionsenzym (5 – 10 Units)
<u>5,5</u>	<u>µl</u>	<u>dH₂O</u>
12	µl	

Der Ansatz wird 2 h bei der für das verwendete Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Je nach verwendetem Restriktionsenzym sind unterschiedliche Pufferbedingungen für eine optimale Enzymaktivität notwendig. Die Wahl des in die Reaktion eingesetzten NE-Puffers (1 – 4) hängt vom verwendeten Enzym ab. Wenn bei Restriktionsspaltungen mehrere Enzyme verwendet werden, die jeweils unterschiedliche Puffer benötigen, werden die Reaktionen nacheinander durchgeführt. Die Pufferbedingungen für die zweite Reaktion werden dann durch Zusatz weiterer Puffer eingestellt.

Ein präparativer Restriktionsansatz wird analog, aber im größeren Maßstab (2 µg DNA) durchgeführt. Außerdem erfolgt hierbei häufig nach der Hälfte der Inkubationszeit eine erneute Zugabe von Restriktionsenzym, da die Enzyme im Laufe der Zeit an Aktivität verlieren.

Zusätzlich zu den beiden für eine angestrebte Ligationsreaktion zwischen Vektor und Insert notwendigen Enzymen kann der Vektor mit einem dritten gespalten werden, dessen Erkennungssequenz zwischen denen der Klonierungsenzyme liegt. Eine solche Behandlung verringert die Gefahr der Religation des Vektors nach einem unvollständigen Restriktionsschnitt. Eine Dephosphorylierung des Vektors (Kap. 3.1.3) ist dann nicht mehr unbedingt notwendig.

NE-Puffer 1 (10 x)

100 mM Tris/HCl, pH 7,0
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

NE-Puffer 2 (10 x)

100 mM Tris/HCl, pH 7,9
500 mM NaCl
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

NE-Puffer 3 (10 x)

500 mM Tris/HCl, pH 7,9
1 M NaCl
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

NE-Puffer 4 (10 x)

200 mM Tris/Acetat, pH 7,9
500 mM Kaliumacetat
100 mM MgCl₂
10 mM DTT

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR-Technik (Saiki et al., 1988) kann DNA durch eine thermostabile DNA-Polymerase *in vitro* spezifisch amplifiziert und/oder gezielt verändert werden. An hitzedenaturierte DNA werden bei niedriger Temperatur zwei Oligonukleotide (Primer) gebunden (Annealing), die komplementär zu den 3'-Enden des Zielsegmentes sind, und bei mittlerer Temperatur in Anwesenheit von Desoxynukleotiden verlängert. Diese Abfolge aus Denaturierung, Oligonukleotidbindung und Polymerisation wird als ein Zyklus betrachtet. Die mehrfache Wiederholung vervielfältigt das gewünschte DNA-Segment.

Ein typischer Reaktionsansatz besteht aus:

1 µl Template-DNA (10 ng)
5 µl 10x DNA-Polymerasepuffer
1 µl dNTP-Mix
1 µl Primer 1 (25 pmol/µl)
1 µl Primer 2 (25 pmol/µl)
1 µl Pfu-DNA-Polymerase (3 Units)

40 µl dH₂O

50 µl

Die Reaktion läuft unter folgenden Bedingungen ab:

Denaturierung 1 min 95 °C

Annealing 2 min 55 °C

Verlängerung 2 min 72 °C

Das Programm wird 30 mal durchlaufen, wobei die Zeiten und Annealingtemperaturen für die jeweils zu erstellenden Fragmente optimiert werden müssen. Die erhaltenen Produkte werden in einem Agarosegel aufgetrennt und können dann wie im Kap. 3.1.5 beschrieben, gereinigt werden.

DNA-Polymerasepuffer (10x)

200 mM Tris/HCl pH 8,8
100 mM KCl
100 mM (NH ₄)SO ₄
20 mM MgSO ₄
0,1 % BSA
1 % TritonX-100

dNTP-Mix

10 mM dATP
10 mM dCTP
10 mM dGTP
10 mM dTTP

3.1.3 Dephosphorylierung des Vektors

Um Genfragmente mit hoher Effizienz in geeignete Plasmid-Vektoren zu klonieren (Kap. 3.1.6), muß eine Religation des Vektors ohne Insertion verhindert werden. Zu diesem Zweck behandelt man Vektor-DNA, besonders nach Linearisierung mit nur einem Restriktionsenzym oder solchen Nukleasen, die glatte Enden erzeugen, mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm. Diese entfernt die terminalen 5'-Phosphatgruppen des linearen Vektors und unterbindet dadurch eine Rezirkularisierung des Vektors.

Durchführung der Dephosphorylierung:

16,0 µl	DNA-Lösung (ca. 2 µg DNA)
2,0 µl	10 x Dephosphorylierungspuffer
1,0 µl	alkalische Phosphatase (0,1 U/µl)
<hr/>	
19,0 µl	

Der Reaktionsansatz wird 60 min bei 37 °C inkubiert, wobei nach 30 min noch einmal die gleiche Enzymmenge zugegeben wird. Danach wird das Enzym inaktiviert, indem eine EDTA-Konzentration von 2,5 mM eingestellt und die Probe 15 min lang auf 68 °C erwärmt wird. Durch diese Behandlung werden Zn²⁺-Ionen des Enzyms, die für die Stabilität der Untereinheiten und seine katalytische Aktivität notwendig sind, chelatisiert.

Die dephosphorylierte DNA kann dann an eine Silicamatrix (Qiagen) gebunden und vom denaturierten Enzym gereinigt werden.

10 x Dephosphorylierungspuffer

500 mM Tris/HCl, pH 8,5 (bei 20 °C)
1 mM EDTA

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Identifizierung, Trennung und Reinigung von DNA-Fragmenten verwendet. Beim Anlegen einer Spannung wandert DNA aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Die Mobilität der Nukleinsäuren hängt dabei von ihrer Molekülgröße und der Dichte der Gelmatrix ab. Mit Hilfe eines Standards läßt sich die Molekülgröße von DNA-Fragmenten aus der Laufstrecke bestimmen.

Zur Herstellung eines Agarosegels wird eine gewählte Menge Agarose durch kurzes Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wird die Lösung mit 1 µg Ethidiumbromid pro 20 ml versetzt und in ein horizontales Gelbett (Eigenbau bzw. Easy Cast Electrophoresis System) gegossen. Nach dem Erstarren wird das Gel mit TAE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben werden mit einem Sechstel ihres Volumens an Auftragspuffer für Agarosegele versetzt und die Elektrophorese für 45 bis 60 min bei 80 V (Power Pac 3000, Biorad) durchgeführt. Währenddessen interkaliert das Ethidiumbromid in die DNA und macht so die DNA-Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) sichtbar. Die Aufzeichnung erfolgt mit dem Photodokumentationssystem Digit Store Duo der Firma Intas.

TAE-Laufpuffer

40 mM Tris
0,11 % (v/v) Essigsäure
1 mM EDTA, pH 8,0

Auftragspuffer für Agarosegele

0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylen Cyanol FF
30 % (w/v) Glycerin

3.1.5 Reinigung von DNA

3.1.5.1 Reinigung der Spaltprodukte nach einem Restriktionsschnitt

Zur Isolation von Spaltprodukten nach einem Restriktionsschnitt (Kap. 3.1.1) werden die DNA-Fragmente zunächst in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Kap. 3.1.4) und dann aus diesem mit Hilfe des *QIAquick-Gel-Extraction Kits* (Qiagen) wiedergewonnen. Das Trennverfahren beruht auf der selektiven Bindung von DNA an eine Silicamatrix bei hoher Salzkonzentration. Die Durchführung basiert weitestgehend auf dem von Qiagen mitgelieferten Extraktionsprotokoll.

Die Banden der DNA-Fragmente werden unter einer UV-Lampe (366 nm, Roth) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die erhaltenen Gelstücke werden mit dem Dreifachen ihres Volumens an Puffer QG (100 µg ≈ 100 µl) versetzt und 10 min lang unter wiederholtem Mischen auf 50 °C erwärmt. Das chaotrope Salz NaClO₄, das im Puffer QG in hoher Konzentration enthalten ist, zerstört die Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den Zuckermolekülen im Agarosepolymer, so daß sich das Gel auflöst. Nach Zugabe eines Volumenteils an Isopropanol wird die Lösung auf eine Säule mit Silicamatrix aufgetragen. Begünstigt durch die hohe Elektrolytkonzentration, bindet die DNA an die Säule, während

Agarose, Proteine, Ethidiumbromid, Salze und weitere Verunreinigungen, die keine Nukleinsäuren sind, bei der anschließenden Zentrifugation (30 s, 14000 rpm, 5415 C, Eppendorf) im Durchfluß verbleiben. Die Säule wird einmal mit 500 µl Puffer QG gewaschen, um Agarosereste zu entfernen, und zweimal mit je 750 µl des ethanolhaltigen PE-Puffers, um die DNA von noch vorhandenen Salzen zu befreien. Nach dem vollständigen Entfernen des PE-Puffers wird die gereinigte DNA mit 50 µl 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0, eluiert.

Puffer QG

NaClO₄-haltiger Solubilisierungspuffer mit pH-Indikator (Qiagen)

PE-Puffer

ethanolhaltiger Waschpuffer mit moderater Salzkonzentration (Qiagen)

3.1.5.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Dabei macht man sich zunutze, daß Phenol Proteine denaturiert, während es mit Nukleinsäuren nicht interagiert. Da sich Phenol viel besser in Chloroform löst als in Wasser, wird durch eine gleichzeitige Extraktion mit Phenol und Chloroform verhindert, daß Phenolreste in der wäßrigen Phase, die die DNA enthält, zurückbleiben und nachfolgende Reaktionen stören.

Die von Proteinen zu befreiende DNA-Lösung wird mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Gemisches versetzt und geschüttelt, bis eine Emulsion entstanden ist. Zur Phasentrennung wird 2 min in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase wird in ein neues Gefäß überführt und die DNA aus dieser durch Ethanolfällung (Kap. 3.1.5.3) isoliert. Die meisten denaturierten Proteine verbleiben an der Grenzfläche zwischen der wäßrigen und der Phenol-Chloroform-Phase und bilden dort eine sogenannte Interphase aus.

Phenol-Chloroform-Gemisch

50 % (v/v) Phenol

50 % (v/v) wassergesättigtes Chloroform

3.1.5.3 Ethanolpräzipitation von DNA

Eine Fällung von DNA mit Ethanol wird eingesetzt, um die DNA zu konzentrieren oder niedermolekulare Bestandteile zu entfernen.

Eine DNA-Lösung wird mit einem Zehntel ihres Volumens an 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,2) und dem 2,5-fachen ihres Volumens an absolutem Ethanol versetzt. Die Probe wird gemischt und 30 min bei -80 °C inkubiert. Anschließend wird die gefällte DNA 10 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wird

abgesaugt und die DNA einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Nach dem Trocknen des Pellets bei 37 °C wird die DNA im gewünschten Volumen an dH₂O gelöst.

3.1.6 Ligation

T4-DNA-Ligase kann DNA-Fragmente, die durch Restriktionsspaltung entstanden sind, wieder miteinander verknüpfen, wenn die Enden der linearen DNA glatt oder komplementär vorliegen. Das Enzym katalysiert dabei die Veresterung eines 5'-Phosphorsäureesters mit einer 3'-Hydroxylgruppe. Wurde der Vektor zuvor mit alkalischer Phosphatase am 5'-Ende dephosphoryliert, so besitzt das aus Vektor und Insert rekombinierte DNA-Molekül in beiden Strängen je einen Einzelstrangbruch, an dem eine 3'-Hydroxylgruppe des Inserts auf eine 5'-Hydroxylgruppe des Vektors trifft. Dennoch ist das DNA-Molekül stabil genug für eine Transformation in eine Bakterienzelle, in der Reparaturenzyme des Wirtes den Einzelstrangbruch beheben.

In einen Ligationsansatz werden etwa 20 ng Vektor-DNA eingesetzt und soviel Insert-DNA, daß sich ein molares Vektor-Insert-Verhältnis von 1:3 ergibt. Das Gemisch aus Vektor und Insert wird mit 1 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase (1:2 mit dH₂O verdünnt) versetzt. Anschließend wird der Ansatz mit dH₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und mindestens 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Parallel zu jeder Ligationsreaktion wird ein Kontrollansatz mitgeführt, der zwar Vektor und T4-DNA-Ligase enthält, aber keine Insert-DNA. Die Transformation dieses Kontrollansatzes ergibt die Anzahl an Kolonien, die auf eine Selbstligation des Vektors zurückzuführen sind.

Ligationspuffer (10 x)

- 500 mM Tris/HCl, pH 7,8
- 100 mM MgCl₂
- 100 mM DTT
- 10 mM ATP
- 25 % (w/v) BSA

3.1.7 Transformation

Weder das gramnegative Bakterium *E. coli* noch die Hefe *S. cerevisiae* sind dazu in der Lage, Fremd-DNA von außen mit ausreichender Effizienz aufzunehmen. Deshalb wird ihre Zellwand durch Behandlung mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an zweiwertigen Metallkationen destabilisiert und damit die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Plasmid-DNA gesteigert; die Zellen werden kompetent gemacht. Die Effizienz einer Transformation kann durch einen Hitzeschock oder einen kurzen starken Stromstoß erhöht werden.

3.1.7.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für eine Transformation durch Hitzeschock

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgt nach der Methode von Dagert und Ehrlich (1979). 20 ml 2YT-Medium werden mit 200 µl einer Übernachtskultur eines geeigneten *E. coli*-Stammes angeimpft und 2 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend werden die Zellen 10 min bei 4 °C und 2500 rpm abzentrifugiert (5403, Eppendorf), in 20 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und 2 h im Eis inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation (1200 rpm, 4 °C) wird das Bakteriensediment in 2 ml 0,1 M CaCl₂ aufgenommen. Nach weiteren 2 h auf Eis sind die Bakterien kompetent und können 48 h lang für eine Transformation verwendet werden.

2YT-Medium (1l)

16 g Pepton

10 g Hefeextrakt

5 g Natriumchlorid

autoklaviert

3.1.7.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Eine DNA-Lösung, z. B. ein Ligationsansatz mit etwa 20 ng Vektor-DNA oder 7-10 ng ringförmige Plasmid-DNA, wird mit 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt und 30 min auf Eis stengelassen. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock (5 min, 37 °C), nach dem die Bakterien 10 min lang auf Eis abgekühlt werden. Nach Zugabe von 300 µl 2YT-Medium wird der Ansatz 30 min bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. In dieser Zeit können die transformierten Bakterien die auf dem transformierten Plasmid kodierte Antibiotikaresistenz ausbilden, bevor sie auf einer 2YT-Agarplatte ausplattiert werden, die das für die Selektion notwendige Antibiotikum enthält. Die transformierten Zellen wachsen bei 37 °C im Wärmeschrank über Nacht zu Kolonien heran.

2YT-Agarplatten (1l)

16 g Pepton

10 g Hefeextrakt

5 g Natriumchlorid

15 g Bacto Agar

autoklaviert

3.1.7.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen

10 ml einer dicht gewachsenen Übernachtskultur mit HB101 Bakterienzellen werden in 1 l LB-Medium überführt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,55 inkubiert. Anschließend werden die Zellen 30 min auf Eis abgekühlt und 15 min bei 4 °C und 5000 rpm

(GSA-Rotor, RC-5C, Sorvall Instruments) abzentrifugiert. Das Pellet wird je einmal mit 1 l, 0,5 l und 20 ml eiskalter 10 %iger (w/v) Glycerinlösung gewaschen, um die Ionenstärke möglichst gering zu halten, und schließlich in 2 ml derselben Lösung aufgenommen. Die auf diese Weise erhaltenen elektrokompetenten Zellen können entweder sofort verwendet oder bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

LB-Medium (1l)

- 10 g Pepton
- 5 g Hefeextrakt
- 10 g NaCl

autoklaviert

3.1.7.4 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Mit dem Verfahren der Elektroporation zur Transformation von Bakterienzellen (Dower et al., 1988; Taketo, 1988) läßt sich eine höhere Transformationseffizienz erzielen als durch einen Hitzeschock. Die Elektroporation ist deshalb für die Transformation von *E. coli* mit DNA, die aus Hefezellen präpariert wurde, die Methode der Wahl.

1 – 2 ng Plasmid-DNA werden mit 100 μl elektrokompetenten HB101 gemischt und in eisgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Nach einem Stromstoß (2500 V, 25 μF , 200 Ω) werden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 10 min auf Eis stengelassen. Nach weiteren 60 min Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 180 rpm werden sie mit 1 ml M9-Medium gewaschen und auf M9-Platten ausgestrichen. Diese Platten ermöglichen das selektive Wachstum von Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, das eine bestimmte Aminosäure-Auxotrophie des Bakterienstammes komplementiert. Sollen die Bakterienzellen auf einer 2YT-Agarplatte ausgestrichen werden, die ein für die Selektion notwendiges Antibiotikum enthält, so entfällt der Waschschrift.

M9-Medium

- 12,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 3 g KH_2PO_4
- 0,5 g NaCl
- 1 g NH_4Cl
- in 800 ml dH_2O autoklaviert
- 20 g $\alpha\text{-D(+)-Glucose}$
- in 200 ml dH_2O autoklaviert
- anschließend vereint

SOC-Medium

- 20 g Bacto Pepton
- 5 g Bacto-Hefeextrakt
- 5 g NaCl
- in 800 ml dH_2O autoklaviert
- 20 g $\alpha\text{-D(+)-Glucose}$
- in 200 ml dH_2O autoklaviert
- anschließend vereint

M9- Platten

12,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3 g KH_2PO_4
0,5 g NaCl
1 g NH_4Cl

in 800 ml dH_2O autoklaviert

20 g $\alpha\text{-D(+)-Glucose}$
15 g Bacto Agar

in 200 ml dH_2O autoklaviert

anschließend vereint

Zusatz von Aminosäuren möglich

2YT-Agarplatten: siehe Kap. 3.1.7.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

3.1.7.5 Herstellung kompetenter Hefezellen

5 ml einer YPD-Übernachtskultur von *S. cerevisiae* werden in 50 ml YPD-Medium überführt und weitere 5 h bei 30 °C geschüttelt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 3500 rpm (5403, Eppendorf) wird das Hefepellet in 20 ml autoklaviertem dH_2O resuspendiert und erneut 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert (5403, Eppendorf). Je nach Pelletgröße werden die Zellen in 0,5 – 1 ml TE/LiOAc-Puffer aufgenommen und können nach 1 h bei Raumtemperatur zur Transformation verwendet werden.

YPD-Medium (1l)

20 g Bacto Pepton
10 g Bacto-Hefeextrakt
in 800 ml dH_2O autoklaviert
20 g $\alpha\text{-D(+)-Glucose}$
in 200 ml dH_2O autoklaviert
anschließend vereint

TE/LiOAc-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA, pH 7,5
0,1 M Lithiumacetat

3.1.7.6 Transformation von Hefen**3.1.7.6.1 Durchführung der Transformation**

1 μg Plasmid-DNA, 100 μg Einzelstrang-DNA (Kap. 3.1.7.6.2) und 100 μl kompetente Hefezellen werden mit 700 μl eines polyethylenglycolhaltigen TE/LiOAc-Puffers vermischt und 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 88 μl DMSO wird für 15 min bei 42 °C ein Hitzeschock durchgeführt. Der Transformationsansatz wird dann 3 min bei 3500 rpm zentrifugiert (5415 C, Eppendorf), das Hefepellet mit 1 ml autoklaviertem dH_2O gewaschen, um das Polyethylenglycol zu entfernen, und in 100 μl autoklaviertem dH_2O resuspendiert.

Diese Zellsuspension wird auf SD-Platten ausgestrichen, deren Zusätze ein selektives Wachstum von transformierten Zellen ermöglichen, und bis zur Ausbildung von Kolonien bei 30 °C gelagert.

polyethylenglycolhaltiger TE/LiOAc-Puffer: SD-Medium (11)

10 mM Tris/HCl, pH 7,5	1,7 g Yeast Nitrogen Base
1 mM EDTA, pH 7,5	4 g Ammoniumsulfat
0,1 M Lithiumacetat	in 100 ml dH ₂ O autoklaviert
40 % (w/v) Polyethylenglycol 4000	20 g Glucose
	in 900 ml dH ₂ O autoklaviert
	anschließend vereinigt

3.1.7.6.2 Herstellung von Einzelstrang-DNA

Um die Effizienz bei der Transformation von Plasmid-DNA in intakte Hefezellen zu steigern, verwendet man Einzelstrang-DNA als Träger (Schiestl and Gietz, 1989).

DNA aus Lachshoden wird in TE-Puffer in einer Konzentration von 10 mg/ml durch Pipettieren gelöst und über Nacht bei 4 °C stehengelassen, damit sich eine homogene viskose Lösung bildet. Danach wird die DNA zweimal 30 s Ultraschall ausgesetzt. Dadurch sollen Nukleinsäurefragmente mit einer mittleren Größe von 7 kb entstehen, was mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.1.4) kontrolliert wird. Liegt die mittlere Größe der DNA unterhalb von 2 kb, so wird die Transformationseffizienz stark reduziert. Nach der Ultraschallbehandlung wird die DNA-Lösung einmal mit Phenol extrahiert, danach mit einem 1 : 1-Gemisch aus Phenol und Chloroform und schließlich mit Chloroform (vgl. Kap. 3.1.5.2). Für diese Extraktion wird Phenol verwendet, das mit TE-Puffer gesättigt ist. Es folgt eine Ethanol-fällung der DNA (Kap. 3.1.5.3), nach der sie wieder in einer Konzentration von 10 mg/ml in TE-Puffer gelöst wird. Die DNA wird dann 20 min im Wasserbad gekocht, um sie zu Einzelsträngen zu denaturieren, und im Eisbad abgeschreckt, um ein Renaturieren der Einzelstränge zu Doppelsträngen zu verhindern. Die auf diese Weise präparierte DNA wird bei -20 °C gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren reduziert die Transformationseffizienz kaum.

TE-Puffer

10 mM 7,5 Tris/HCl, pH 7,5
1 mM EDTA, pH

3.1.7.7 Aufbewahrung transformierter Klone

3.1.7.7.1 Anlegen von *E. coli* Glycerinkulturen

Für die Herstellung von *E. coli* Glycerinkulturen, werden zunächst 2 ml 2YT-Medium mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag werden 800 µl dieser Kultur mit 800 µl 87 %igem Glycerin gemischt und bei –80 °C eingefroren.

3.1.7.7.2 Anlegen von Glycerinkulturen von *S. cerevisiae*

Eine 5 ml Flüssigkultur wird mit einer Einzelzellkolonie von *S. cerevisiae* angeimpft und so lange bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, bis die Kultur die logarithmische Wachstumsphase erreicht hat. Danach werden die Hefen abzentrifugiert, in 1,6 ml frischem Medium resuspendiert und mit dem gleichen Volumen an 87 %igem Glycerin versetzt. Bei –80 °C können diese Glycerinkulturen mehrere Jahre gelagert werden.

3.1.8 Plasmid-Präparation

Die hier verwendeten Methoden zur Isolation von Plasmid-DNA, die eine Abwandlung des Protokolls von Birnboim und Doly (1979) darstellen, basieren auf den unterschiedlichen Eigenschaften von Plasmid- und chromosomaler DNA bei ihrer Denaturierung mit Natriumhydroxid und anschließender schneller Renaturierung. Beim raschen Absenken des pH-Wertes nach alkalischer Denaturierung renaturiert Plasmid-DNA und bleibt löslich, wohingegen chromosomale DNA an Zellwandbruchstücken und Proteinen haftet und mit diesen abzentrifugiert werden kann.

Die Säulen der Firma Qiagen, die für die Reinigung der DNA verwendet werden, besitzen entweder eine Silicamatrix, an die DNA bei hoher Salzkonzentration bindet (QIAprep Spin-Säulen bzw. QIAquick Gel Extraction Kit), oder es handelt sich um eine Anionenaustauschersäule, an die die DNA-Bindung bei niedriger Salzkonzentration und definiertem pH-Wert erfolgt (Midipräparation).

3.1.8.1 Plasmid-Mini-Präparation

Mit der Mini-Präparationsmethode lassen sich innerhalb kurzer Zeit kleine Mengen (etwa 5 µg pro ml Kultur) Plasmid-DNA aus Bakterien isolieren. Es wird das QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen verwendet.

2 ml antibiotikumhaltiges 2YT-Medium werden mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Rüttler inkubiert. Anschließend werden die Bakterienzellen 2 min bei 10000 rpm in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) pelettiert und in 250 µl RnaseA-haltigem Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen und die Denaturierung der DNA erfolgen durch Zugabe von 250 µl des NaOH- und SDS-haltigen Puffers P2. Nach dem Mischen wirkt dieser 5 min bei Raumtemperatur auf die Zellen ein und wird anschließend mit 350 µl Puffer N3 (pH 5,2) neutralisiert. Nach vorsichtigem Mischen werden Zelltrümmer und

SDS-Salze 10 min bei 14000 rpm pelletiert (5415 C, Eppendorf). Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird auf eine Spin-Säule aufgetragen und diese dann 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert (5415 C, Eppendorf). Während dieser Zeit bindet die DNA an die Matrix und kann zuerst mit 500 µl PB-Puffer und dann mit 750 µl des ethanolhaltigen Puffers PE gewaschen werden, der noch vorhandene Salze beseitigt. Um verbliebenes Ethanol zu entfernen, wird die Säule noch einmal 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, bevor die gereinigte DNA mit 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 eluiert wird.

Puffer P1:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
autoklaviert

Puffer P2:

200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS

Puffer PE: siehe Kap. 3.1.5.1 Reinigung der Spaltprodukte nach einem Restriktionsschnitt

Puffer N3 und PB: Die genauen Inhaltstoffe werden von der Firma Qiagen nicht genannt

2YT-Medium: siehe Kap. 3.1.7.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für eine Transformation durch Hitzeschock

3.1.8.2 Plasmid-Maxi-Präparation

Die Maxi-Präparationsmethode beinhaltet eine Plasmidreinigung über kommerzielle Anionenaustauschersäulen. Auch diese Extraktionsmethode basiert auf einer alkalischen, mit dem Einsatz von SDS gekoppelten Lyse der Zellen. Anschließend wird die Plasmid-DNA bei geringer Salzkonzentration und niedrigem pH-Wert an eine Anionenaustauschersäule gebunden. Bei mittlerer Salzkonzentration wird sie von Verunreinigungen befreit und bei hoher Salzkonzentration wieder eluiert. Mit dieser Methode kann man DNA-Ausbeuten von bis zu 4 µg pro ml Kultur erzielen.

Die Durchführung erfolgt in Anlehnung an das *Plasmid Handbook* von Qiagen (1995).

Von einer 2YT-Agarplatte mit Einzelzellkolonien oder aus einem Glycerolstock (Kap. 3.1.8.3) werden 250 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Rüttler inkubiert. Anschließend werden die Bakterien 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert (GSA-Rotor, RC-5C, Sorvall Instruments) und in 10 ml gekühltem Puffer P1 mit 100 µg/ml Rnase A resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 werden die Zellen lysiert und die DNA und Proteine denaturiert. Um die Plasmid-DNA zu renaturieren, wird das Gemisch nach 5 min bei Raumtemperatur mit 10 ml Puffer P3 neutralisiert. Der hohe Salzgehalt dieses Puffers bewirkt außerdem die Fällung von vorhandenem SDS. Das geschieht während einer 15minütigen Inkubation auf Eis und ist notwendig, weil SDS die spätere Bindung der DNA an die Anionenaustauschersäule verhindert würde. Das Präzipitat wird anschließend 15 min

bei 5000 rpm abzentrifugiert (GSA-Rotor, RC-5C, Sorvall Instruments) und der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, durch ein Filter auf die mit 10 ml Puffer QBT equilibrierte Säule (tip 500, Qiagen) überführt. Aufgrund der vorhandenen Salzkonzentration und des pH-Wertes kann nur Plasmid-DNA an die Säule binden, nicht aber die durch Rnase A degradierte RNA oder zelluläre Proteine.

Die Säule wird zweimal mit je 10 ml Waschpuffer QC behandelt, wodurch neben RNA- und Proteinresten auch Rnase A und nukleinsäurebindende Proteine entfernt werden. Außerdem enthält der Puffer QC 15 % Ethanol, das unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen verringert und so die Reinheit der Plasmid-DNA weiter erhöht.

Eluiert wird die Plasmid-DNA mit dreimal 1,2 ml Puffer QF in Eppendorfgefäße mit 2 ml Fassungsvermögen. Die DNA wird mit 840 µl Isopropanol pro Gefäß gefällt und 30 min bei 14000 rpm (Ultrazentrifuge L8-70M, Eppendorf) und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit je 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und 5 – 10 min bei 37 °C getrocknet, bevor die DNA in insgesamt 500 µl dH₂O gelöst wird.

Puffer QBT

0,75 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % (v/v) Ethanol
0,15 % (w/v) Triton X-100
sterilfiltriert

Waschpuffer QC

1 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15 % (v/v) Ethanol
sterilfiltriert

Puffer QF

1,25 M NaCl
50 mM Tris/HCl, pH 8,5
15 % (v/v) Ethanol

Puffer P1 und P2: siehe Kap. 3.1.8.1 Plasmid-Mini-Präparation

2YT-Agarplatten: siehe Kap. 3.1.7.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

LB-Medium: siehe Kap. 3.1.7.3 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

3.1.8.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus Hefezellen

In Hefezellen liegt die Plasmid-DNA nur in geringer Kopienzahl vor. Es können deshalb nur kleine Mengen an DNA isoliert werden, die aber ausreichen, um sie per Elektroporation in Bakterien zu transformieren und dort zu amplifizieren.

5 ml Selektionsmedium werden mit einer Einzelzellkolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Rüttler inkubiert. Anschließend werden die Zellen 5 min in einer Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) pelletiert und in 20 µl Oxalyticaselösung resuspendiert. Während einer 30 minütigen Inkubation bei 30 °C werden β -1,3-Glukane in der Zellwand der Hefen

proteolytisch gespalten (Schott and Schekman, 1980), so daß es jetzt möglich wird, die Zellen zu lysieren und die Plasmid-DNA freizusetzen. Dazu werden 250 µl Puffer P1 und 250 µl Puffer P2 zugegeben. 5 min später wird der Ansatz mit 350 µl Puffer P3 neutralisiert und zum Abtrennen von Zelltrümmern 10 min bei 14000 rpm (5415 C, Eppendorf) zentrifugiert. Durch Zugabe von 1 ml Isopropanol zum Überstand wird die Plasmid-DNA gefällt und kann durch Zentrifugation (15 min 14000 rpm, 5415 C, Eppendorf) isoliert werden. Abschließend wird sie einmal mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Sie kann nun für die Transformation in *E. coli* (Kap. 3.1.7.4) oder als Template für eine PCR (Kap. 3.1.2) eingesetzt werden.

3.1.8.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Bei der Bestimmung der DNA-Konzentration macht man sich zunutze, daß die Menge an Ethidiumbromid, die während einer Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.1.4) in die DNA interkaliert, proportional zur Anzahl ihrer Basenpaare ist. Durch einen Vergleich der Bandenintensitäten der Probe mit denen eines mitgelaufenen Standards läßt sich die DNA-Konzentration auf einem Transilluminator (366 nm) abschätzen.

3.1.9 Hybridisierung von Northernblots mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Northernblot Technik ermöglicht die Übertragung von RNA auf eine Membran und daran anschließend deren Nachweis durch Hybridisierung mit spezifischen radioaktiv markierten DNA Sonden. In dieser Arbeit werden kommerziell erhältliche Northernblots der Firma Clontech verwendet, an die mRNA verschiedener Organe gebunden wurde. Mit ihrer Hilfe ist eine Bestimmung von Expressionsort und Größe des Transkriptes einzelner Gene möglich.

3.1.9.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Sonden für die Hybridisierung erfolgt unter Verwendung des Megaprime DNA labelling Kits RPN 1606/7 von Amersham Pharmacia Biotech nach den Angaben des Herstellers.

Dazu werden 15 µg eines geeigneten durch Gelelektrophorese und -extraktion (Kap. 3.1.4 und 3.1.5) gereinigten DNA-Fragmentes mit 5 µl Oktanukleotidprimergemisch zufälliger Sequenz gemischt, das Volumen mit dH₂O auf 25 µl aufgefüllt und die DNA 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Zugabe von 5 µl Labeling Puffer, 0,5 MBq α-[³²P]-dCTP und 1 µl Klenow Polymerase wird dH₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 33,5 µl zugegeben. Die Synthese der Sonden erfolgt nun für 10 min bei 37 °C. Das Produkt wird ohne Abstoppen der Reaktion sofort aufgereinigt.

Labeling Puffer

dATP

dGTP

dTTP

 β -MercaptoethanolMgCl₂

in Tris/HCl pH 7,5

Konzentrationsangaben werden vom Hersteller nicht gemacht.

3.1.9.2 Reinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Reinigung der DNA-Sonden zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide nach der Markierung erfolgt mit dem Qiaex II Gel Extraktion Kit von Qiagen.

Der Markierungsansatz wird mit 100 μ l Puffer QX1 und 10 μ l QiaexII Silikagelkugeln versetzt und 10 min unter gelegentlichem Mischen bei 50 °C inkubiert, um die DNA an die Matrix zu binden. Nicht eingebaute Nukleotide binden nicht und verbleiben deshalb bei der anschließenden Zentrifugation (30 s, 14000 rpm, 5415 C, Eppendorf) im Überstand. Das Pellet wird einmal mit 500 μ l Puffer QX1 und zweimal mit je 750 μ l des ethanolhaltigen PE-Puffers gewaschen, um die DNA von noch vorhandenen Salzen zu befreien. Zum vollständigen Entfernen des Ethanols wird das Pellet an der Luft getrocknet. Es wird dann in 20 μ l 10 mM Tris-Puffer, pH 8,0, resuspendiert und 5 min bei 50 °C inkubiert. Aufgrund der geringen Salzkonzentration und weil die Lösung leicht basisch ist, dissoziiert die DNA während dieser Zeit von den Silicakugeln ab. Die Silicakugeln werden anschließend 30 s bei 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand enthält die gereinigten DNA-Sonden.

Puffer QX1: NaClO₄-haltiger Solubilisierungspuffer mit pH-Indikator

PE-Puffer: siehe 3.1.5.1 Reinigung der Spaltprodukte nach einem Restriktionsschnitt

3.1.9.3 Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonden auf die Transfermembran

Zur Vermeidung unspezifischer Hybride wird die Membran zunächst für mindestens 4 h bei 42 °C in ULTRAhyb Hybridisierungslösung (1 ml/cm² Membran) vorhybridisiert. Anschließend wird die radioaktiv markierte Sonde 10 min bei 95 °C denaturiert und direkt in die Hybridisierungslösung pipettiert ($5 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^6$ cpm/ml Lösung). Die Inkubation wird über Nacht bei 42 °C fortgesetzt. Von überschüssigen Sonden wird die Membran befreit, indem sie 15 min bei 45 °C mit 2x SSC/0,1 % SDS, 15 min bei 45 °C mit 1x SSC/0,1 % SDS und schließlich 30 min mit 0,1x SSC/0,1 % SDS gewaschen wird. Die Signale auf der Membran werden durch Exposition eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

SSC

150 mM NaCl
15 mM Natriumcitrat
pH 7,0

ULTRAhyb Hybridisierungslösung: Die Zusammensetzung gibt die Firma Ambion nicht bekannt.

3.1.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen werden mit dem ABI310 Sequenziergerät der Firma Perkin-Elmer und dem zugehörigen Sequenzierkit (BigDyeTM Terminator) durchgeführt.

Die Methode basiert auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Es handelt sich um eine basenspezifische, limitierte Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges. Hierfür wird ein Primer an eine einzelsträngige DNA (Template) gebunden (Annealing) und enzymatisch in vitro in Anwesenheit von Desoxynukleotiden und unterschiedlich fluoreszenzmarkierten 2', 3'-Didesoxynukleotiden verlängert. Durch den Einbau eines solchen modifizierten Nukleotids kommt es zum Abbruch der Verlängerungsreaktion. Werden die erhaltenen Produkte im Sequenziergerät in einer Kapillare gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Fluoreszenzsignal der spezifisch markierten letzten Base jedes ankommenden DNA-Stranges detektiert, so kann aus der Abfolge aller Signale die Gesamtsequenz ermittelt werden.

Für eine Sequenzierreaktion werden 200 ng Plasmid DNA mit 1 pmol Primer und 2 µl Reaktionslösung versetzt und mit dH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend wird folgendes PCR-Programm durchgeführt:

Denaturierung 30 s 96 °C
Annealing 15 s 50 °C
Verlängerung 4 min 60 °C
25 Zyklen

Zum Abtrennen nicht eingebauter Nukleotide wird die DNA durch Zugabe von 100 µl 0,3 M NaAc-Lösung und 250 µl absolutem Ethanol gefällt (Kap. 3.1.5.3), in 25 µl dH₂O aufgenommen und 2 min auf 90 °C erhitzt, bevor die Sequenz analysiert wird.

Reaktionslösung: BigDyeTM Terminator (Perkin Elmer) mit unbekannter Zusammensetzung

3.2 Analyse der Genprodukte

3.2.1 *In vitro* Transkription und Translation

Die Methode der *in vitro* Transkription/Translation wird in dieser Arbeit genutzt, um Munc 93 in isolierter Form darzustellen. Eingesetzt wird das TNT[®] Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega. Das zu transkribierende Gen steht dabei unter der Kontrolle des viralen T7- oder SP6-Promotors, der spezifisch von der T7- bzw. SP6-RNA-Polymerase zur Initiation der Transkription verwendet wird. In Anwesenheit von Kaninchen-Retikulozytenlysat, das alle Komponenten wie Ribosomen, Initiations- und Elongationsfaktoren für die Übersetzung des RNA-Codes in eine Aminosäuresequenz enthält, erfolgt die Translation in direktem Anschluß an die cRNA Synthese. Bei Transmembranproteinen ermöglicht der Zusatz von Hundepankreasmembranen eine kotranslationale Integration in Membranen und Modifikationen der Proteine durch Glykosylierung oder Abspaltung einer Signalsequenz.

Der Reaktionsansatz wird nach den Angaben des Herstellers zusammengestellt:

ohne Membranen:

25 µl TNT Kaninchen-Retikulozytenlysat
 2 µl TNT Reaktionspuffer
 1 µl TNT RNA-Polymerase
 1 µl Aminosäuremix ohne Methionin
 20 µCi α -[³⁵S]-Methionin
 40 U Ribonukleaseinhibitor
 1 µg Template-DNA

ad 50 µl mit DEPC-behandeltem dH₂O

mit Membranen:

12,5 µl TNT Kaninchen-Retikulozytenlysat
 0,5 µl TNT Reaktionspuffer
 0,5 µl TNT RNA-Polymerase
 0,5 µl Aminosäuremix ohne Methionin
 20 µCi α -[³⁵S]-Methionin
 20 U Ribonukleaseinhibitor
 0,25 µg Template-DNA

2 µl Hundepankreasmembranen

ad 25 µl mit DEPC-behandeltem dH₂O

TNT-Reaktionspuffer

Über die Zusammensetzung dieses Puffers macht der Hersteller keine Angaben

DEPC dH₂O

dH₂O + 0,1 % DEPC

über Nacht bei Raumtemperatur rühren
 autoklavieren

3.2.1.1 Nachweis der Membranintegration

3.2.2 Isolierung von Membranproteinen

Kultivierte adhärenente Zellen werden vom Boden der Petrischale gelöst und 5 min lang bei 1000 rpm (5417 R, Eppendorf) und 4 °C pelletiert. Die Zellen werden in TC-Puffer (10 ml/g Zellen) resuspendiert und durch 200maliges Auf- und Abbewegen des Stempels eines 5 ml Zellhomogenisators aufgeschlossen. Zelltrümmer und Nuklei werden pelletiert (3000 rpm, 5 min, 4 °C, 5417 R, Eppendorf) und der aus Zytoplasma und Membranfraktion bestehende Überstand in der Ultrazentrifuge bei 125000 x g (TLA 100, TL-100 Ultrazentrifuge,

Beckman) für 1,5 h zentrifugiert. Das Pellet wird dann in TC-Puffer (1 ml/g Zellen) aufgenommen oder direkt mit Probenpuffer für Proteingele versetzt.

TC-Puffer

- 300 mM Saccharose
- 5 mM CaCl₂
- 5 mM Tris/HCl pH 8,0
- 2 mM DTT
- 5 mM Benzamidin
- 1 mM PMSF
- 10 µM Leupeptin
- 2 µM Pepstatin A

3.2.3 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Proteine, die als Fusionsproteine mit Glutathion S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* exprimiert werden, lassen sich schnell über eine Glutathionsepharosesäule aufreinigen (Smith and Johnson, 1988). Es handelt sich dabei um eine Affinitätschromatographie, da Glutathion ein Substrat der Glutathion S-Transferase darstellt.

3.2.3.1 Induktion der Proteinexpression

2 ml 2YT-Medium mit Antibiotikazusatz werden mit transformierten Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wird aus dieser Vorkultur eine 200 ml Kultur aus 2YT-Medium mit Antibiotikum so angeimpft, daß sie bei 600 nm eine Extinktion von 0,06 – 0,07 erreicht. Diese Kultur wächst bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,7, bevor die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von Isopropyl-β-thio-D-Galactopyranosid-Lösung (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 0,02 – 1 mM induziert wird. Vor und während der Induktion werden 2 ml Aliquote aus der Kultur entnommen, um später auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 3.2.4) den zeitlichen Verlauf der Expression verfolgen zu können. Nach 1 – 3 h Induktion der Proteinexpression wird die Bakteriensuspension 20 min bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (GSA-Rotor, RC-5C, Sorvall Instruments). Das Pellet wird in 8 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei –20 °C eingefroren.

PBS

- 140 mM NaCl₂
 - 7 mM KCl
 - 10 mM Na₂HPO₄
 - 1,8 mM KH₂PO₄
- autoklaviert

Resuspendierungspuffer

- 1 x PBS
- 5 mM EDTA, pH 8,0
- 0,5 mM PMSF
- 5 mM Benzamidin
- 0,1 % (w/v) Pepstatin A

2YT-Medium: siehe Kap. 3.1.7.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen für eine Transformation durch Hitzeschock

3.2.3.2 Ultraschallaufschluß

Nach dem Auftauen werden die Zellen im Eisbad mit Ultraschall aufgebrochen (2 x 90 s, Duty cycle 50 %, Branson Sonifier 250). Um eine zu starke Wärmeentwicklung zu vermeiden, wird die Bakteriensuspension zwischen den Pulsen 30 s im Eis abgekühlt. Anschließend werden die Zelltrümmer 20 min bei 15000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (SS-34-Rotor, RC-5C, Sorvall Instruments). Zytosolische Proteine, unter ihnen auch das rekombinante Protein, verbleiben dabei im Überstand. Für eine Kontrolle wird das Pellet in 8 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Ein Aliquot dieser Probe wird mit 2 x Probenpuffer für Proteingele versetzt und bei -20 °C gelagert. Aus dieser Kontrolle wird nach Coomassiefärbung eines Polyacrylamidgels (Kap. 3.2.4, 3.2.6) ersichtlich, ob das exprimierte Protein durch die Bildung von Einschlußkörpern oder ungenügenden Zellaufschluß in das Pellet gelangt ist, oder ob es sich in löslicher Form im Zytosol befand und durch die Zentrifugation von den Zelltrümmern abgetrennt werden konnte.

Resuspendierungspuffer: siehe Kap. 3.2.3.1 Induktion der Proteinexpression

Probenpuffer für Proteingele: siehe Kap. 3.2.5.3.1 Standardprobenvorbereitung

3.2.3.3 Aufreinigung mit GSH-Agarose

Durch den GST-Fusionsanteil kann das rekombinante Protein selektiv und reversibel an GSH-Sepharose gebunden werden. Dazu wird der Überstand nach der Zentrifugation auf die mit 5 ml Equilibrierungspuffer vorbereitete Säule (250 µl Glutathion Sepharose[®] 4B) überführt. Nicht gebundene Proteine werden mit 25 ml PBS-Waschpuffer und 20 ml Tris-Waschpuffer beseitigt. Anschließend wird das rekombinante GST-Fusionsprotein mit 3 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert, wobei das Eluat in 500 µl Fraktionen aufgefangen wird. Das freie Glutathion, das in diesem Puffer enthalten ist, verdrängt das an der Sepharose immobilisierte Glutathion vom Protein, indem es selbst an den GST-Anteil des Fusionsproteins bindet. 5 µl der Elutionsfraktionen werden auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Kap. 3.2.4), um die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration vereinigen zu können. Das vom Protein gebundene Glutathion wird durch dreimalige Dialyse gegen einen β-mercaptoethanolhaltigen Puffer beseitigt und das β-Mercaptoethanol wiederum durch Dialyse gegen einen β-mercaptoethanolfreien Puffer. Für die zweite Dialyse wird in der Regel der Puffer verwendet, in dem die Proteine in einer späteren Reaktion eingesetzt werden sollen.

Equilibrierungspuffer

1 x PBS
 5 mM EDTA, pH 8,0
 0,5 mM PMSF
 5 mM Benzamidin
 0,1 % (w/v) Pepstatin A

PBS-Waschpuffer

1 x PBS
 100 mM EDTA, pH 8,0
 0,5 % (w/v) TritonX 100
 5 mM Benzamidin
 1 mM PMSF
 0,1 % (w/v) Pepstatin A

Tris-Waschpuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10 mM EDTA
 0,5 % (w/v) TritonX 100
 5 mM Benzamidin
 1 mM PMSF
 0,1 % (w/v) Pepstatin A

Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 10 mM Glutathion
 0,5 % (w/v) Triton-X 100

Dialysepuffer

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol

PBS

siehe Kap. 3.2.3.1 Induktion der
 Proteinexpression

3.2.4 Bindungstests mit GST-Fusionsproteinen

Binden zwei Proteine aneinander, so kann diese Wechselwirkung durch ein Experiment nachgewiesen werden, bei dem eines der beiden als GST-Fusionsprotein an GSH-Sepharose gebunden vorliegt und das zweite mit diesem zusammen pelletiert wird.

GSH-Sepharose wird durch dreimaliges Waschen mit Bindungspuffer equilibriert (5 min 1000 rpm, 5415 C Eppendorf) und drei Stunden lang bei 4 °C mit dem GST-Fusionsprotein und 1 % BSA im Bindungspuffer inkubiert. Anschließend wird nicht gebundenes Protein durch Waschen mit Bindungspuffer entfernt und eine weitere Stunde bei 4 °C mit dem zweiten Protein inkubiert. Das Pellet wird dreimal mit Bindungspuffer gewaschen, wobei die GSH-Sepharose beim letzten Waschschrift in ein neues Gefäß überführt wird. Schließlich wird das Pellet für eine Analyse durch SDS-PAGE mit Probenpuffer für Proteingele versetzt.

Bindungspuffer

50 mM HEPES/KOH pH 7,5
 150 mM NaCl
 0,5 % TritonX-100
 400 μ M Na₃VO₄
 1 % Trasyolol

Probenpuffer für Proteingele: 3.2.5.3 Probenvorbereitung

3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht es, Proteine unter denaturierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufzutrennen und sie so weiteren Nachweismethoden zur spezifischen Analyse, wie z. B. einem Westernblot (Kap.3.2.7), zugänglich zu machen.

In dieser Arbeit wird eine modifizierte Form der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) angewendet.

3.2.5.1 SDS-Polyacrylamidgel

Das 0,75 mm dicke Gel setzt sich zusammen aus einem 5 cm hohen und 8,3 cm breiten Trenngel, gefolgt von einem Sammelgel mit den Maßen 1 cm x 8,3 cm. Ein 12,5 %iges Trenngel besteht aus:

- 1,25 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
- 50 µl 10 %igem (w/v) SDS
- 2,063 ml 30 %iger (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung
- 1,638 ml dH₂O
- 7,5 µl TEMED
- 30 µl 10 %iger (w/v) Ammoniumpersulfatlösung

Sofort nach dem Gießen wird das Gel mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach einer Stunde Polymerisation bei Raumtemperatur wird das Isopropanol mit einem saugfähigen Papier entfernt, um nachfolgend das 5 %ige Sammelgel zu gießen. Dieses enthält:

- 313 µl 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
- 25 µl 10 %iges (w/v) SDS
- 415 µl 30 %ige (w/v) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung
- 1,75 ml dH₂O
- 5 µl TEMED
- 20 µl 10 %ige (w/v) Ammoniumpersulfatlösung

30 %ige Acrylamid-/ Bisacrylamidlösung

- 29 % (w/v) Acrylamid
- 1 % (w/v) N'-N'-Methylenbisacrylamid

3.2.5.2 Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgel

Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgele werden auf die gleiche Weise wie SDS-Polyacrylamidgele (Kap. 3.2.5.1) hergestellt, enthalten aber zusätzlich noch 4 M Harnstoff, der gerade bei sehr hydrophoben Proteinen die Denaturierung verbessert. Für das Trenngel werden 1,21 g Harnstoff eingewogen und das Volumen des Trenngelansatzes anschließend mit dH₂O auf

5 ml aufgefüllt. Das Sammelgel enthält 1685 µl 6 M Harnstofflösung und 65 µl dH₂O statt der bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese vorgesehenen 1,75 ml dH₂O.

3.2.5.3 Probenvorbereitung

3.2.5.3.1 Standardprobenvorbereitung

Die hier verwendeten Geltaschen nehmen ein Probenvolumen von 10 µl auf. Handelt es sich bei den Proben um rekombinante, aufgereinigte Proteine oder um Bakterienlysate, so werden sie mit dem gleichen Volumen an 2 x Probenpuffer für Proteingele versetzt und 2 min im kochenden Wasserbad denaturiert oder 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Probenpuffer für Proteingele (2x)

- 12,5 mM Tris/HCl, pH 6,75
- 20 % (w/v) Glycerin
- 4 % (w/v) SDS
- 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol
- 0,002 % (w/v) Bromphenolblau
- (8 M Harnstoff, nur bei einigen Proben)

3.2.5.3.2 TCA-Fällung

Liegt das Protein in der Probe in nur geringer Konzentration vor, so kann es durch eine Fällung mit Trichloressigsäure konzentriert werden.

Dazu wird ein Probenvolumen mit der gewünschten Proteinmenge mit dem gleichen Volumen an 20 %iger (w/v) gekühlter Trichloressigsäure versetzt und 30 min im Eis inkubiert. Die gefällten Proteine werden 10 min bei 14000 rpm in der Tischzentrifuge (5415 C, Eppendorf) abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit je 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen, um Salze zu entfernen. Anschließend wird es 2 min lang bei 37 °C getrocknet, mit 10 µl 1x Probenpuffer für Proteingele versetzt und so lange bei 37 °C geschüttelt (Thermomixer 5436, Eppendorf), bis es sich vollständig gelöst hat. Sollte dabei ein Farbumschlag des Bromphenolblau nach gelb zu beobachten sein, wird mit 1 M Tris/HCl pH 8,0 titriert, bis es wieder blau erscheint. Die Probe wird nun 2 min im Wasserbad gekocht und kann dann auf das Gel aufgetragen.

Probenpuffer für Proteingele: siehe Kap. 3.2.5.3.1 Standardprobenvorbereitung

3.2.5.3.3 Vorbereitung von Hefezellen für die Elektrophorese

Hefen besitzen eine feste Zellwand, die zerstört werden muß, um rekombinante Proteine in einem Hefelysate nachweisen zu können.

Die Zellen einer dichtgewachsenen 5 ml Kultur werden abzentrifugiert (5305, Eppendorf) und das Pellet in 20 µl Oxalyticase resuspendiert. Während einer 30minütigen Inkubation bei 30 °C werden Glykoproteine der Zellwand durch das Enzym proteolytisch gespalten. Anschließend werden die Proben mit Probenpuffer für Proteingele versetzt, 10 min im Wasserbad gekocht und auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Kap. 3.2.4) analysiert.

Probenpuffer für Proteingele: siehe Kap. 3.2.5.3.1 Standardprobenvorbereitung

3.2.5.4 Elektrophorese

Zwei Gele werden senkrecht in die Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean™, Biorad) eingespannt. Dabei entsteht zwischen ihnen das Pufferreservoir für die Kathode. Sowohl dieses Reservoir als auch das für die Anode werden mit Laemmli-Laufpuffer gefüllt. Anschließend werden die Taschen des Sammelgels mit den Proben und einem Molekulargewichtsstandard beladen. Die Elektrophorese wird bei 20 mA pro Gel durchgeführt, bis der Farbmarker des Probenpuffers das Ende des Trenngels erreicht hat. Das Gel wird dann entweder gefärbt (Kap. 3.2.6) oder für einen Westernblot (Kap. 3.2.7) eingesetzt.

Laemmli-Laufpuffer

25 mM Tris

250 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

3.2.6 Coomassiefärbung

Das Gel wird mindestens 30 min in Coomassie-Lösung geschwenkt und danach mehrere Stunden lang entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abheben. Während des Entfärbens wird die Entfärbelösung von Zeit zu Zeit gewechselt.

Bis zum Trocknen wird das Gel dann in Wasser aufbewahrt. Zum Trocknen wird ein Whatman-3MM-Papier mit Wasser angefeuchtet und das Gel darauf luftblasenfrei ausgebreitet. Danach wird es 45 min lang unter Vakuum auf 70 °C erwärmt (Slab Gel Dryer SGD 2000, Savant mit Gel Pump GP 110, Savant). Auch während des Abkühlens wird das Vakuum aufrechterhalten, bis das Gel vollständig trocken ist.

Coomassie-Lösung

0,25 % (w/v) Coomassie Blau R250

45 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

filtriert

Entfärbelösung

30 % (v/v) Methanol

10 % (v/v) Essigsäure

3.2.7 Westernblot

Beim Westernblot nach Khyse-Anderson (1984) werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dort können sie mit spezifischen Reagenzien nachgewiesen werden.

3.2.7.1 Transfer auf eine Nitrocellulosemembran

Der Proteintransfer erfolgt durch Semidry-Blotting in einer speziellen Westernblotkammer (Eigenbau der Werkstatt der Universität Gießen), die aus zwei graphitbeschichteten Kunststoffplatten besteht. Diese dienen als Kathode und Anode.

Die Kathode wird mit Kathodenpuffer befeuchtet. Dann werden 9 in Kathodenpuffer getränkte Whatman 3MM Filterpapiere, die auf die Größe des Trenngels zugeschnitten wurden, luftblasenfrei aufgelegt. Es folgt das Polyacrylamidgel, das zuvor in Kathodenpuffer geschwenkt wurde, und die mit Anodenpuffer II befeuchtete Nitrocellulosemembran. Darüber werden 3 in Anodenpuffer II und 6 in Anodenpuffer I getränkte Whatmanpapiere gelegt. Nach oben wird der Blot durch die mit Anodenpuffer I benetzte Anode abgeschlossen. Im Blotstapel dürfen sich keine Luftblasen befinden, da diese einen gleichmäßigen Proteinfluß verhindern. Des weiteren ist darauf zu achten, daß sich die Blotpapiere ober- und unterhalb des Polyacrylamidgels nicht berühren, da es sonst an dieser Stelle zu einem erleichterten Stromfluß kommt, was ebenfalls den Transfer des Proteins aus dem Gel heraus behindert. Durch die Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems mit zwei Anodenpuffern werden schneller wandernde Proteine gebremst und damit die Gefahr verringert, daß sie sich während des Blottens durch die Membran hindurchbewegen.

Der einzustellende Stromfluß hängt von der Fläche des Gels ab. Bei 0,88 mA pro cm² Gelfläche ist der Transfer nach 60 min abgeschlossen. Zur Kontrolle, daß sich im Gel keine Proteine mehr befinden, kann dieses mit Coomassieblau gefärbt werden (Kap. 3.2.6). Der Nachweis, daß die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert wurden, kann durch eine Ponceau-Rot-Färbung der Membran erbracht werden. Dazu wird sie für einige Minuten in eine Ponceau S-Lösung gelegt und dann mit dH₂O entfärbt. Proteinbanden erscheinen rot.

Anodenpuffer I

300 mM Trisbase
20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II

25 mM Trisbase
20 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer

25 mM Trisbase
20 % (v/v) Methanol
40 mM 6-Amino-n-hexansäure

Ponceau S-Lösung

2 % (w/v) Ponceau S
30 % (w/v) Trichloressigsäure
30 % (w/v) Sulfosalicylsäure

3.2.7.2 Immunologische Identifizierung von Proteinen auf der Westernblot-Membran

Unter Verwendung von Antikörpern können Proteine, die durch einen Westernblot auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert wurden, spezifisch nachgewiesen werden. Teilweise ist es auch möglich, ihre Menge zu bestimmen.

Hat ein Antikörper spezifisch an ein Protein gebunden, wird er mit einem zweiten (sekundären), gegen ihn gerichteten Antikörper inkubiert, der entweder radioaktiv markiert oder kovalent an ein Enzym gebunden ist, das durch eine Farbreaktion detektiert werden kann.

3.2.7.2.1 Durchführung des immunchemischen Nachweises von Proteinen

Die Nitrocellulosemembran wird 2 h in einem Gemisch aus PBS-Tween und 5 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt. Dabei sättigen die Magermilch und Tween-20[®] unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran ab (Blatteiger and Newhall, 1982). Anschließend wird das Milchpulver kurz mit PBS-Tween abgespült. Der erste Antikörper wird in PBS-Tween mit 1 % (w/v) BSA verdünnt und 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert. Danach wird die Antikörperlösung abgeschüttet und der Blot dreimal 20 min mit PBS-Tween bei Raumtemperatur gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Mit der Verdünnung des sekundären, peroxidasegekoppelten Antikörpers, der gegen den primären gerichtet ist, wird weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörpermoleküle werden abschließend durch Waschen mit PBS-Tween (3 x 20 min) entfernt.

PBS-Tween

1 x PBS

0,05 % (w/v) Tween[®]-20

PBS: siehe Kap. 3.2.3.1 Induktion der Proteinexpression

3.2.7.2.2 Detektion der Proteine

Die Lokalisation der Proteine auf der Membran erfolgt durch eine Chemolumineszenzreaktion, für die das ECL-System von Amersham verwendet wird. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase aus Meerrettich katalysiert die Oxidation von Luminol, einem Diacylhydrazin, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid. Nach der Oxidationsreaktion befindet sich das Produkt zunächst in einem energetisch angeregten Zustand. Beim Übergang eines Elektrons aus diesem angeregten Zustand in den Grundzustand wird Energie frei, die in Form eines Lichtquanten abgegeben wird. Die auftretenden Lichtblitze können mit Hilfe eines Autoradiographiefilms detektiert werden.

Die Durchführung erfolgt nach den Angaben in *ECL Western Blotting protocols* (Amersham, 1992). 5 ml Reagenz 1 und 5 ml Reagenz 2 werden gemischt und der Blot darin 60 s geschwenkt. Anschließend wird die Membran in eine Klarsichtfolie gesteckt und ein

Röntgenfilm aufgelegt. Entwickelt wird der Film in der Filmentwicklungsmaschine Optimax von Protec.

ECL Reagenzien 1 und 2: Die Zusammensetzung gibt der Hersteller nicht bekannt.

3.3 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde entwickelt, um Protein-Protein-Interaktionen in eukaryontischen Zellen *in vivo* untersuchen zu können (Fields and Song, 1989). Für dieses System wurde die Hefe *S. cerevisiae* ausgewählt, da in ihr die Expression rekombinanter Proteine unter Verwendung von Plasmiden ähnlich einfach durchzuführen ist wie in Bakterienzellen. Außerdem gleicht das Expressionssystem demjenigen höherer Eukaryonten soweit, daß man auch für Säugergene eine Transkription, Translation und Prozessierung zu funktionellen Proteinen erwarten kann. Des weiteren ist das Hefegenom sehr gut untersucht, so daß eine große Zahl an Selektionsmarkern zur Verfügung steht, um für spezielle Anwendungen maßgeschneiderte genetische Umgebungen herstellen zu können.

Das System arbeitet mit zwei Fusionsproteinen (Hybriden). Das eine Plasmid enthält die DNA des zu untersuchenden Proteins (Köder) stromabwärts der kodierenden Sequenz für die DNA-Bindungsdomäne von LexA (Bartel et al., 1993, Bartel and Fields, 1995). Das zweite Plasmid kodiert für die VP16-Promotoraktivator-domäne und ist mit einem potentiellen Interaktionspartner für das Köderprotein fusioniert (McKnight et al., 1987, Vojtek et al., 1993). Des weiteren enthält dieses Fusionsprodukt noch eine Kernlokalisierungsdomäne. Die beiden Plasmide werden nun in einem Hefestamm exprimiert, der ein geeignetes Reportersystem mit einer entsprechenden DNA-Bindestelle – hier für LexA – enthält, sowie einen geeigneten Promotor. Als Reporter dienen das *his3*-Gen, ein Selektionsmarker im histidinauxotrophen Stamm L40 (Vojtek et al., 1993) oder das Gen für das grün fluoreszierende Protein GFP im Hefestamm YRN 974 (Mancini et al., 1997). Bindet das Köderprotein an seinen Interaktionspartner, so ist der entstandene Komplex in der Lage, in den Kern zu wandern und dort die Expression des Reporters anzuschalten.

In dieser Arbeit wird das Hefe-Zwei-Hybrid-System genutzt, um in einer Mausembryo-Genbank (Vojtek et al., 1993) nach Bindungspartnern für zytosolische Domänen von murinem Munc93 zu suchen. Die verwendete Genbank enthält $5 \cdot 10^6$ unabhängige Klone. Sie wurde aus cDNA-Fragmenten mit einer Länge von 350 – 700 bp hergestellt, die über einen NotI Linker in den Vektor pVP16 kloniert wurden. Die cDNA-Inserts selbst wurden an polyA⁺-mRNA 9,5 – 10,5 Tage alter Mausembryonen synthetisiert. Die Genbank stammt von Dr. S. Hollenberg (Fred Hutchinson Cancer Center, Seattle, USA) und wurde dem Labor freundlicherweise von Dr. M. Funk (MediGene, Martinsried, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

3.3.1 Genbankamplifikation

Da es sehr aufwendig ist, cDNA-Genbanken herzustellen, wird die Neusynthese einer solchen häufig durch die Amplifikation einer bereits existierenden umgangen. Ein Problem der Amplifikation ist allerdings, daß Plasmide mit unterschiedlichen Inserts nicht unbedingt gleich gut von Bakterien aufgenommen oder in diesen vervielfältigt werden. Besonders in Flüssigkultur kann es deshalb zum Verlust einiger Plasmide und zu einer Überrepräsentation anderer kommen.

Die Genbank, die in dieser Arbeit verwendet wird, enthält $5 \cdot 10^6$ unabhängige Klone. Um sicherzustellen, daß auch nach der Amplifikation statistisch noch alle Klone vorhanden sind, muß zunächst die Transformationseffizienz bestimmt werden. Dazu werden 50 ng der Genbank-DNA mittels Elektroporation in HB101 transformiert (Kap. 3.1.7.4) und verschiedene Aliquote des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten ausgestrichen. Am nächsten Tag werden die Kolonien ausgezählt und daraus die Anzahl an Transformanten pro μg DNA berechnet.

Für die Amplifikation der Genbank werden $2 \cdot 10^7$ Kolonien transformiert. Die DNA wird in 2,5 μl Aliquote aufgeteilt, damit die Ionenkonzentration nicht zu hoch wird, und wie unter 3.1.7.4 beschrieben in HB101 elektroporiert. Nach der einstündigen Inkubation in SOC-Medium werden die Ansätze vereinigt. Für eine Kontrolle der Transformationseffizienz werden Anteile ($1/10^5$ und $1/10^6$) zum Auszählen auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Rest des Ansatzes wird bei 4 °C aufbewahrt.

Um eine höhere Amplifikationsrate zu erreichen, können die vereinigten Transformationsansätze nach der Inkubation in SOC-Medium mit 50 – 75 ml Selektionsmedium verdünnt und wenige Stunden angezogen werden, bis sie eine optische Dichte von 1 erreicht haben. Diese Bakterien können dann mit 10 % Glycerin bei –80 °C gelagert werden.

Nach dem Auszählen werden $2 \cdot 10^7$ Kolonien auf 50 2YT-Agarplatten (14 cm x 14 cm) ausgestrichen und die Platten solange bei 37 °C inkubiert, bis sie dicht bewachsen sind, wobei aber immer noch einzelne Kolonien erkennbar bleiben müssen. Nach Zugabe von PBS werden die Bakterien unter leichtem Schwenken von den Platten heruntergewaschen und 10 min bei 5000 rpm und 4 °C (GSA-Rotor, RC-5b, Sorvall) abzentrifugiert. Das Pellet wird in 4 Aliquote aufgeteilt, um mit Hilfe von Maxipräparationen die DNA zu gewinnen (Kap. 3.1.8.2).

2YT-Agarplatten: siehe Kap. 3.1.7.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

PBS: siehe Kap. 3.2.3.1 Induktion der Proteinexpression

3.3.2 Genbankscreening

Für ein Genbankscreening wird zunächst das Köderplasmid wie unter 3.1.7.6 beschrieben in den Hefestamm L40 transformiert. Nachdem die korrekte Expression des Köders durch einen Westenblot kontrolliert worden ist (Kap. 3.2.5.3.3 und 3.2.7), wird diese Hefekultur für die Genbanktransformation vorbereitet.

5 ml einer Übernachtskultur werden in 200 ml SD Δ T-Medium überführt und bis OD₆₀₀ \approx 1 angezogen. Aus dieser wird 1 l SD Δ T-Medium mit OD₆₀₀ \approx 0,3 angeimpft und bis OD₆₀₀ = 0,5 – 0,6 weiterinkubiert. Die Hefen werden nun abzentrifugiert (15 min 5000 rpm, GSA-Rotor, RC-5C, Sorvall Instruments) und einmal mit 500 ml dH₂O gewaschen. Anschließend werden sie in 20 ml 100 mM LiOAc/0,5x TE resuspendiert und zu einem Gemisch aus 11,25 mg Carrier-DNA und 500 μ g Genbank-DNA gegeben. Es werden 140 ml 30 °C warmer polyethylenglycolhaltiger LiOAc/TE Puffer zugegeben und 30 min bei 30 °C unter Schwenken im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 17,6 ml DMSO erfolgen ein Hitzeschock (15 min 42 °C) und das sofortige Abkühlen der Zellen im Eiswasserbad. Die Zellen werden anschließend wie oben beschrieben abzentrifugiert und mit 500 ml dH₂O gewaschen, um sie dann 1 h in 1 l YPD-Medium anzuziehen, erneut abzuzentrifugieren und wiederum mit 500 ml dH₂O zu waschen. Das Hefepellet wird in 1 l SD Δ TL-Medium resuspendiert. Um die Transformationseffizienz zu bestimmen, werden Proben von 100 μ l und 10 μ l entnommen und auf SD Δ TL-Platten ausgestrichen. Für ein erfolgreiches Screening sollte jedes Plasmid einmal vorhanden sei, was einer Gesamtzahl von mindestens $5 \cdot 10^6$ Transformanten entspricht.

Die Kultur wird 8 h bei 30 °C inkubiert, um eine Vermehrung aller doppelt transformierten Kolonien zu erreichen. Erneut werden kleine Aliquoute auf SD Δ TL-Platten ausgestrichen, aus denen die Amplifikationsrate bestimmt werden kann. Dann werden die Hefezellen pelletiert und zweimal mit je 500 ml dH₂O gewaschen. Noch vorhandenes Histidin wird so vollständig entfernt. Abschließend wird der gesamte Transformationsansatz auf SD Δ THULL-Platten ausplattiert, von denen über 5 Tage Kolonien gepickt und vor einer Anzucht für DNA-Minipräparationen (Kap. 3.1.8.3) auf SD Δ THULL-Platten ausgestrichen werden.

Δ THULL-Medium (500 ml 10x)

150 mg Isoleucin
 750 mg Valin
 100 mg Arginin
 100 mg Methionin
 250 mg Phenylalanin
 1000 mg Threonin
 150 mg Tyrosin
 100 mg Adenin

SD Δ T-Medium

SD-Medium
 1x Δ THULL-Medium
 0,002 % Histidin
 0,002 % Uracil
 0,01 % Leucin
 0,003 % Lysin

SD Δ TL-Medium

SD-Medium
 1x Δ THULL-Medium
 0,002 % Histidin
 0,002 % Uracil
 0,003 % Lysin

SD Δ TL-Platten

SD-Medium
 1x Δ THULL-Medium
 0,002 % Histidin
 0,002 % Uracil
 0,003 % Lysin
 20 % Bacto Agar

SD Δ THULL-Platten

SD-Medium
 1x Δ THULL-Medium
 20 % Bacto Agar

YPD-Medium: siehe Kap. 3.1.7.5 Herstellung kompetenter Hefezellen

SD-Medium, Carrier-DNA, polyethylenglycolhaltiger LiOAc/TE Puffer:

siehe Kap. 3.1.7.6 Transformation von Hefen

3.3.3 Selektive Amplifikation von pVP16 aus einem pVP16-pBTM116-Gemisch

Bei der Plasmid-DNA-Präparation aus den auf SD Δ THULL-Platten gewachsenen Hefekolonien wurde ein Gemisch aus den beiden Ampicillinresistenz vermittelnden Plasmiden pVP16 und pBTM116 isoliert, von denen pVP16 das zu identifizierende Gen des Bindungspartners aus der Bibliothek enthält. Das DNA-Gemisch wird durch Elektroporation in HB101 transformiert (Kap. 3.1.7.4) und auf M9-Platten ohne Leucin ausgestrichen. Unter diesen Bedingungen können sich nur solche Zellen vermehren, die das pVP16-Plasmid aufgenommen haben, das das Gen für die β -Isopropyl-Malatdehydrogenase, ein Enzym der Leucinbiosynthese trägt.

M9-Platten: siehe Kap. 3.1.7.4 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

3.3.4 Interaktionstests

Der Interaktionstest mit GFP als Reporterprotein dient der Eliminierung falsch positiver Klone aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System und der Bestimmung einer relativen Bindungsstärke bei verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen.

Der Hefestamm YRN 974 wird mit den gewünschten pBTM116- und pVP16-Konstrukten transformiert (Kap. 3.1.7.6). Anschließend werden von 5 unabhängigen Klonen Übernachtskulturen in SD Δ TL-Medium angelegt, die am nächsten Morgen 1:10 verdünnt werden. Nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 30 °C werden sie 1:10 in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 verdünnt und in einem Becton-Dickenson Durchflußzytometer (FACSCalibur) analysiert. Die Signalverstärkungseinstellung wird dabei so gewählt, daß die Eigenfluoreszenz

einer Hefezelle im Durchschnitt 10 – 20 relative Fluoreszenzeinheiten ausmacht. Gemessen werden 10000 Zellen pro Probe. Rote Fluoreszenzen, die durch abgestorbene Hefen hervorgerufen werden, werden durch eine zusätzliche Fluoreszenzmessung in diesem Wellenlängenbereich ausgeschlossen. Die Qualität der Messung läßt sich im Fluoreszenzmikroskop mit Blaufilter B-2A (Nikon, EX 450 – 490 nm, DM 505, BA520) überprüfen. Während Hefen, in denen die beiden rekombinanten Fusionsproteine miteinander interagieren, grün fluoreszieren, erscheinen abgestorbene Zellen gelb.

SD Δ TL-Medium: siehe Kap. 3.3.1 Genbankamplifikation

3.4 Zellkultur

3.4.1 Passagieren adhärenter Zellen

Haben adhärenente Zellen den Boden der Kulturschale völlig bedeckt, müssen sie vom Boden gelöst und in geringerer Konzentration in einer neuen Kulturflasche ausgesät werden, da es sonst zu einer Induktion der Apoptose und damit zum Absterben der kultivierten Zellen kommt.

Das Nährmedium wird abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dieser Waschschrift ist essentiell, da so ein im Medium vorhandener Trypsininhibitor entfernt wird. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung werden die Zellen dann vom Flaschenboden gelöst und in frischem Nährmedium aufgenommen, wodurch das Enzym gleichzeitig inhibiert wird. Die Zellen können nun in neuen Kulturschalen ausgesät werden.

Bei HEK293-Zellen genügt kräftiges Pipettieren, um sie vom Boden zu lösen.

Trypsin/EDTA-Lösung

0,05 % Schweinetrypsin
0,02 % EDTA
in HBSS

HBSS

0,8 % NaCl
0,04 % KCl
0,0048 % Na₂HPO₄
0,006 % KH₂PO₄
0,02 % MgSO₄ · 7 H₂O
0,014 % CaCl₂
0,1 % Glucose
0,001 % Phenolrot
0,035 % NaHCO₃

3.4.2 Auftauen und Einfrieren von Eukaryontenzellen

Die Zellen werden in der Hand solange angetaut, bis sie sich, immer noch gefroren, in eine Kulturflasche schütten lassen, die bereits Nährmedium enthält. Wenn sich die Zellen am

Flaschenboden angeheftet haben, was etwa 2 h dauert, wird das Medium gegen frisches ausgetauscht. So wird das für die Zellen toxisch wirkende DMSO aus dem Einfriermedium entfernt.

Zum Einfrieren werden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst (siehe Kap. 3.4.1) und mit eisgekühltem Einfriermedium versetzt. Anschließend werden sie mit einer Geschwindigkeit von 1 °C pro min auf –80 °C abgekühlt und dann zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium

- 70 % Nährmedium
- 20 % Fötale Kälberserum
- 10 % DMSO

Trypsin/ EDTA-Lösung: siehe Kap. 3.4.1 Passagieren adhärenter Zellen

3.5 Transfektion

3.5.1 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Um Eukaryontenzellen mit Plasmid-DNA zu transfizieren, kann diese zunächst als Calciumphosphat-Kokristall gefällt werden. Derartige Präzipitate werden von zahlreichen Zelllinien auf unbekanntem Wege aufgenommen und die DNA in den Zellkern transportiert. Da kein Selektionsdruck ausgeübt wird und die Plasmid-DNA nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit ins Genom integriert, geht sie nach einigen Zellteilungen wieder verloren.

HEK293-Zellen werden 48 h, CHO-K1-Zellen 24 h vor der Transfektion so in einer Flasche mit 25 cm²-Bodenfläche ausgesät, daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 30 – 50 % erreichen. 15 µg Plasmid-DNA werden mit dH₂O auf ein Volumen von 250 µl gebracht und mit 250 µl 2x HBS vermischt. Anschließend gibt man langsam und unter ständiger Bewegung der Pipette 30 µl 2 M CaCl₂-Lösung hinzu. Nach kurzem Vortexen wird der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Es bilden sich Calciumphosphat-DNA-Kristalle, deren Größe für eine erfolgreiche Transfektion der Zellen entscheidend ist. Die DNA-Lösung wird mit 5 ml DMEM-Medium versetzt und auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel und weitere 24 h später können die transfizierten Zellen im Versuch eingesetzt werden.

3.6 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie ist es möglich, Proteine in der Zelle zu lokalisieren. Dabei werden fixierte Zellen mit Antikörpern inkubiert, die gegen spezifische zelluläre Antigene gerichtet sind. Die Position dieser primären Antikörper wird dann durch sekundäre, fluoreszenzmarkierte dargestellt.

3.6.1 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

HEK293-Zellen sind zwar adhären wachsende Zellen, ihre Haftung auf Glasoberflächen ist aber sehr schwach. Werden die Deckgläschen allerdings vor dem Aussäen der Zellen mit poly-L-Lysin beschichtet, wachsen sie so fest an, daß sie sich auch bei mehrfachem Waschen nicht ablösen.

Die Deckgläschen werden zunächst 1 h unter ständigem Rühren in 70 %igem Ethanol gespült und anschließend 1 h mit dH₂O gewaschen. Die Beschichtung erfolgt ebenfalls unter ständigem Rühren über Nacht in einer 0,01 %igen Poly-L-Lysinlösung. Schließlich werden sie noch einmal 1 h lang mit dH₂O gewaschen, getrocknet und durch Autoklavieren sterilisiert.

Deckgläschen für stärker adhären wachsende Zellen werden auf die gleiche Weise gereinigt, aber die Inkubation mit Poly-L-Lysinlösung entfällt.

3.6.2 Fluoreszenzfärbung

Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen, 10 min mit einer 4 %igen Paraformaldehydlösung fixiert und nach dem Zusatz von 0,1 % TritonX-100 exakt 5 min permeabilisiert. Da auch die Permeabilisierungslösung Paraformaldehyd enthält, geht die Fixierung in dieser Zeit weiter. Sollen nur extrazelluläre Proteine betrachtet werden, wird das Permeabilisieren unterlassen und die Fixierungszeit auf 15 min ausgedehnt. Die Zellen werden dann mit PBS gewaschen und 5 min mit einer Lösung aus 50 mM Glycin in PBS inkubiert, die dafür sorgt, daß noch vorhandenes Paraformaldehyd abreagieren kann. Nach einem weiteren Waschschrift werden Proteinbindungsstellen, an die Antikörper unspezifisch binden könnten, durch 60minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Blocklösung abgesättigt. Nach 30 min wird die Blocklösung einmal erneuert. Die fertig vorbereiteten Zellen werden dann 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem primären Antikörper, verdünnt in PBS mit 5 % FCS und 0,5 % BSA, inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt (je 15 min). Danach werden die Zellen 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der ebenfalls in PBS mit 5 % FCS und 0,5 % BSA verdünnt wurde und kovalent an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Unspezifisch und nicht gebundene Antikörpermoleküle werden wiederum weggewaschen. Danach werden die Präparate in Mowiol, dem Dabco als Antibleichmittel zugesetzt wurde, eingebettet.

Soll doppelsträngige DNA der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bis-Benzimidazol gefärbt werden (Arndt-Jovin et al., 1989), so werden sie vor dem Einbetten 5 min in einer Lösung aus 10 ng/ml Hoechst 33258 in PBS inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen.

4 % Paraformaldehyd

90 ml dH₂O
 200 µl 2 M NaOH
 auf 50 °C erhitzen
 unter Rühren 4 g Paraformaldehyd zugeben
 wenn alles gelöst ist Zugabe von
 10 ml 10x PBS
 auf Raumtemperatur abkühlen lassen,
 pH-Wert kontrollieren, filtrieren

Mowiol

6 g Glycerin
 2,4 g Mowiol
 6 ml dH₂O
 2 h bei Raumtemperatur stehenlassen
 12 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5
 bei 50 °C rühren, bis sich das Mowiol gelöst
 hat
 15 – 20 min 5000 rpm
 Lagerung bei –20 °C

Blocklösung

PBS
 10 % FCS
 0,5 % BSA

Permeabilisierungslösung

4 % Paraformaldehyd in PBS
 0,1 % TritonX-100

PBS: siehe Kap. 3.2.3.1 Induktion der Proteinexpression

3.6.3 Isolierung von anti hMunc-93 Antikörpern aus dem hMunc-93 Antiserum

Das hMunc-93 Antiserum zeigt in der Immunfluoreszenzfärbungen Kreuzreaktivitäten, die wahrscheinlich auf das Vorhandensein weiterer Antikörper im Serum zurückzuführen sind. Anti hMunc-93 Antikörper können durch Bindung an ein immobilisiertes Epitop und anschließende Elution bei niedrigem pH-Wert spezifisch isoliert werden. Solche, die nicht mit hMunc-93 reagieren, werden entfernt.

3.6.3.1 Immobilisierung des Antigens

CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) wird 15 min lang mit 1 mM HCl gespült, damit das Gel aufquillt, und anschließend mit 0,1 M Borat/0,5 M NaCl pH 8,3 gewaschen. Das so vorbereitete Gel wird mit GST-Munc 93, das gegen 0,1 M Borat/0,5 M NaCl pH 8,3 dialysiert worden ist, 2 h bei Raumtemperatur inkubiert (0,7 µmol Protein/100 mg CNBr-aktivierte Sepharose 4B). Um alle noch vorhanden reaktiven Gruppen der Sepharose zu inaktivieren, wird es über Nacht in 0,2 M Glycin pH 8,0 bei 4 °C weiterinkubiert. Zum Entfernen ungebundener Proteine wird das Material anschließend in eine Säule überführt und 5 Mal alternierend mit je 20 Säulenvolumina an 0,1 M Acetat/0,5 M NaCl pH 4 und 0,1 M Borat/0,5 M NaCl pH 8,3 gewaschen.

3.6.3.2 Reinigung des Antikörpers

Das gegen 0,1 M Borat/0,5 M NaCl pH 8,3 dialysierte Antiserum wird dazu auf die mit dem gleichen Puffer equilibrierte Säule aufgetragen und 3 h lang bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Säule mit 20 Volumina 0,1 M Borat/0,5 M NaCl pH 8,3, können die gereinigten Antikörper mit 0,1 M Glycin/0,5 % BSA pH 2,8 eluiert werden. Die Eluate werden in

Gefäßen aufgefangen, in denen soviel 1 M Tris/HCl/0,5 % BSA pH 9,0 vorgelegt worden ist, daß der finale pH-Wert 8,0 beträgt. Diese rasche Neutralisation ist notwendig, um die Gefahr einer Denaturierung der Antikörper durch den niedrigen pH Wert auszuschließen.

3.6.4 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration verschiedener Proben wird mit dem *DC Protein Assay Kit* von Biorad durchgeführt. Es stellt eine Modifikation der Proteinbestimmung nach Lowry dar (Lowry *et al.*, 1951), bei der Proteine mit einer alkalischen Kupfertartratlösung und Folinreagenz reagieren. Es kommt zunächst zu einer Reaktion zwischen Protein und Kupfer. Das kupferbehandelte Protein bewirkt anschließend eine Reduktion des Folinreagenzes, das dabei 1, 2 oder 3 Sauerstoffatome verliert. So entsteht ein kolloidales, molybdän- und wolframhaltiges, Mischoxid mit einer charakteristischen blauen Farbe und einem Absorptionsmaximum bei 750 nm. An der Farbentwicklung sind hauptsächlich die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan beteiligt, in geringerem Maße auch Cystin, Cystein und Histidin.

Ein definiertes Volumen der Probe wird mit dH₂O auf 25 µl aufgefüllt und mit 125 µl Reagenz A versetzt. Der Ansatz wird gemischt, 1 ml Reagenz B hinzupipettiert, erneut gemischt und vor der Messung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Um Meßfehler zu minimieren, werden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zur Erstellung einer Eichkurve werden BSA-Probenstandards mit Konzentrationen von 0,2 bis 1,5 mg/ml verwendet.

Reagenz A (Biorad) enthält:

- 1 – 5 % Natriumhydroxid
- < 1 % Natriumtartrat
- < 0,1 % Kupfersulfat

Reagenz B (Folinreagenz) (Biorad) enthält:

- < 1 % Lithiumsulfat
- < 1 % Wolframsäure, Natriumsalz
- < 1 % Molybdänsäure, Natriumsalz
- < 1 % Phosphorige Säure
- < 1 % Chlorwasserstoffsäure

3.6.5 Computergestützte Analysen

Für die Analyse von Nukleotid oder Aminosäuresequenzen sind im Internet verschiedene Programme und Datenbanken vorhanden.

Die Programme BlastP und TblastN: (beide: <http://www.ncbi.nih.nlm.gov/BLAST/>) können für das Durchsuchen von Protein- oder Gendatenbanken nach homologen Sequenzen verwendet werden.

Mit BCM Gene Finder (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu9331/gene-finder/gf.html>) lassen sich mögliche Splicesites in chromosomaler DNA ermitteln.

Für die Analyse von Aminosäuresequenzen kommen die Programme TMPred: (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) und Profile Scan in Betracht. TMPred kann potentielle Transmembrandomänen voraussagen, Profile Scan durchsucht die Aminosäuresequenz nach bekannten Motiven wie zum Beispiel Erkennungssequenzen für posttranslationale Modifikationen oder für bestimmte katalytische Zentren.

Ein Vergleich der Sequenzen verschiedener Proteine miteinander (Alignment) läßt sich mit dem Programm ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) durchführen.

4 Ergebnisse

4.1 *C. elegans* unc-93 Homologe aus Säugergenbanken

Um eine Säuger cDNA mit Homologie zu Unc-93 aus *C. elegans* zu identifizieren, wurde eine computergestützte Suche in Sequenzdatenbanken durchgeführt. Die Programme BlastP, das eine vorhandene Aminosäuresequenz mit Aminosäuresequenzen der Datenbank vergleicht, und TblastN, das Nukleinsäuresequenzen der Datenbank in alle sechs Leseraster übersetzt und die erhaltenen Aminosäuresequenzen mit der eingegeben vergleicht (Altschul et al., 1990; Gish and States, 1993), lieferten 27 ESTs von fünf verschiedenen Säugergenen, sowie zahlreiche weitere anderer Spezies, darunter *Drosophila melanogaster* und *Gallus gallus*. Die erhaltenen menschlichen und murinen Sequenzen sowie diejenigen aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurden untersucht:

Bei GH10120 handelt es sich um die Sequenz eines 539 Aminosäuren langen Proteins aus *Drosophila melanogaster* mit 57 % Homologie zur hydrophoben Domäne von Unc-93. Es ist in der NIH (National Institutes of Health) Computerdatenbank beim NCBI (National Center for Biotechnology Information) unter der Zugangsnummer AAD38632 zu finden. Die genetische Information ist auf Chromosom 1 in den Abschnitten 15B1 bis 15B4 kodiert, beginnt mit Base 6104782 dieses Chromosoms und ist auf 5 Exons aufgeteilt.

Die Sequenz des hypothetischen Proteins GH09628, das ebenfalls aus *Drosophila melanogaster* stammt und 51 % Homologie zur hydrophoben Domäne von Unc-93 aufweist, wurde mit Hilfe zweier ESTs (Zugangsnummer AI110145 bzw. AI402180) identifiziert, die aus demselben Plasmid stammen und das 3'- und das 5'-Ende des Inserts angeben. In beiden EST-Sequenzen ist sowohl untranslatierter Sequenzbereich als auch offener Leserahmen enthalten. Die Sequenz von GH09628 ist auf Chromosom 2R im Abschnitt 44C1 codiert. Eine Analyse dieses Bereiches mit dem Programm BCM Gene Finder (Smith et al., 1996) ergab die in Abb. 4 dargestellte hypothetische Sequenz aus 521 Aminosäuren, die von 4 Exons codiert wird. Der offene Leserahmen beginnt mit Base 12277590 der chromosomalen Sequenz.

Eine 118 Aminosäuren lange Teilsequenz eines murinen homologen Proteins zu Unc-93 ist in der Datenbank unter der Zugangsnummer ACC36530 zu finden. Mittels PCR an einer ZAPII λ -Phagen-cDNA Bibliothek aus Mäusemilz gelang es, weitere 47 Aminosäuren dieses Proteins aufzuklären. Die verwendeten Primerpaare bestanden jeweils aus dem T3- oder T7-Primer, die im Vektor binden, und einem Primer, der zu einem Abschnitt der bekannten Sequenz komplementär war. Um die Anzahl der Produkte, die durch unspezifische Primerbindung entstanden sind zu reduzieren, wurde an gereinigten PCR-Produkten eine weitere PCR durchgeführt, für die der T3- oder T7-Primer in Kombination mit einem zweiten Primer verwendet wurde, der näher am 3'- bzw. 5'-Ende der bekannten Sequenz binden konnte. Die ermittelte Aminosäuresequenz (mMunc-93B) zeigt 45 % Homologie zu Unc-93.

Die ersten 505 Aminosäuren eines menschlichen Homologen zu Unc-93, die zu 89 % mit der eben beschriebenen murinen Sequenz identisch sind, konnten durch Sequenzierung des ESTs IMAGE 2791017 (Zugangsnummer des 3'-Endes: AW 516192) aufgeklärt werden. Vom 5'-untranslatierten Bereich sind 50 bp bekannt. Die restlichen 92 Aminosäuren wurden durch Analyse des Klon CDAAP0025 (Zugangsnummer: AY007125) bestimmt. Dieser Klon kodiert hMunc-93B ab Aminosäure 43 einschließlich des 3'-untranslatierten Bereichs, der nach 420 bp die Signalsequenz AATAAA für das Anhängen eines Poly-A-Schwanzes enthält (Proudfoot and Brownlee, 1976). Das Protein zeigt 41 % Homologie zu Unc-93 und wurde wegen seiner großen Ähnlichkeit mit mMunc-93 B (92 %) als hMunc-93B bezeichnet. Während der Erstellung dieser Arbeit wurde seine Sequenz auch von der Arbeitsgruppe von C. Wahlestedt (Karolinska Institute, Schweden) bestimmt und in der NIH Datenbank unter der Zugangsnummer CAC19791 eingetragen. Die Position des Gens im menschlichen Genom ist noch nicht genau bekannt, es ist aber wahrscheinlich dem Chromosom 2 oder 11 zuzuordnen.

Die Sequenz eines weiteren zu Unc-93 homologen murinen Proteins (mMunc-93) wurde durch Sequenzierung des ESTs IMAGE 557640 ermittelt. Die cDNA ist aufgebaut aus 304 bp 5'-untranslatierter Sequenz, 1266 bp offenem Leserahmen und 969 bp 3'-untranslatiertem Bereich, der ein Polyadenylierungssignal beinhaltet. Des weiteren sind im 3'-untranslatierten Bereich 14 direkt aufeinanderfolgende Wiederholung der Sequenz GTTT und 17mal hintereinander CA zu finden. Das 458 Aminosäuren lange Protein hat 54 % Homologie zur hydrophoben Domäne von Unc-93.

Das Plasmid IMAGE 415697 wurde aufgrund eines ESTs als zu unc-93 homolog identifiziert. Es kodiert ein Protein mit 56 % Homologie zum hydrophoben Abschnitt von Unc-93. Des weiteren zeigt es 81 % Homologie zu mMunc-93, weshalb es hMunc-93 genannt wurde. Das cDNA Insert besteht aus 103 bp 5'-untranslatierter Sequenz mit Kozaksequenz, 1374 bp offenem Leserahmen und 560 bp 3'-untranslatiertem Bereich mit einem Polyadenylierungssignal. Im humanen Genom ist es im chromosomalen Abschnitt 6q27 lokalisiert und besteht aus 8 Exons. Das Protein wurde bereits als Unc-93 homologes in der Datenbank erwähnt (Zugangsnummer NP 061847), wobei dort allerdings nicht ein, sondern zwei hypothetische Proteine beschrieben werden, von denen das eine von den Exons 1 bis 4 kodiert wird und das zweite von den Exon 5 bis 8. Die Sequenz des Klones IMAGE 415697 zeigt aber deutlich, daß eine mRNA existiert, deren Translation ein Protein der gesamten Länge ergibt. Es existiert allerdings auch ein Klon (IMAGE 415354, Zugangsnummer W92071), der 8 bp aus der Sequenz enthält, die nach der Sequenz des Plasmids IMAGE 415697 im Intron zwischen den Exons 4 und 5 stromaufwärts der Akzeptorsplicestelle vor dem fünften Exon liegt. der Rest der von diesem Plasmid bekannten Sequenz ist identisch mit der des Exons 5 von hMunc-93.

Weitere mit unc-93 verwandte Gene sind solche, die der ET-Familie angehören. Diese werden auf dem Gegenstrang eines Splice-faktors kodiert (Sureau et al., 1997). Ihre Funktion ist

unbekannt. Von diesen zeigt ET8 mit 40 % Ähnlichkeit auf Aminosäureebene die größte Übereinstimmung mit Unc-93.

Die Nukleotidsequenzen aller beschriebenen Gene, die aus ESTs bekannten Sequenzabschnitte sowie die Lage der für ihre Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang in Abb. 26 bis Abb.31 aufgeführt.

Ein Überblick über die Homologien zwischen allen ermittelten zu Unc-93 homologen Proteinen läßt sich Tab. 1 entnehmen.

Unc-93	MKFQKMGDSNTWDLVGEQQQRKKSRSPSRASRVDSSELLVGVENAAEALGLGKEQLEEE	60
hMunc-93	-----	
mMunc-93	-----	
hMunc-93B	-----	
mMunc-93B	-----	
GH10120	-----	
GH09628	-----	
ET8	-----	
Unc-93	ARRHKKQRSKSPALENIRKTSIHLLQKFGAIPKKKDDSVLLFRFHDIPDIPLES LCIRPK	120
hMunc-93	-----	
mMunc-93	-----	
hMunc-93B	-----	
mMunc-93B	-----	
GH10120	-----	
GH09628	-----	
ET8	-----	
Unc-93	EFFEEPKVF ⁻⁻⁻ SFRDMGREQQKAEVNEKCSYLFRGTS ⁻⁻⁻ SFDHDDHFELPTETGRVPEYDHF ⁻⁻⁻ CPI	180
hMunc-93	-----	
mMunc-93	-----	
hMunc-93B	-----MEAEPPLYP	9
mMunc-93B	-----	
GH10120	-----MT	2
GH09628	-----MV	2
ET8	-----	
Unc-93	HGSRRLPRNKLVTMQ ⁻⁻⁻ TLMH ⁻⁻⁻ SVDDEDNEDLAYIYGHDFLAKLV ⁻⁻⁻ RKKRE ⁻⁻⁻ EMMSGTEK ⁻⁻⁻ ERAN	240
hMunc-93	-----	
mMunc-93	-----	
hMunc-93B	MAGAAGPQGD ⁻⁻⁻ EDLLGVPDGPE-----APLDELVGAY ⁻⁻⁻ PNYNEEE ⁻⁻⁻ EERRY ⁻⁻⁻ YRRK ⁻⁻⁻	56
mMunc-93B	-----	
GH10120	GFTNAGFENDE-----PVKPKAGFEPDTAS ⁻⁻⁻ LR ⁻⁻⁻ EKVVLN ⁻⁻⁻ PGE ⁻⁻⁻	38
GH09628	YPSDTS ⁻⁻⁻ DANNE ⁻⁻⁻ EELALEH ⁻⁻⁻ SVAHGNVHGNGTGTGGSSPGTTTAPNGDNKVNQRHYEP ⁻⁻⁻ AE ⁻⁻⁻	59
ET8	-----MSP ⁻⁻⁻ ES ⁻⁻⁻	5
Unc-93	KIKR ⁻⁻⁻ KIMS ⁻⁻⁻ NLWIL ⁻⁻⁻ SVAF ⁻⁻⁻ LF ⁻⁻⁻ LF ⁻⁻⁻ TAF ⁻⁻⁻ NGL ⁻⁻⁻ QNL ⁻⁻⁻ QTS ⁻⁻⁻ VNGD ⁻⁻⁻ -----L ⁻⁻⁻ GSD ⁻⁻⁻ SL ⁻⁻⁻ VAL ⁻⁻⁻ YLS ⁻⁻⁻ LAI	292
hMunc-93	--MDR ⁻⁻⁻ SL ⁻⁻⁻ RNV ⁻⁻⁻ LVV ⁻⁻⁻ SFG ⁻⁻⁻ FL ⁻⁻⁻ LL ⁻⁻⁻ FTAY ⁻⁻⁻ GGL ⁻⁻⁻ QSL ⁻⁻⁻ QSS ⁻⁻⁻ LYSEE ⁻⁻⁻ -----GL ⁻⁻⁻ GT ⁻⁻⁻ AL ⁻⁻⁻ ST ⁻⁻⁻ LY ⁻⁻⁻ GG ⁻⁻⁻ MLL	52
mMunc-93	--MER ⁻⁻⁻ SL ⁻⁻⁻ KN ⁻⁻⁻ VL ⁻⁻⁻ VV ⁻⁻⁻ SCG ⁻⁻⁻ FL ⁻⁻⁻ LL ⁻⁻⁻ FTAY ⁻⁻⁻ GGL ⁻⁻⁻ QNL ⁻⁻⁻ QSS ⁻⁻⁻ LYSEQ ⁻⁻⁻ -----GL ⁻⁻⁻ GV ⁻⁻⁻ AT ⁻⁻⁻ ST ⁻⁻⁻ LY ⁻⁻⁻ AS ⁻⁻⁻ VLL	52
hMunc-93B	--RLG ⁻⁻⁻ VL ⁻⁻⁻ KN ⁻⁻⁻ VLA ⁻⁻⁻ AS ⁻⁻⁻ AG ⁻⁻⁻ ML ⁻⁻⁻ TY ⁻⁻⁻ GV ⁻⁻⁻ YL ⁻⁻⁻ GLL ⁻⁻⁻ QML ⁻⁻⁻ LIL ⁻⁻⁻ HYDE ⁻⁻⁻ TYR ⁻⁻⁻ -EVKYGNMGL ⁻⁻⁻ PD ⁻⁻⁻ IDS ⁻⁻⁻ KMLM	113
mMunc-93B	-----	
GH10120	--KWR ⁻⁻⁻ IL ⁻⁻⁻ KN ⁻⁻⁻ IS ⁻⁻⁻ IS ⁻⁻⁻ IA ⁻⁻⁻ FM ⁻⁻⁻ VQ ⁻⁻⁻ FT ⁻⁻⁻ AF ⁻⁻⁻ QGT ⁻⁻⁻ AN ⁻⁻⁻ LOSS ⁻⁻⁻ INAKD ⁻⁻⁻ -----GL ⁻⁻⁻ GT ⁻⁻⁻ V ⁻⁻⁻ SL ⁻⁻⁻ SA ⁻⁻⁻ IYA ⁻⁻⁻ AL ⁻⁻⁻ VV	90
GH09628	--RF ⁻⁻⁻ LI ⁻⁻⁻ TK ⁻⁻⁻ NV ⁻⁻⁻ VV ⁻⁻⁻ IG ⁻⁻⁻ LAF ⁻⁻⁻ MI ⁻⁻⁻ HFT ⁻⁻⁻ AF ⁻⁻⁻ HT ⁻⁻⁻ SN ⁻⁻⁻ LOSS ⁻⁻⁻ VNADK ⁻⁻⁻ -----AL ⁻⁻⁻ GTT ⁻⁻⁻ TL ⁻⁻⁻ AV ⁻⁻⁻ IY ⁻⁻⁻ GSL ⁻⁻⁻ LIL	111
ET8	----K ⁻⁻⁻ KL ⁻⁻⁻ FN ⁻⁻⁻ IV ⁻⁻⁻ IL ⁻⁻⁻ GV ⁻⁻⁻ AF ⁻⁻⁻ MF ⁻⁻⁻ MT ⁻⁻⁻ AF ⁻⁻⁻ QTC ⁻⁻⁻ GN ⁻⁻⁻ V ⁻⁻⁻ AQT ⁻⁻⁻ VI ⁻⁻⁻ RS ⁻⁻⁻ LN ⁻⁻⁻ ST ⁻⁻⁻ DF ⁻⁻⁻ HSS ⁻⁻⁻ GY ⁻⁻⁻ TS ⁻⁻⁻ LAI ⁻⁻⁻ IY ⁻⁻⁻ GV ⁻⁻⁻ FSA	61

Unc-93	SSLFVPS-----FMINRLGCKLTFLIAIFVYFLYIVINLRPTYSSMIPASIFCGIAAS	345
hMunc-93	SSMFLPP-----LLIERLGCKGTIILSMCGYVAFSVGNFFASWYTLIPTSILLGLGAA	105
mMunc-93	SSMFLPP-----LLIKKCGCKWTIIVGSMCCYVVFSLGNFHANWYTLIPTSILLGLGAA	105
hMunc-93B	GINVTEIAALLYTPVLIIRFFGTKWMMFLAVGIYALFVSTNYWERYYTLVPSAVALGMAIV	173
mMunc-93B		
GH10120	SCIFLPT-----LTIIRKLTVKWTLVCSMLCYAPYIAFQLFPRFYTLVPAGILVGMGAA	143
GH09628	SNIFLPM-----TVIRWFGCRLTMALALFAYMPYIAAQFYPRFETLIPAALMVGFGGG	164
ET8	SNLITE-----SVVAIVGPQIPMFVSGLFYSMYIAVFIQPFPPWSFYTASVFICIAAA	113
Unc-93	CIWGAKCAYITEMGIRYASLNFE--QTTVIVR-----FFGYFFMIVHCGQVVGNMVSSY	398
hMunc-93	PLWSAQCTYLTITGNTHAEKAG-K-RGKDMVNQ-----YFGIFFLIFQSSGVWGNLISSL	158
mMunc-93	PLWSAQGTYLTITMGNLQAEKVG-K-LGKDVVNQ-----YFGIFFLVFQSSGVWGNLISSL	158
hMunc-93B	PLWASMGNYITRMAQKYHEYSHYKEQDQGGMKQRPPRGSHAPYLLVFQ-AIFYSFFHLSF	233
mMunc-93B		
GH10120	PMWASKATYLTQVGVYAKITE-Q-AVDAIIVR-----FFGFFFLAWQSAELWGNLISSL	196
GH09628	PLWCSKCTYLTIVSEALTQVRGKSRKDVNTVK-----FFGLFFIFYQMAQVWGNLISSL	219
ET8	VLWTAQGNCLITNSDEHTIGRN-----S-GIFWALLOSSLFFGNLYIYF	156
Unc-93	IFTLSSYSQALRGPEDSIYDS-----CGYQFPKINLSDLTELAESNLARPPQKV	445
hMunc-93	VF-----GQTPSQETLPEE---QLT-----SCGASDCL---MATTINSTORPSQQL	199
mMunc-93	VF-----GKMSMQEAIPEE---QLM-----SCGAKDCL---MGPAAINSTHPSQQL	199
hMunc-93B	ACAQLPMIYFLNHLYDLNHTLVNVQ-----SCGTNSHG---ISGFINKTVLRTLPRSG	283
mMunc-93B		
GH10120	VLSSGAHGGGSSNTVISEE---DLQ-----FCGANFCT---TGSGGHGNLERPPEDE	243
GH09628	VLTLAPAAQSAANDSFELEVQRELERNRVAELCCARFCPG---VGAEANPNLVPPAPEQ	276
ET8	AWQKTOISEHDRRTVFIALT--VIS-----LVGTVLFFL---IRKPDPENVLGEEESC	205
Unc-93	YVAVCLAYLACVII SGMIMSMFLNALAKDARNR---K-MAQKFNSEIFYLMLKHLINIKF	501
hMunc-93	VYTLGIIYTGSGVLAVLMIAAFLOPIRDVQRESEGEK--KSVFPWSTLLSTFKLYRDKRL	257
mMunc-93	IYTLGIIYTGCGVLAILLVAVFLESLEDK-LENEGERRPRPPPLWSTLLSTFMLFRDKRL	258
hMunc-93B	NLIVVESVLMMAVAFLAMLVLGLCGAAYRPTEEIDLR---SVGWGNIFQLPFKHVRDYRL	340
mMunc-93B	NLIVVESVLMMAVAFLAMLVLGLCGAAYRPTEEIDLR---SVGWGNIFQLPFKHVRDFRL	71
GH10120	IFEISMIYLS CIVAAVCI IAFFLDPLKRYGKRGKSNSAAELSGLQLLSATFRQMKKPNL	303
GH09628	IQLLNSIFLTCMAAAVMMIFGVSSLKRYGVKR-GDTG-DGMSGLKLLTVTINLLRKRQ	334
ET8	DDQDMEATESAQNNTKAVDAFKSLRLCVTREMLL--SVTTVYTGLELTFVSGVYG--	262
Unc-93	MLLVPLTIFNGLEQAFVLGVYTKAFVGCGLGIWQIGFV--MACFG-ISDAVCSLVFGPLI	558
hMunc-93	CLLILLPLYSGLQQGFLSSEYTRS YVTCTLGIQFVGYV--MICFS-ATDALCSVLYGKVS	314
mMunc-93	CLLMFLPLYSGFQQEFLSGEYTKSYVTALGIHFVGYV--MICFS-AMTALCSLLYGKIS	315
hMunc-93B	RHLVPPFFIYSGFEVLFACGTGIALGYVCSVGLERLAYL--LVAYS--LGASAASLLGLLG	396
mMunc-93B	RHLVPPFFIYSGFEVLFACGTGFALGYVCSMGLERLAYL--LTAYS--LGASASSVLGLLG	127
GH10120	QLLIPITVFIGMEQAFIGADFTQAYVACALGVNKGIFV--MICFG-VVNALCSILFGSVM	360
GH09628	ILMLPITMFIGLEEAFLAVDFTRSFVACGWGISRIGFA--MICFG-VANAVAAGIAGALV	391
ET8	TCIGAVNKFTEEEKSLIGLSGIFIGIGEILGGSFLGLLSKNSRFGRNPVVLGLTVHFVA	322
Unc-93	KLFGRMPLFVFGAVVNLLMIVTLMVWPLNAADTQ---IFYVVAAMWGMADGVWNTQINGF	615
hMunc-93	QYTGRAVLYVLGAVTHVSCMIALLLWRPRADHLA---VFFVFSGLWGVADAVWQTQNNAL	371
mMunc-93	KYTGRAALYALGAAIHFSCIVVFLWHPNTNQLP---VFFVLSGLWGMSDAVWQTQNNAL	372
hMunc-93B	LWLPRPVPLVAGAGVHLLLTFILFFWAPVPRVLQHSWILYVAAALWGVGSAINKTGLSTL	456
mMunc-93B	LWLPHSAPLVAGAGLHLLLTLSLFFWAPAPRVLQHSWI-----	165
GH10120	KYIGRTPIIVLGAVVHFTLITVELFWRPNPDNPI---IFYAMSGLWGVGDAVWQTQINGL	417
GH09628	ERIGRVTLAALCAVVNLCLLTYMYTWEAREGDYM---SYCTFAAVWVICDGVVLVVVNAF	448
ET8	FYLIFLNMPGDAP IAPVEGTNSIAYIRPSKE-----VAILCSFLLGLGDCSFNTQLLSI	376
Unc-93	WVALVGRQ-SLQFAFTKYRFWESLGIAIGFALIRHVTVEIYLLITFFMLLGLMCGFLAIE	674
hMunc-93	YGVLFEEK--SKEAAFANYRLWEALGFVIAFGYSMFLCVHVKLYILLGVLSTMVAYGLVE	429
mMunc-93	FGVLFEE--NKEPAFANYRLGEAIGFVIAFGYSSFLCVSTKLYILLGVLSLAMVGYGTVE	430
hMunc-93B	LGILYEDKERQDFIFTIYHWQAVAIFTVY-LGSSLHMKAKLAVLLVTLVAAAVSYLRME	515
mMunc-93B		
GH10120	YGLLFRR--NKEAAF SNYRLWESAGFVIAAYATTLCTQMKLYILLAVLTLGCIGYVIVE	475
GH09628	YGILFPN--HLIAAYSNFRWLWESTG SVIGYVISSQLCTSTKLVILIFILVGCVGYGLIE	506
ET8	LGFLYSE--DSAPAFVAFKVFQSCAAVAFYSNYLLHWQLVMVIFGFFGTISFFTVE	434

```

Unc-93      NFDHI--IKFWHHLI-----HTSCPEKEPLDDRNSDFE----- 705
hMunc-93   CVESK--NPIRPHAP-----GQVNQAEDE-EIQTKM----- 457
mMunc-93   YLEVK-AASKVLGA-----EKKNQAEFE-EMKTKI----- 458
hMunc-93B  QKLRRGVAPRQPRIPRPQHKVRGYRYLEEDNSDESDAEGEHGDGAEAAAAPPAGPRPGPEP 575
mMunc-93B
GH10120    ILYRK--KQRKLLKQ-----EKLEAAEKKEEAAAAAAAAAALAAAEAGADGVVEE 521
GH09628    YRFWQ--KQKNLEVM-----LS----- 521
ET8        W----- 435

Unc-93      -----
hMunc-93   -----
mMunc-93   -----
hMunc-93B  AGLGRRPCPYEQAQGGDGPEEQ 587
mMunc-93B
GH10120    TDDELDDLEEDIVVTRL----- 539
GH09628    -----
ET8        -----
    
```

Abb. 4: Alignment der Aminosäuresequenzen aller beschriebenen zu Unc-93 homologen Proteine. Der Sequenzvergleich wurde unter Zuhilfenahme des Programmes ClustalW (Thompson et al., 1994) durchgeführt. In allen Proteinen identische Aminosäuren sind dunkelgrau ■ markiert, in allen bis auf einer Sequenz vorhandene in mittelgrau ■ und in den meisten Sequenzen konservierte in hellgrau ■. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind eingerahmt und mögliche Erkennungssequenzen für Proteinkinasen unterstrichen dargestellt (⋯ Tyrosinkinase, — CaseinkinaseII, --- Proteinkinase C, cAMP und cGMP-abhängige Proteinkinase). Die Nummern am Zeilenende geben die Aminosäurepostion an.

Ähnlichkeit [%] Identität [%]	Unc-93	hMunc-93	mMunc-93	hMunc-93B	mMunc-93B	GH10120	GH09628	ET8
Unc-93		56	54	41	45	57	51	40
hMunc-93	32		81	41	46	61	53	41
mMunc-93	31	71		39	38	61	53	39
hMunc-93B	20	24	24		92	42	38	34
mMunc-93B	23	27	16	89		40	33	27
GH10120	35	4	42	22	15		62	38
GH09628	31	32	31	18	11	41		37
ET8	21	22	21	13	8	23	20	

Tab. 1: Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von Unc-93 und seinen Homologen in Prozent. In der unteren linken Hälfte der Tabelle ist der prozentuale Anteil identischer Aminosäuren zweier verglichener Proteine angegeben, in der oberen rechten Hälfte der prozentuale Anteil unter Berücksichtigung konservativer Austausche.

4.2 Unc-93 Homologe werden teils gewebespezifisch, teils ubiquitär exprimiert

Northernblotanalysen mit Sonden für die oben beschriebenen cDNAs belegen, daß alle beschriebenen Säugergene tatsächlich exprimiert werden (Abb. 5).

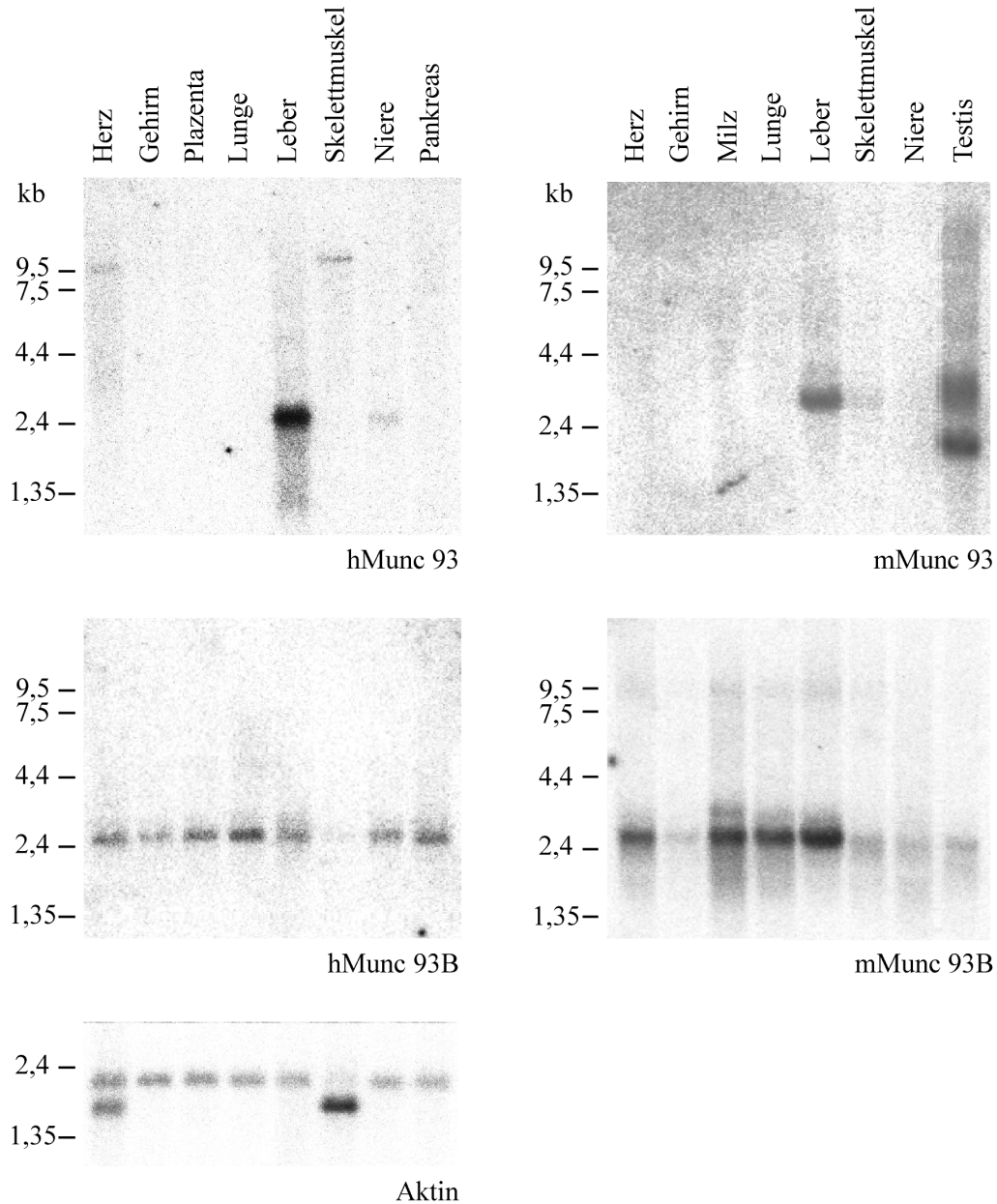


Abb. 5: Es gibt ubiquitär und gewebespezifisch exprimierte Munc-93 Isoformen. Hybridisierung von ^{32}P markierten durch Zufallsinitiiierung generierten cDNA Sonden wurde durch Autoradiographie detektiert. Folgende cDNA-Fragmente wurden für die Herstellung der einzelnen Sonden verwendet: hMunc-93: 595 bp und 845 bp *HincII/MunI* Fragmente des Plasmids IMAGE 415697; hMunc-93B: 791 bp *PaeI/Eco72I*-Fragment des Plasmids IMAGE 2791017; mMunc-93 900 bp *EcoRI/NcoI* Fragment des Plasmids IMAGE 557640; mMunc-93B: 317 bp *NcoI/EcoRI* Insert des Klonen pGemT mMunc-93B (317 bp); β -Aktin: 2 kb menschliche β -Aktin-cDNA.

hMunc93 wird besonders stark in der Leber transkribiert (2,5 kb). mRNA gleicher Größe ist in der Niere zu finden. Im Herzen und Skelettmuskel konnten deutlich längere Transkripte detektiert werden (9,5 bzw. 10,5 kb). In Gehirn, Plazenta, Lunge und Pankreas war hMunc93 mRNA nicht nachweisbar.

mMunc93 hat ein anderes Expressionsmuster. Neben einem starken Signal bei 2,9 kb in der Leber ist im Skelettmuskel eine deutlich schwächere Bande gleicher Größe vorhanden. Zahlreiche weitere Hybridisierungssignale sind in den Testis identifizierbar. Neben zwei starken Signalen bei 2,0 und 3,0 kb befinden sich mehrere schwächere Banden im Bereich zwischen 5,0 und 12,0 kb. In keinem anderen der untersuchten Organe ist mMunc 93 mRNA in nachweisbarer Menge vorhanden.

hMunc 93B wird mit leichten Schwankungen im Expressionslevel ubiquitär transkribiert. Die Größe der mRNA beträgt 2,5 kb.

Ebenso wird mMunc 93B ubiquitär mit einer Transkriptgröße von 2,5 kb exprimiert, wobei die Signalstärke in Herz, Milz, Lunge und Leber etwas oberhalb derjenigen in Gehirn, Skelettmuskel, Niere und Testis liegt. Des Weiteren sind zumindest in den Organen starker Expression 9,5 kb große Transkripte zu sehen und in der Milz auch eines von 3,0 kb Länge.

Die verwendeten Northernblotmembranen sind kommerziell erhältlich und mit 2 µg mRNA pro Bahn beladen worden. Um die gleichmäßige Verteilung der mRNA zu kontrollieren, wurde exemplarisch der Northernblot mit mRNA aus menschlichen Geweben mit einer 2 kb langen β -Aktinsonde hybridisiert. Es zeigt sich, daß wie erwartet jede Spur etwa die gleiche Menge an mRNA enthält. Im Herzen und im Skelettmuskel sind neben β -Aktin auch α - oder γ -Aktin vertreten. Entsprechende mRNAs werden ebenfalls mit der β -Aktinsonde detektiert, lassen sich aber aufgrund ihrer Länge (1,6 statt 2,0 kb) von der β -Aktin mRNA unterscheiden (Lamballe et al., 1991).

4.3 Analyse der Aminosäuresequenz der identifizierten Unc-93 Homologen

Von allen Proteinen wurden Hydropathiediagramme erstellt. Diese geben Hinweise darauf, ob es sich bei einem Protein um ein Transmembranprotein handeln könnte. Die Analyse wurde mit dem Programm TMPred (Hofmann and Stoffel, 1993) durchgeführt. Für die Vorhersagen wird in einem gegebenen Fenster von 17 – 20 Aminosäuren die Änderung der freien Gibbs Energie für den Fall betrachtet, daß jede Aminosäureseitenkette einzeln von einer ethanolischen Umgebung in Wasser überführt wird. Die Summe der Energieänderungen dividiert durch die Anzahl der Aminosäuren in diesem Fenster ergibt den Hydropathieindex. Dieser wird gegen die Position der ersten Aminosäure des Fensters aufgetragen. Negative Hydropathieindizes spiegeln hydrophile Bereiche wider, positiv Werte zeigen hydrophobe Abschnitte an. Bei Maxima größer 1000 cal/mol Aminosäureste ist die Existenz einer Transmembrandomäne an dieser Stelle möglich. Eine Vorhersage über die vermutliche

Orientierung der membranspannenden Domäne, d. h., ob sie die Membran von außen nach innen oder von innen nach außen durchläuft, kann aus einem Vergleich der Ladungen der Aminosäuren beiderseits der Membran getroffen werden. Dabei wird die Seite, die mehr positive Ladungen enthält, dem Zytoplasma zugeordnet (Hartmann et al., 1989).

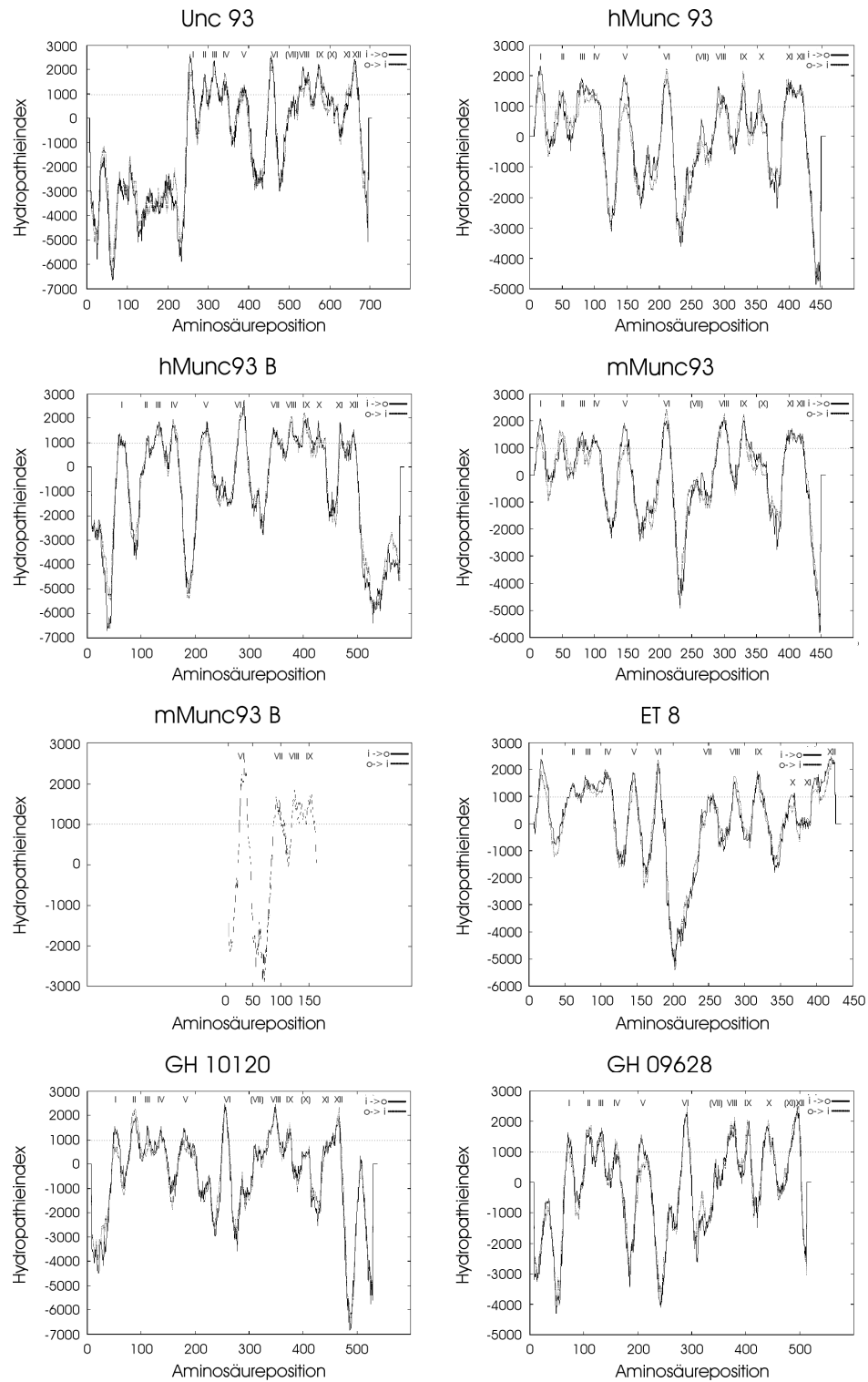


Abb. 6: Hydropathiediagramm aller untersuchten Proteine. Aufgetragen ist der Hydropathieindex eines Fensters aus 17 Aminosäuren gegen die Position der ersten Aminosäure dieses Fensters. Liegt der Hydropathieindex bei mehr als 1000 cal/mol Aminosäurereste, ist anzunehmen, daß sich an dieser Stelle eine Transmembrandomäne befindet.

Die hydrophoben Abschnitte aller Proteine zeigen gemeinsame Muster. Am deutlichsten ist das separierte Maximum in der Mitte jedes Diagramms, das von längeren hydrophilen Sequenzen flankiert wird. Ein Vergleich des Kurvenverlaufs aller Diagramme läßt auf 10 oder 12 Transmembrandomänen schließen, wobei das einzelne separate Maximum der sechsten Transmembrandomäne zuzuordnen ist. Die siebte und zehnte Spitze erreichen nicht bei allen Proteinen einen Hydropathieindex von 1000 cal/mol Aminosäurereste. Es könnte sich dennoch um Transmembrandomänen handeln, die aus funktionellen Gründen mehr polare Aminosäureseitengruppen enthalten als üblich. Es ist aber auch möglich, daß die unpolaren Aminosäuren zu einem Abschnitt gehören, der im Inneren des Proteins liegt und nicht mit dem Zytoplasma in Kontakt kommt.

Bezieht man das Sequenzalignment aus Abb. 4 in den Vergleich der Hydropathiediagramme mit ein, so wird deutlich, daß sich die Homologie der identifizierten Säuger- und Drosophilaproteine auf die ausgeprägt hydrophobe Domäne von Unc-93 beschränkt, während keine Ähnlichkeit zwischen den N-terminalen 245 hydrophilen Aminosäuren von Unc-93 und den wenn auch deutlich kürzeren hydrophilen N-terminalen Sequenzen der beiden Proteine aus *Drosophila melanogaster* (GH10120 und GH09628) oder hMunc-93B zu finden ist. hMunc-93, mMunc-93 und ET8 fehlen hydrophile N-terminale Sequenzen völlig.

Eine computergestützte Analyse der Aminosäuresequenzen aller identifizierten Proteine mit dem Programm PROSITE PFSCAN (Gribskov et al., 1987; Bucher et al., 1996) ergab, daß, abgesehen von hMunc-93B bei allen eine Ähnlichkeit mit einem Muster für Transporter von Zuckern oder anderen Molekülen vorhanden ist (Abb. 7). Diese Transporter besitzen 12 Transmembrandomänen und zeichnen sich durch ein GRR- oder GRK-Motiv zwischen den Transmembranhelices zwei und drei sowie acht und neun aus. Da drei Aminosäuren lange Motive zu kurz sind, um Proteine eindeutig in eine Familie eingruppiert zu können, wurde das Motiv um zwei Konsensussequenzen erweitert, von denen eine am Ende der vierten Transmembrandomäne beginnt und die anschließende zytoplasmatische Schleife einschließt und die zweite das zweite GR[R/K]-Motiv beinhaltet.

GR[R/K]-Motiv	a)	G	R	R	K
Unc-93		G	C	K	
hMunc-93		G	C	K	
mMunc-93		G	C	K	
GH10120		I	R	K	
GH09628		G	C	R	
ET8		G	P	Q	
hMunc-93B		G	T	K	
GLUT1		G	R	R	

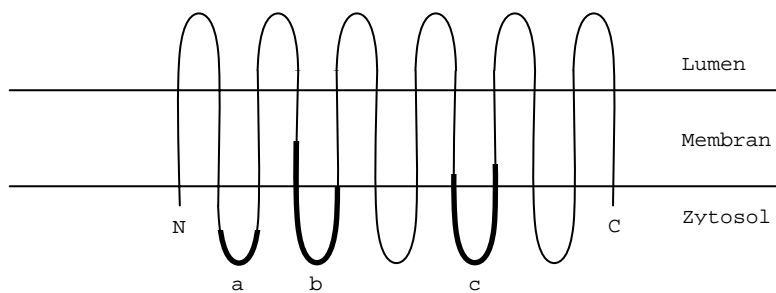
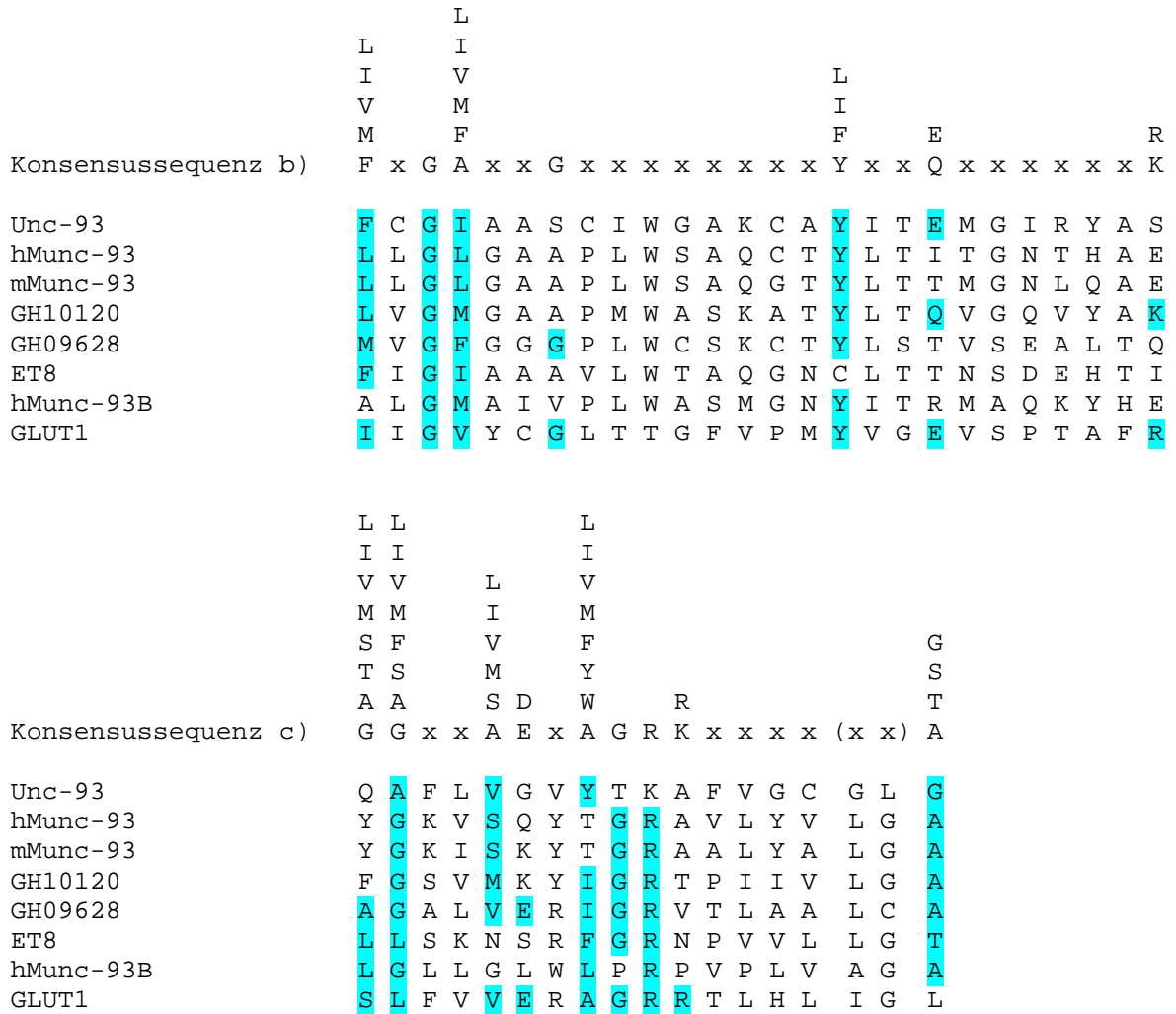


Abb. 7: Alignment der Konsensussequenzen eines Zuckertransporters mit den entsprechenden Sequenzen aus Unc-93 und seinen Homologen. Transporter dieser Familie zeichnen sich durch zwei Konsensussequenzen und zwei GR[R/K]-Motive aus. Das erste GR[R/K]-Motiv (a) befindet sich zwischen den Transmembrandomänen zwei und drei des 12-Transmembrandomänenproteins. Die erste Konsensussequenz (b) ist am Ende der vierten Transmembrandomäne zu finden und schließt die zytoplasmatische Schleife zwischen der vierten und fünften Transmembrandomäne mit ein. Das zweite GR[R/K]-Motiv ist Bestandteil der zweiten Konsensussequenz (c), die zwischen den Transmembrandomänen acht und neun liegt. Aminosäuren, die denjenigen der Konsensussequenzen entsprechen, wurden grau unterlegt. Die Position der verschiedenen Motive ist der Schemazeichnung zu entnehmen.

Betrachtet man die entsprechenden Aminosäuresequenzen von hMunc-93B, so sind auch bei diesen noch Ähnlichkeiten mit den Konsensussequenzen der Zuckertransporter vorhanden. Größere Übereinstimmung weist hMunc-93B im Aminosäureabschnitt 309 bis 513 mit Motiven bakterieller ABC-Transporter auf. Diese 6-Transmembrandomänenproteine katalysieren einen ATP-abhängigen Export von Kohlenhydraten und anderen Stoffen (Reizer et al., 1992) (Abb. 7).

		L		L		G				L	P																			
		I	L	I	G	S				I	G																			
		M	I	M	S	A				M	S																			
		S	M	C	T	I				G	N																			
Konsensussequenz	T	x	x	W	x	x	A	C	x	V	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	(x	x						
hMunc-93B	A	I	F	T	V	Y	L	G	S	S	L	H	M	K	A	K	L	A	V	L	L	V	T	L	V	A	A	A	V	
				L																										
				I	H																									
				M	R																									
				F	S																									
Konsensussequenz	x)	P	T	x	Y	x	x	x	x	x	x	Q																		
hMunc-93B	S	Y	L	R	M	E	Q	K	L	R	R																			

Abb. 8: Alignment der Konsensussequenz eines ABC-Transporters mit der entsprechenden Sequenz aus hMunc-93B. Aminosäuren, die denen der Konsensussequenz entsprechen, wurden grau unterlegt.

Neben diesen Motiven sind bei allen Proteinen mindestens eine potentielle N-Glykosylierungsstelle sowie mehrere Kinaseerkennungssequenzen vorhanden (vgl. Abb. 4). Die N-Glykosylierungssequenz befindet sich mit Ausnahme von ET8 in allen Proteinen in dem Sequenzabschnitt, der zu den Aminosäuren 412 – 439 von Unc-93 aus *C. elegans* homolog ist. Bei ET8 liegt er etwas weiter entfernt in der Position der Aminosäuren 459 – 462 von Unc-93. Die Existenz dieses Motivs in einem so eng umgrenzten Bereich legt die Vermutung nahe, daß diese Position tatsächlich für Glykosylierungen genutzt wird.

Eine ebenso markante Positionierung möglicher Phosphorylierungsstellen ist nicht zu beobachten. Im Bereich der zu den Aminosäuren 226 bis 248 aus Unc-93 homolog ist, befindet sich in fünf der sieben in diesem Abschnitt bekannten Sequenzen ein Phosphorylierungsmotiv der Proteinkinase C. Ebenso ist im zu Aminosäure 407 bis 417 homologen Sequenzabschnitt in fünf der sieben Proteine eine Caseinkinase 2 Phosphorylierungssequenz vorhanden. Zahlreiche weitere potentielle Phosphorylierungsstellen verschiedener Kinasen sind in dem zu Aminosäuren 470 bis 494 von Unc-93 homologen Bereich existent.

4.4 hMunc 93 ist ein integrales Membranprotein in der Plasmamembran

Betrachtet man die Hydropathiediagramme von Unc-93 und seinen Homologen, so fällt der stark hydrophobe Charakter dieser Proteine auf. Um zu überprüfen, ob hMunc-93 tatsächlich ein Transmembranprotein ist, wurde es *in vitro* in Gegenwart von Hundepankreasmembranen translatiert. Seine subzelluläre Lokalisation wurden anschließend durch Zellfraktionierungs- und Immunfluoreszenzexperimente bestimmt.

4.4.1 Membranintegration von hMunc-93 *in vitro*

In vitro in Gegenwart von Hundepankreasmembranen translatiertes, [³⁵S]-Methionin markiertes hMunc-93 wurde durch ein Saccharosekissen zentrifugiert und das Pellet sowie der durch Trichloressigsäurefällung aufkonzentrierte Überstand auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

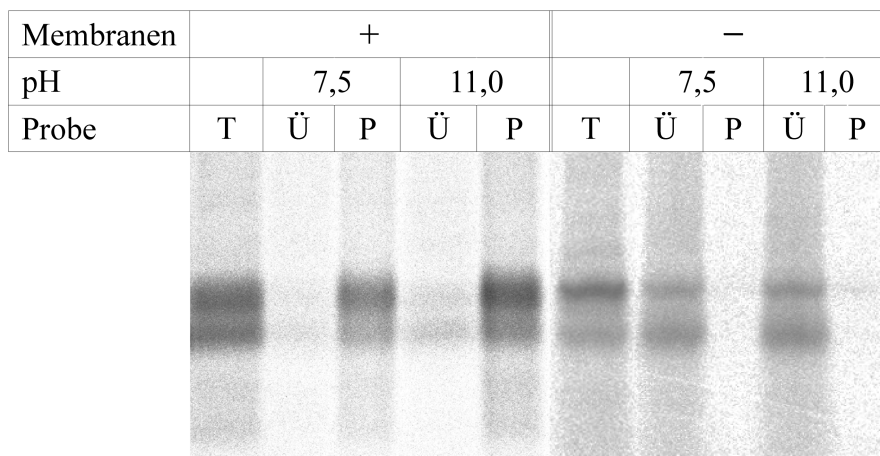


Abb. 9: hMunc-93 ist ein integrales Membranprotein. hMunc93 wurde *in vitro* in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin und in An- oder Abwesenheit von Hundepankreasmembranen translatiert (T) und durch ein Saccharosekissen zentrifugiert. Bei pH 7,5 werden alle membranassoziierten Proteine mit den Mikrosomenmembranen pelletiert. Bei pH 11,0 gelangen nur integrale Membranproteine in das Pellet (P), während periphere Membranproteine und solche, die in das Lumen der Vesikel sezerniert wurden, im Überstand (Ü) verbleiben. Für die elektrophoretische Analyse wurden die Proben 30 min bei 37 °C in Probenpuffer mit 4 M Harnstoff inkubiert und auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel mit 4 M Harnstoff aufgetrennt.

Abb. 9 zeigt, daß hMunc-93 sowohl bei pH 7,5 als auch bei pH 11 in der Pelletfraktion zu finden ist. Während bei neutralem pH-Wert auch membranassoziierte Proteine mit den Membranen pelletiert werden, ist dies im Alkalischen durch die Denaturierung der Proteine nicht mehr möglich. Des weiteren öffnen sich die Membranvesikel bei pH 11, und Proteine, die in das Lumen der Vesikel sezerniert wurden, werden freigesetzt (Howell and Palade,

1982). Aus Abb. 9 geht somit zweifelsfrei hervor, daß hMunc-93 ein integrales Membranprotein ist.

Abb. 9 zeigt weiterhin, daß das aus dem Klon IMAGE 415697 isolierte DNA-Fragment *in vitro* mit SP6-RNA-Polymerase transkribiert und die erhaltene mRNA anschließend translatiert werden kann. Nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sind zwei Banden mit einer Größe von etwa 40 bzw. 43 kDa nachweisbar. Sie sind damit etwas kleiner als es ihrer aus der Aminosäuresequenz berechneten Größe von 50 kDa entspricht. Warum nicht eine sondern zwei Banden zu sehen sind, ist unbekannt, es fällt jedoch auf, daß sich das Verhältnis der Proteinmenge in beiden Banden während der Zentrifugation verschiebt. Protein, das im Überstand verbleibt, zeigt hauptsächlich das Laufverhalten des niedermolekularen Produktes, während das höhermolekulare eher in der Pelletfraktion zu finden ist.

Für die Analyse des *in vitro* translatierten hMunc-93 mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proben nicht gekocht, da die Proteine dabei im Probenpuffer Aggregate bilden, die teilweise nicht einmal in das 5 %ige Sammelgel einwandern können (Abb. 10, Bahn 1). Werden die Proben vor ihrer Analyse 30 min bei 37 °C inkubiert, so wandert zumindest ein Teil des Proteins in monomerer Form. Durch einen Zusatz von 4 M Harnstoff zu den Proben und zum Gel wird die Tendenz zur Aggregation weiter verringert, aber auch unter diesen Bedingungen läuft nach einer Behandlung der Proben bei 37 °C (Abb. 10, Spur 4) mehr Protein als Monomer in das Trenngel ein als nach dem Aufkochen (Abb. 10, Spur 3).

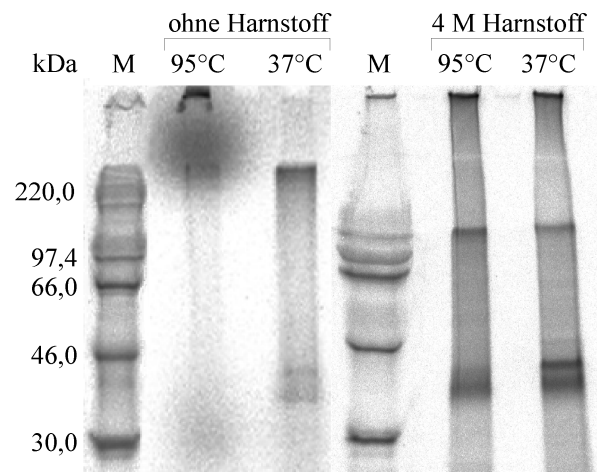


Abb. 10: Kochen in Gegenwart von SDS führt zur Aggregation von hMunc-93. *In vitro* in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin translatiertes hMunc-93 wurde in Probenpuffer 10 min bei 95°C denaturiert (Spuren 1 und 3) oder 30 min bei 37°C inkubiert (Spuren 2 und 4) und anschließend in einem SDS-Polyacrylamidgel ohne Zusatz (Spur 1 und 2) oder mit 4 M Harnstoff analysiert (Spur 3 und 4). Wie das Gel enthielten auch die Proben im letzten Fall 4 M Harnstoff.

4.4.2 Subzelluläre Lokalisation von hMunc-93

4.4.2.1 Zellfraktionierung transient transfizierter HEK293-Zellen

Daß hMunc-93 nicht nur *in vitro* in Membranen inseriert wird, sondern auch, wenn es in HEK293-Zellen überexprimiert wird, konnte durch eine Analyse der Membranfraktion transient transfizierter Zellen gezeigt werden (Abb. 11).

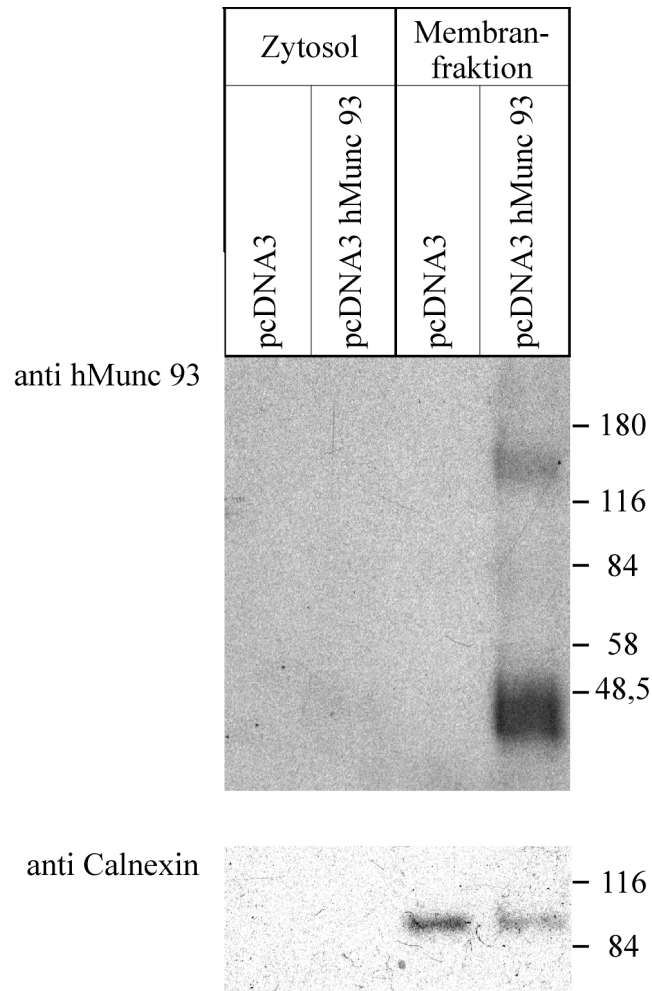


Abb. 11: In HEK293-Zellen überexprimiertes hMunc-93 ist in der Membranfraktion zu finden. Westernblot zur Analyse zytosolischer und membrangebundener Proteine 48 h nach einer transienten Transfektion von HEK293-Zellen mit pcDNA3 Leervektor oder pcDNA3 hMunc-93. Zur Kontrolle der Menge analysierter Membranproteine wurde der Blot gestrippt und mit einem anti-Calnexin-Antikörper entwickelt.

HEK293-Zellen wurden mit pcDNA3 hMunc-93 oder pcDNA3 Leervektor nach der Calciumphosphatmethode transient transfiziert und 48 h später weiterverarbeitet. Eine Kotransfektion mit pEGFP-C3 belegte für beide Plasmide eine Transfektion von mindestens 80 % der Zellen (nicht gezeigt). Das durch mechanischen Aufschluß dieser Zellen entstandene Lysat wurde von Zellkernen und intakten Zellen befreit, um dann die Membranfraktion durch einen Ultrazentrifugationsschritt vom Zytosol trennen zu können. Der Nachweis von

hMunc-93 in der Membranfraktion der mit pcDNA3 hMunc-93 transfizierten Zellen gelang im Westernblotverfahren mit einem peptidspezifischen anti hMunc93 Antiserum, das gegen den C-Terminus von hMunc93 gerichtet ist. In Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, ist kein hMunc-93 nachweisbar. Um die Menge analysierter Membranproteine zu kontrollieren, wurden die gebundenen Antikörper von der Blotmembran entfernt, um die Membran anschließend mit einem Antikörper gegen Calnexin, ein Protein in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, zu entwickeln.

Wie nach der Translation *in vitro* sind auch nach der *in vivo* Synthese von hMunc-93 zwei Banden zu sehen (43 und 48 kDa) und ferner eine 141 kDa-Bande.

4.4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie von CHO-K1-Zellen, die hMunc-93 transient überexprimieren

Aus den bisherigen Ergebnissen geht hervor, daß hMunc-93 ein integrales Membranprotein ist. Um die Membran, in der es *in vivo* vorliegt, zu bestimmen, wurden EGFP-hMunc-93 Fusionsproteine in CHO-K1 Zellen transient überexprimiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. CHO-K1 Zellen eignen sich für die Mikroskopie besser als die bisher verwendeten HEK293-Zellen, weil sie größer und flacher sind, was die Unterscheidung verschiedener Zellkompartimente erleichtert.

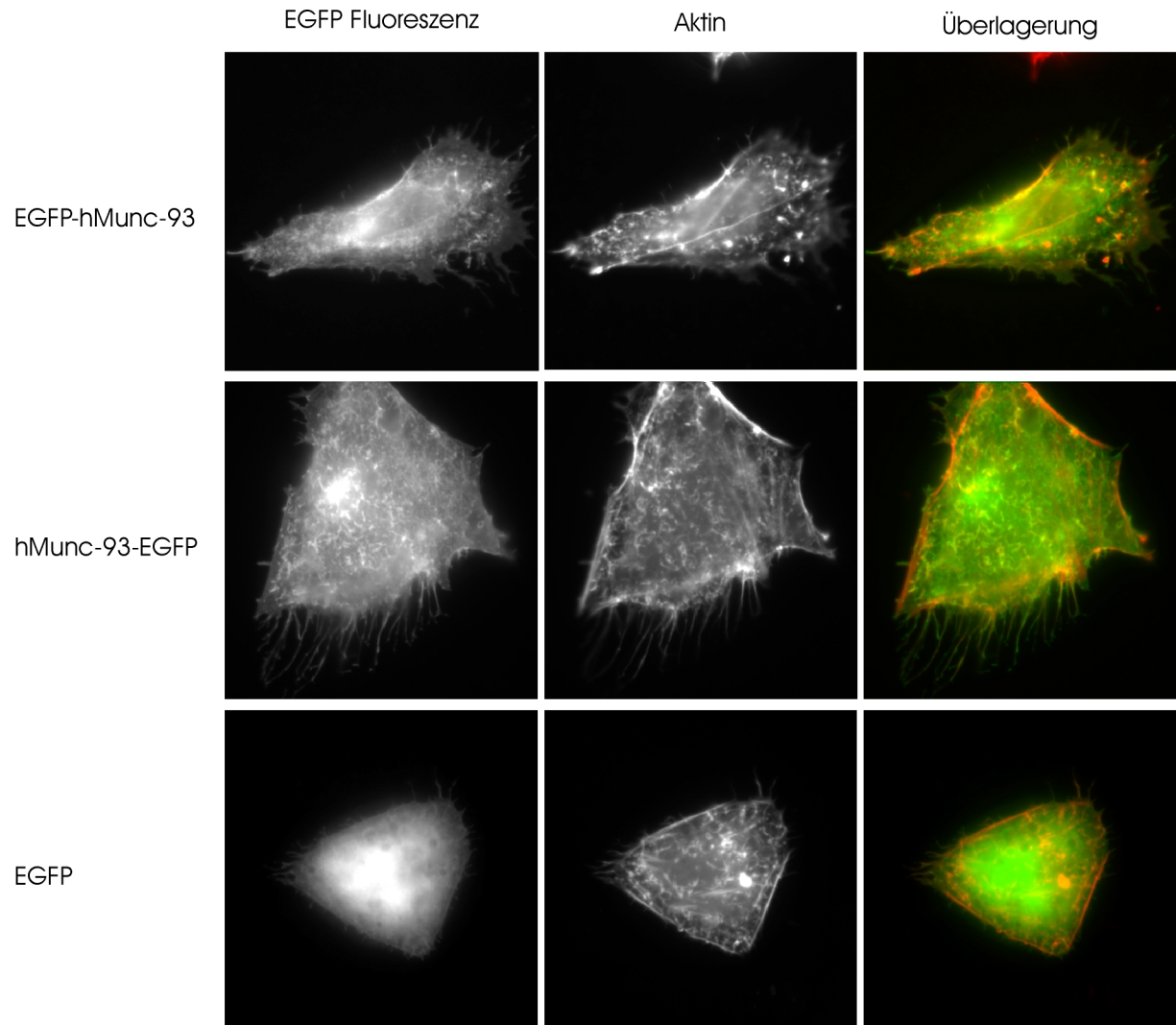


Abb. 12: hMunc-93 mit N- oder C-terminaler Fusion an EGFP ist bei Überexpression in CHO-K1 Zellen an der Plasmamembran zu finden. CHO-K1 Zellen wurden mit pEGFP-hMunc-93, pMunc-93-EGFP oder pEGFP-C3 transient transfiziert. Für die fluoreszenzmikroskopische Analyse wurden die Zellen 48 h später mit Paraformaldehydlösung fixiert, mit TRITC-Phalloidin aktinmarkiert und in Mowiol eingebettet.

EGFP-Munc-93 und Munc-93-EGFP zeigen eine übereinstimmende, von zytoplasmatisch verteiltem EGFP deutlich unterscheidbare Lokalisation. Es ist eine Färbung von Zellausläufern und eine Markierung der Zellumrisse durch die hMunc-93-EGFP-Fusionsproteine zu erkennen. Die Färbung des Aktinzytoskeletts zeigt ein ausgeprägtes submembranöses Aktinnetzwerk, Streßfasern und einige periphere Mikrofilamentbündel (Longley et al., 1999). Eine Überlagerung der Aufnahmen der Aktinfärbung und von EGFP-hMunc93 bzw. hMunc-93-EGFP zeigt, daß hMunc-93 mit dem Aktin der Lamellipodien kolokalisiert, nicht aber mit dem der Streßfasern oder Mikrofilamentbündel. Da Aktin in den Lamellipodien am Aufbau des Membranskeletts direkt unterhalb der Plasmamembran beteiligt ist, und es sich bei hMunc-93 um ein integrales Membranprotein handelt, muß hMunc-93 folglich in der Plasmamembran lokalisiert sein.

Um störende Einflüsse des EGFP auf die Lokalisation von hMunc-93 auszuschließen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti hMunc-93 Antiserum an CHO-K1 Zellen durchgeführt, die transient mit pcDNA3 Munc-93 transfiziert worden waren. Für diese Anwendung mußte das anti hMunc-93 Antiserum zunächst weiter gereinigt werden, da es bei einem direkten Einsatz zu viele unspezifische Immunmarkierungen erzeugte. Es wurde eine Affinitätschromatographie an einem GST-hMunc-93-Fusionsprotein durchgeführt, das an zyanbromidaktivierter Sepharose immobilisiert worden war. Das eingesetzte GST-Fusionsprotein bestand dabei aus den 15 C-terminalen Aminosäuren von hMunc-93, gegen die auch das Antiserum generiert worden war, fusioniert an den C-Terminus von GST.

Das Resultat der Immunmarkierung bestätigte das Ergebnis der Überexpression von EGFP-hMunc-93-Fusionsproteinen in diesen Zellen (Abb. 13). Wieder ist eine Färbung von Zellumrissen und Lamellipodien zu erkennen und eine Kolokalisation mit dem Aktin des Membranzytoskeletts. Neben der Plasmamembran wurden mit dem anti hMunc-93 Antiserum allerdings auch Bestandteile des Zellkerns angefärbt, bei denen es sich vermutlich um Nukleoli handelt. Diese Färbung ist in allen Zellen zu erkennen, während die Plasmamembran nur in den transfizierten Zellen markiert ist. An beiden Orten wird die Reaktion des Antiserums durch hMunc-93 Antikörper vermittelt, denn sämtliche Immunreaktionen lassen sich durch Präinkubation des Antiserums mit einem GST-hMunc93 Fusionsprotein inhibieren. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß die Bindung des Antikörpers an das Kernprotein durch eine Kreuzreaktivität zustande kommt, besonders weil die Färbung des Kernproteins in Zellen, die hMunc-93 überexprimieren, schwächer ist als in untransfizierten. Dies ist vermutlich auf eine geringere Affinität des Antikörper zum Kreuzantigen zurückzuführen, aufgrund derer nach einer Gleichgewichtseinstellung in der Mikroumgebung mehr Antikörpermoleküle an das besser passende Antigen binden (Harlow and Lane, 1998).

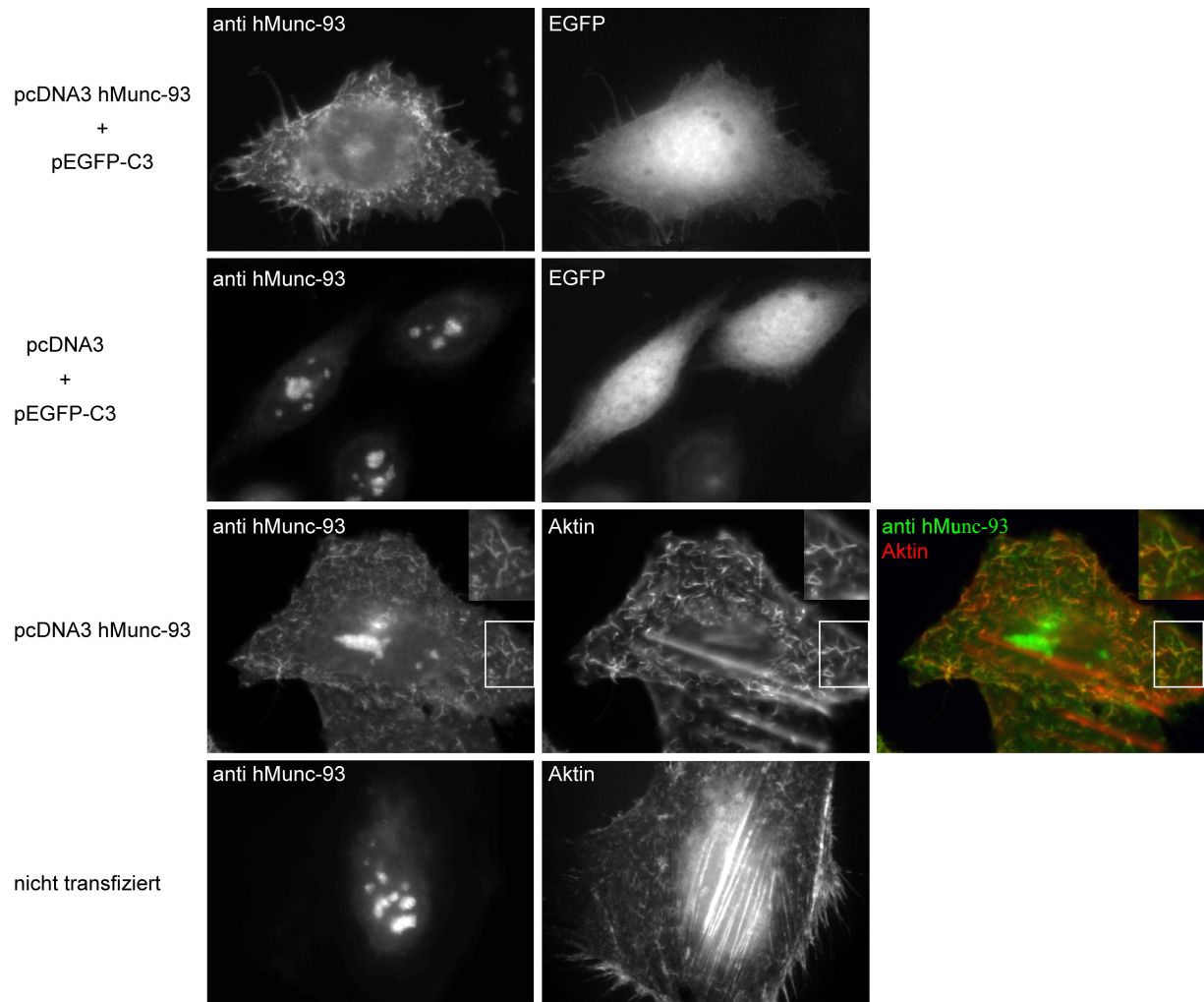


Abb. 13: Bestätigung der Plasmamembranlokalisation von hMunc-93 in transient transfizierten CHO-K1 Zellen durch Immunfluoreszenzmarkierung mit gereinigtem anti hMunc-93 Antiserum.

Endogenes hMunc-93 konnte in den CHO-K1 Zellen nicht nachgewiesen werden. Das kann entweder darauf beruhen, daß das Hamsterprotein, das dem menschlichen entspricht, nicht in Ovarien exprimiert wird, oder daß es durch Sequenzunterschiede nicht vom Antikörper erkannt werden kann. Da aus dem Northernblot in Abb. 5 hervorgeht, daß hMunc-93 am stärksten in der Leber exprimiert wird, ist es möglich, daß der Nachweis von endogenem hMunc-93 bei Verwendung einer anderen Zelllinie besonders einer menschlichen Leberzelllinie gelingen könnte. Bei Immunfluoreszenzfärbungen, die daraufhin an verschiedenen Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Organen und Spezies mit dem gereinigten anti hMunc-93 Antiserum durchgeführt wurden, war dennoch niemals eine Markierung von Plasmamembranproteinen, sondern, immer nur die schon in den CHO-K1 Zellen beobachtete punktförmige Färbung des Zellkerns zu erkennen. Dies deutet darauf hin, daß hMunc-93 ebenso wie Unc-93 in sehr geringer Menge exprimiert wird. Levin und Horvitz (1992) konnten zeigen, daß die Menge an unc-93 mRNA in *C. elegans* nur ein hundertstel bis ein zweihundertfünfzigstel derjenigen von Myosin leichter Kette ausmacht.

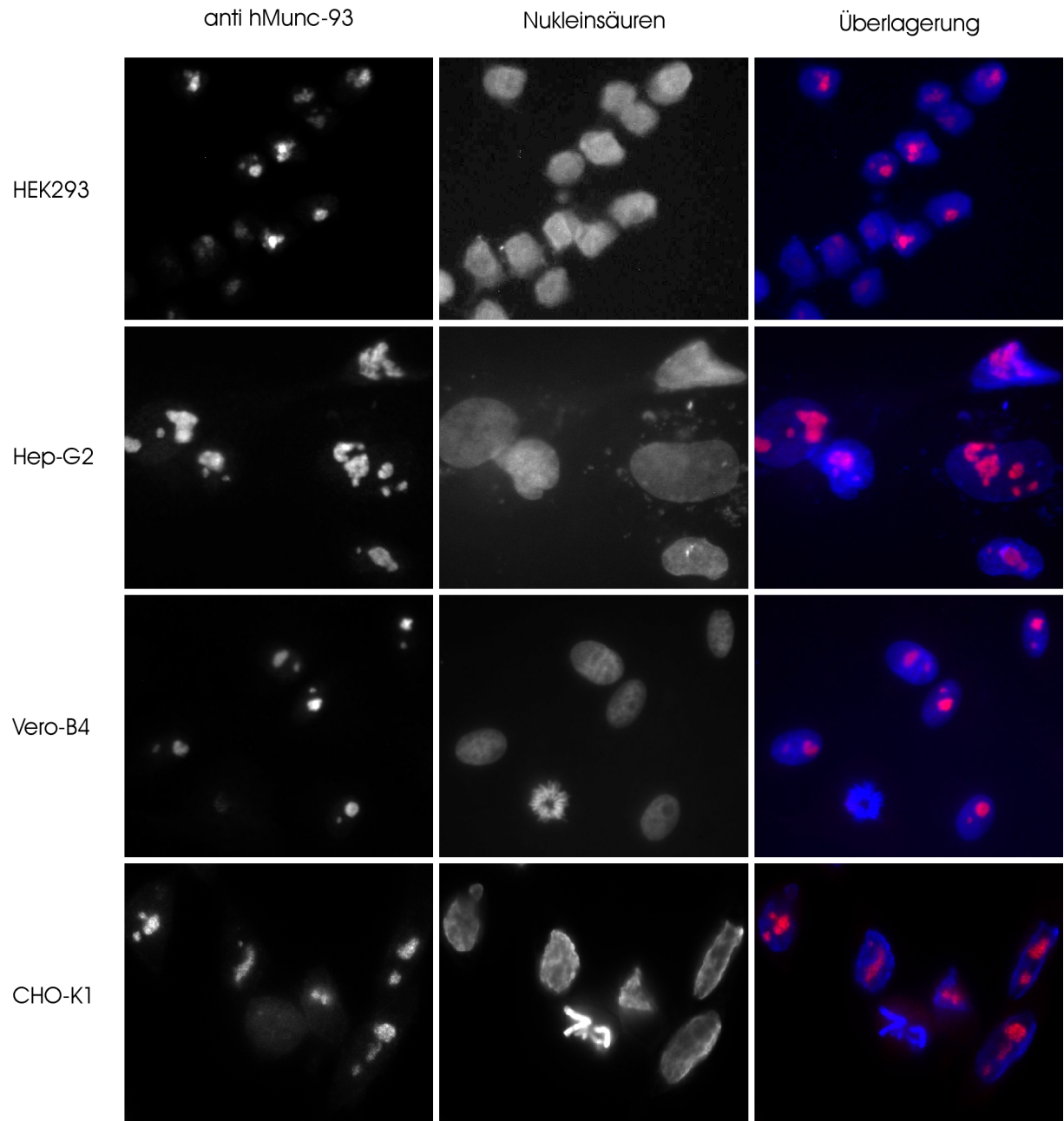


Abb. 14: Endogenes hMunc-93 ist durch Immunfluoreszenzfärbung verschiedener eukaryotischer Zelllinien mit dem gereinigten anti hMunc93 Antiserum nicht nachweisbar. 24 h nach dem Aussäen der Zellen auf Deckgläschen wurden sie mit Paraformaldehydlösung fixiert, mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und mit affinitätsgereinigtem anti hMunc-93 Antiserum und Rhodamin gekoppeltem zweitem Antikörper immunmarkiert.

4.5 Analyse der Membrantopologie von Munc93

hMunc-93 besitzt nach Computeranalysen (siehe Abb. 6) vermutlich 10 bis 12 Transmembrandomänen und ist in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 12 und Abb. 13). Zur Aufklärung seiner Membrantopologie wurden sechs verschiedene Mutanten konstruiert, bei denen an jeweils einer anderen Aminosäureposition ein Epitop (YPYDVPDYASL) eingefügt wurde, das von einem anti Hämagglutinin (HA) Antikörper erkannt wird. Für die Klonierung

wurden Restriktionsschnittstellen verwendet, die natürlicherweise in der Nukleotidsequenz vorhanden sind. Werden entsprechende hMunc-93 Mutanten in Zellen überexprimiert, so ist das HA-Epitop bei der Immunfluoreszenzfärbung nicht permeabilisierter Zellen nur dann für den Antikörper zugänglich, wenn es auf der Zellaußenseite lokalisiert ist. Nach Permeabilisierung der Zellen können Epitope beiderseits der Membran vom anti HA Antikörper erkannt werden.

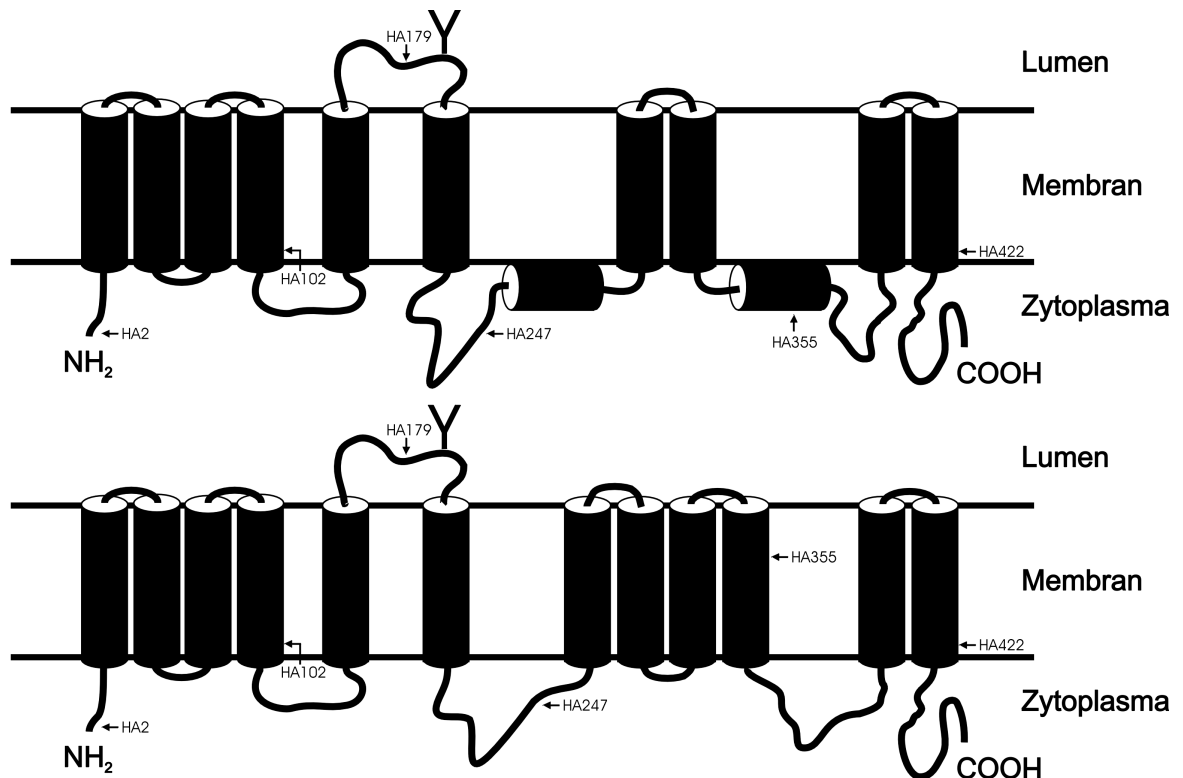


Abb. 15: Schematische Darstellung hypothetischer hMunc-93 Membrantopologien, abgeleitet aus einem Vergleich der Hydropathiediagramme von Unc-93 und seinen Homologen. Transmembranhelizes sind als dunkle Zylinder dargestellt und ebenso die beiden Abschnitte, deren Einlagerung in die Membran unklar ist. Positionen, an denen ein HA-Epitop zur Aufklärung der Membrantopologie eingeführt wurde, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Ein Problem bei der Bestimmung der Membrantopologie durch Insertion von HA-Epitopen in die Aminosäuresequenz ist die Gefahr einer Strukturänderung durch die Modifikation, besonders wenn sich diese in unmittelbarer Umgebung von Transmembrandomänen befinden (Zhang et al., 1995). Die Folge einer solchen Strukturänderung ist häufig eine kurze Lebensdauer des Proteins in der Zelle. Deshalb wurde zunächst die Expression der verschiedenen HA-Konstrukte *in vivo* an HEK 293-Zellen 48 h nach transients Transfektion überprüft. Die Gleichmäßigkeit der Transfektion der Zellen wurde anhand der Expression von kotransfiziertem EGFP im Mikroskop kontrolliert. Durch einen Westernblot wurden die Membranfraktionen dann auf die Präsenz von hMunc-93 hin überprüft. Mit dem peptidspezifischen polyklonalen anti hMunc-93 Antiserum konnten die Proteine detektiert

werden, die mit dem HA-Epitop in den Positionen 2, 179 und 247 beginnen. Vom anti HA Antikörper wurde nur hMunc-93 HA179 erkannt.

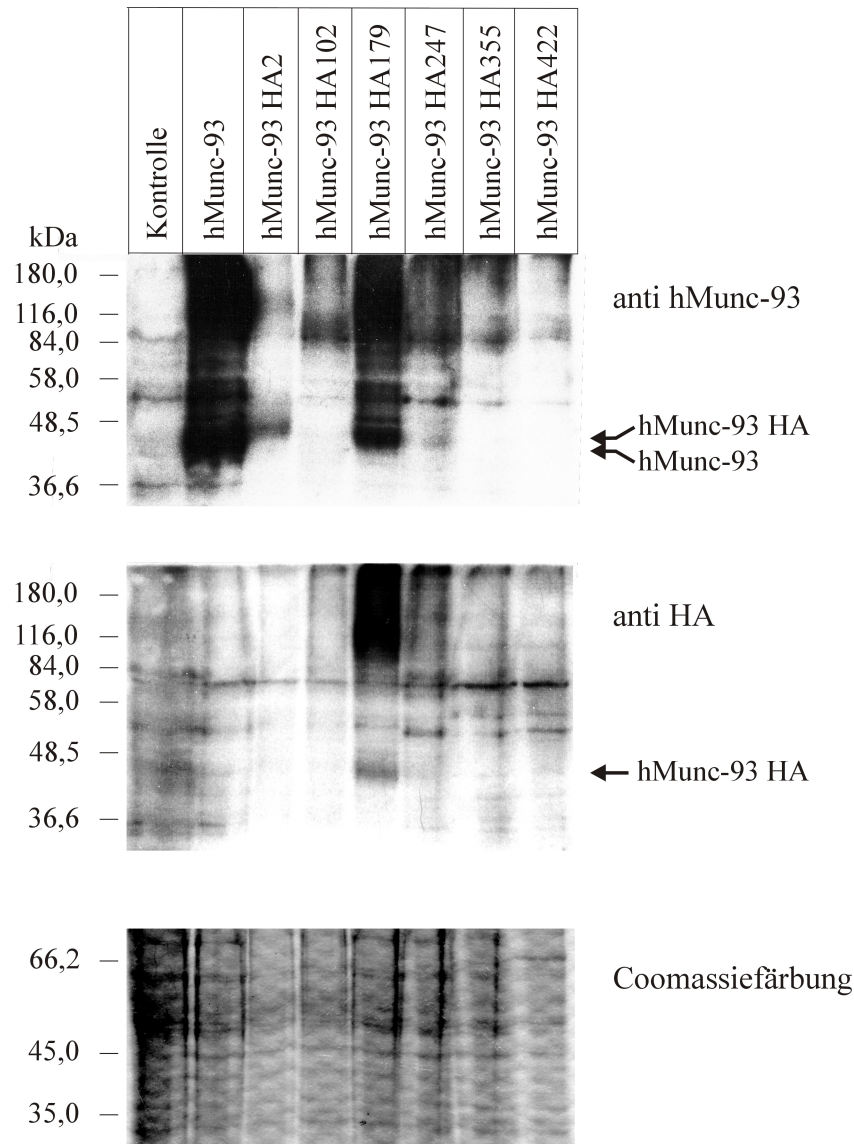


Abb. 16: Analyse der Expression verschiedener hMunc-93 HA-Konstrukte in transient transfizierten HEK293-Zellen im Westernblotverfahren. Membranfraktionen der HEK 293-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel mit 4 M Harnstoff gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine anschließend auf Nitrozellulose transferiert. Die Detektion von hMunc-93 erfolgte mit anti hMunc-93 Antiserum oder einem monoklonalen anti HA Antikörper. Zur Kontrolle wurden HEK 293-Zellen mit pcDNA3-Leervektor transfiziert. Ein coomassiegefärbtes PAA-Gel erlaubt einen Vergleich der in jeder Spur aufgetragenen Proteinmengen. Die Ziffern geben die Position der ersten Aminosäure des eingefügten HA-Epitops an.

Immunfluoreszenzfärbungen an CHO-K1 Zellen, die mit pcDNA3-Munc-93 HA179 transfiziert wurden, zeigen, daß sich das HA-Epitop bei diesem Konstrukt auf der Zellaußenseite befindet. Es wird sowohl in permeabilisierten als auch in nicht permeabilisierten Zellen vom Antikörper gebunden (Abb. 17). Die unverändert plasmamembranständige Verteilung von überexprimiertem hMunc-93 HA179 wird sowohl mit dem gereinigten anti hMunc-93 Antiserum als auch mit dem monoklonalen anti HA-Antikörper deutlich.

Der Carboxyterminus von hMunc-93 ist zytosolisch lokalisiert. Das geht aus Immunfluoreszenzfärbungen an CHO-K1 Zellen hervor, die mit pcDNA3 Munc-93 transfiziert und vor der Inkubation mit gereinigten anti hMunc-93 Antiserum nicht permeabilisiert wurden (Abb. 17).

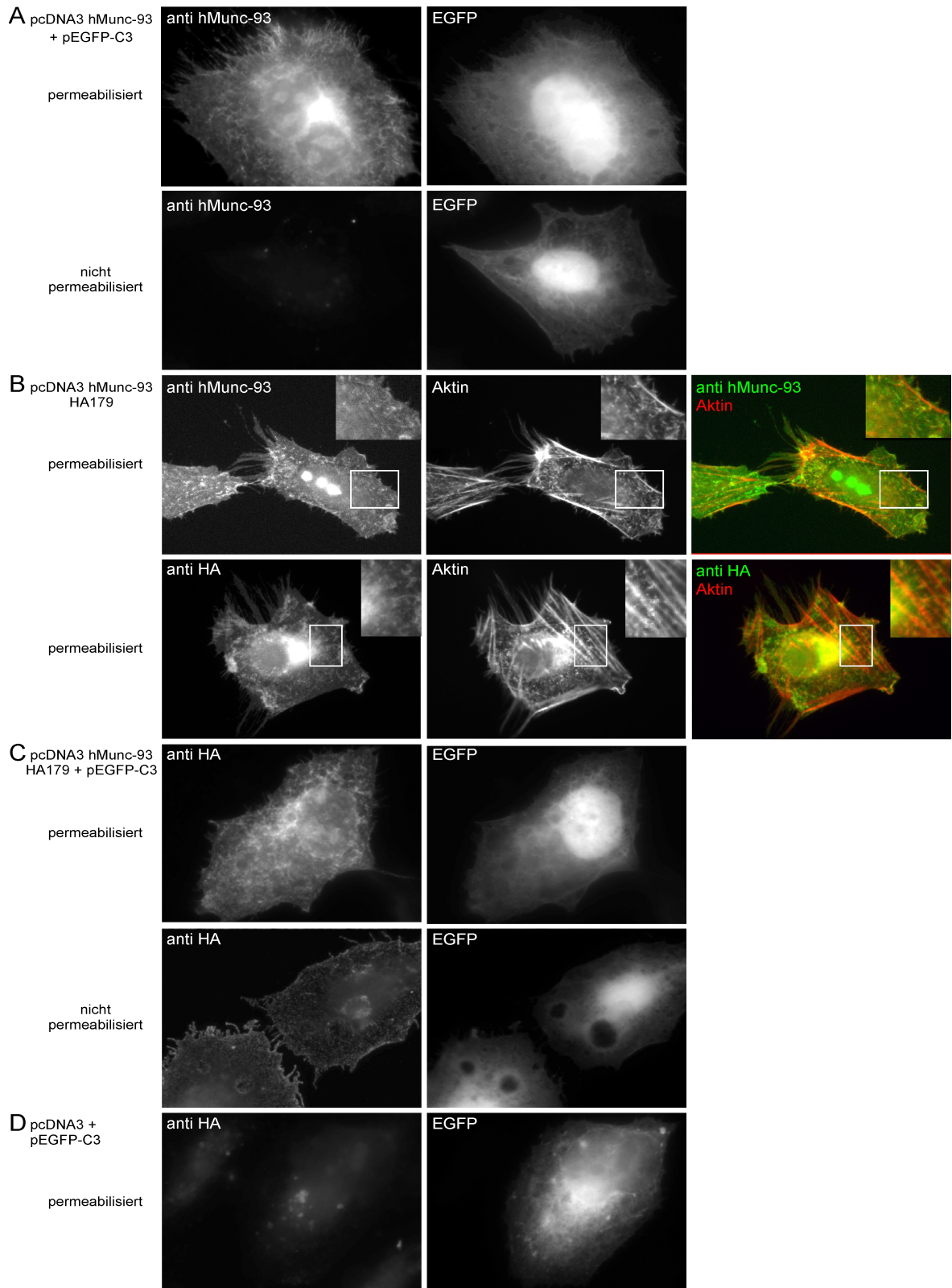


Abb. 17: Das HA-Epitop von hMunc-93 HA179 wird extrazellulär exponiert, der C-Terminus von hMunc-93 ist dem Zytosol zugewandt. Immunfluoreszenzfärbung von CHO-K1 Zellen, die mit pcDNA3 hMunc-93 HA179, pcDNA3 hMunc-93 bzw. pcDNA3 und pEGFP-C3 transient kotransfiziert wurden. Mit Paraformaldehyd fixierte Zellen wurden direkt oder nach vorhergehender Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 mit monoklonalem anti HA Antikörper oder gereinigtem anti hMunc-93 Antiserum gefärbt. Die Aktinmarkierung erfolgte mit TRITC gekoppeltem Phalloidin

4.6 Untersuchung einer möglichen N-Glykosylierung von hMunc-93

Das HA-Epitop von hMunc-93 HA179 befindet sich in der gleichen Schleife wie die potentielle N-Glykosylierungssequenz, die in Unc-93 und all seinen untersuchten Homologen in ähnlicher Position vorkommt. Da das primäre Zuckergerüst im Lumen des endoplasmatischen Retikulums auf die Seitenkette des Asparagins in der Erkennungssequenz übertragen wird, muß die Zuckerstruktur immer auf extrazellulärer Seite liegen. Eben diese Lokalisation für das HA-Epitop beginnend in Position 179 nachgewiesen werden (Kap. 4.5). Deshalb lag es nahe, die mögliche N-Glykosylierung von hMunc-93 genauer zu untersuchen. hMunc-93 wurde dazu *in vitro* in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin und Hundepankreasmembranen translatiert und ein Teil des Produktes anschließend mit Endoglykosidase H behandelt. Eine Analyse der Proben durch Polyacrylamid-gelelektrophorese ließ keine Verringerung des Molekulargewichtes von hMunc-93 um etwa 3 kDa durch Endoglykosidase H Aktivität erkennen (Abb. 18, Spuren 1 – 3), wie sie bei der Abspaltung eines Zuckergerüsts zu erwarten wäre und in der Kontrolle mit dem viralen Glykoprotein E1Δ65-80-Asn (Mayer et al., 1988) zu beobachten ist (Abb. 18, Spuren 4 – 6).

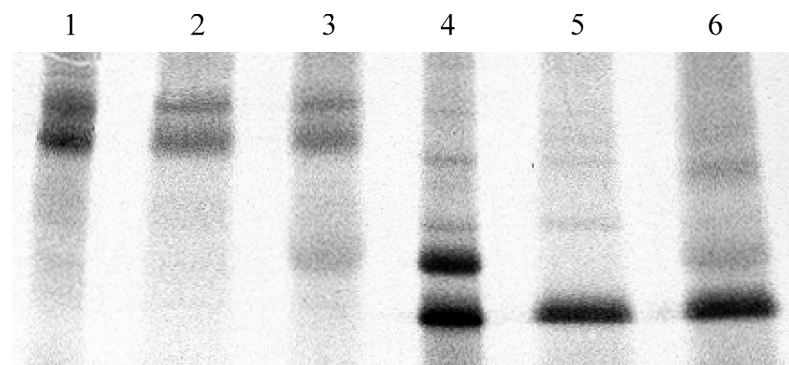


Abb. 18: Analyse einer möglichen Glykosylierung von hMunc-93. In Gegenwart von [³⁵S]-Methionin und Hundepankreasmembranen *in vitro* translatiertes hMunc-93 (Spur 1 – 3) bzw. E1Δ65-80-Asn (Spur 4 – 6) wurde für 0 h (Spuren 1 und 4), 4 h (Spuren 2 und 5) oder 16 h (Spuren 3 und 6) mit Endoglykosidase H behandelt. Alle Proben wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel mit 4 M Harnstoff aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.7 Suche nach Interaktionspartnern von hMunc-93 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid Systems

4.7.1 Identifizierung von Bindungspartnern für Munc-93

Interagierende Proteine können Aufschluß über die Funktion geben, die ein Protein *in vivo* ausübt. Für die Suche nach solchen Wechselwirkungspartnern für hMunc-93 wurde das Hefe-Zwei-Hybrid-System genutzt. Da die cDNA-Bibliothek, die hierbei Verwendung fand, aus Mäuseembryonen hergestellt worden war, wurde die Suche nicht mit dem menschlichen, sondern mit dem Mausprotein durchgeführt. Dieses konnte allerdings nicht in voller Länge als Köder eingesetzt werden, da es sich um ein Transmembranprotein handelt und somit eine

gemeinsame Translokation von mMunc-93 und seinem möglichen Bindungspartner in den Zellkern mit anschließender Aktivierung der Transkription des Reportergens unmöglich ist. Deshalb wurden drei verschiedene potentiell zytoplasmatische Abschnitte von mMunc-93 (Aminosäure 225-284, 345-392 und 431-459) in den Hefeexpressionsvektor pBTM116 kloniert und als Gemisch in den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen eingesetzt. Die Auswahl dieser Sequenzbereiche erfolgte anhand der in den Kapiteln 4.3 und 4.5 ermittelten Membrantopologie für hMunc-93. Abb. 19 zeigt, daß das LexA-mMunc93 (225-284)-Fusionsprotein im Hefestamm L40 schwächer exprimiert wird als die anderen beiden.

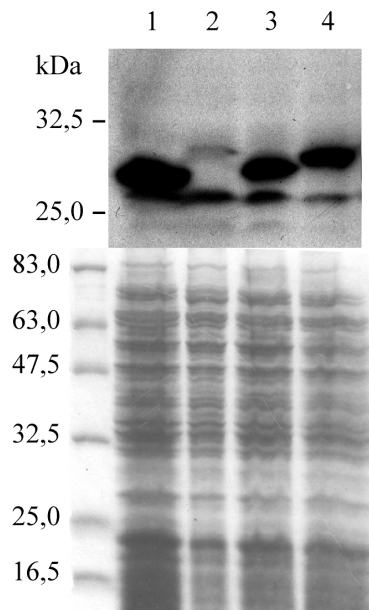
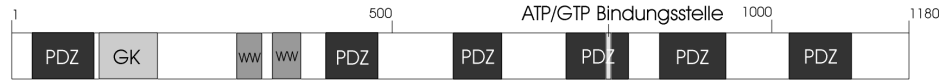


Abb. 19: Expression der mMunc-93 Köder für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen als LexA-Fusionsprotein im Hefestamm L40. Westernblot mit L40-Lysaten, die unter Selektionsbedingungen mit pBTM116 (Spur 1), pBTM116 mMunc-93 (228-284) (Spur 2), pBTM116 mMunc-93 (345-392) (Spur 3) oder pBTM116 mMunc-93 (431-459) (Spur 4) transformiert worden waren. Die Entwicklung des Blots erfolgte mit einem monoklonalen anti LexA Antikörper. Die Proteinmenge, die pro Spur geladen wurde, ist einem coomassiegefärbten PAA-Gel zu entnehmen.

Nichts desto trotz wurde ein 1:1:1-Gemisch aus L40, die jeweils eines der LexA-mMunc-93-Fusionsproteine exprimieren, mit 500 μg einer Mausembryo-cDNA-Genbank transformiert und $7,5 \cdot 10^6$ unabhängige Transformanten auf eine mögliche Interaktion mit mMunc-93 hin selektiert. In einem Zeitraum von fünf Tagen gewachsene Kolonien wurden von den Selektionspatten isoliert und die cDNA-Insert von 96 der 150 erhaltenen Plasmide sequenziert. Das in den jeweiligen Zellen vorhandene pBTM mMunc-93 Konstrukt wurde durch Restriktionsanalyse oder Sequenzreaktion identifiziert. Alle potentiellen Wechselwirkungspartner wurden im Hefestamm YRN974 mit dem GFP-Reportersystem ein zweites Mal auf ihre Bindung an das zugehörige LexA-mMunc-93-Fusionsprotein getestet. Proteine, die in diesem System ein positives Signal lieferten sind in Abb. 20 aufgeführt. Es handelt sich um die membranassoziierte Guanylatkinase mit invertierter Orientierung (MAGI3), Fettsäuresynthase, DOCK180, das Ubiquitin konjugierende Enzym BRUCE, das

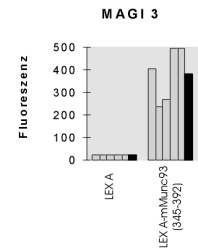
Autoantigen 1 für Polymyositis und Sklerodermie, das hypothetische Protein FLJ12923, sowie das Gerüstproteine Shank3b.

MAGI 3



Y2H

n=6



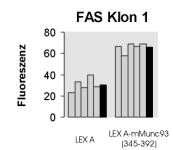
Fettsäuresynthase



Y2H

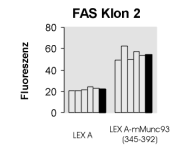
Klon 1

n=3



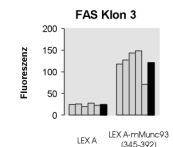
Klon 2

n=1



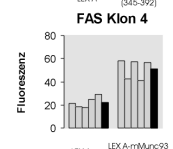
Klon 3

n=5



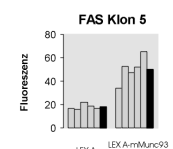
Klon 4

n=2

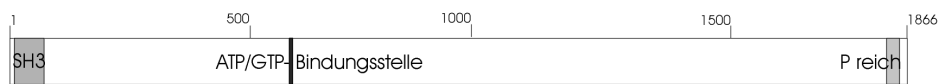


Klon 5

n=1

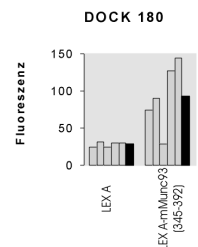


DOCK 180



Y2H

n=1

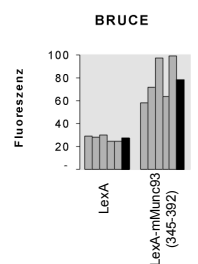


BRUCE

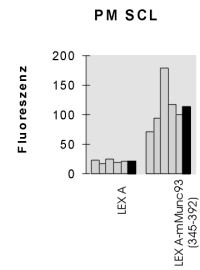
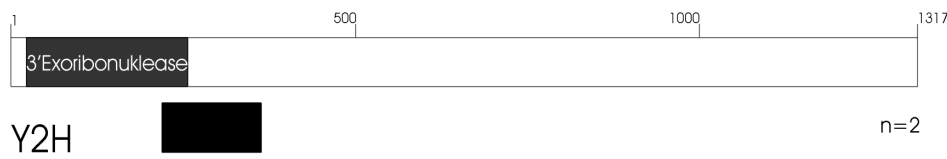


Y2H

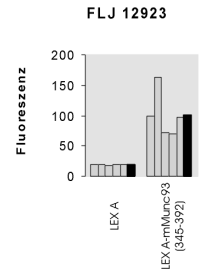
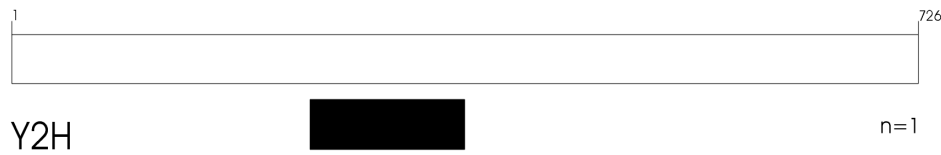
n=2



PM SCL Autoantigen1



FLJ 12923



Shank 3b

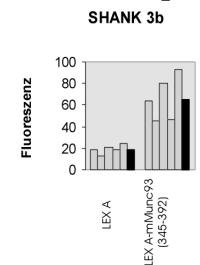
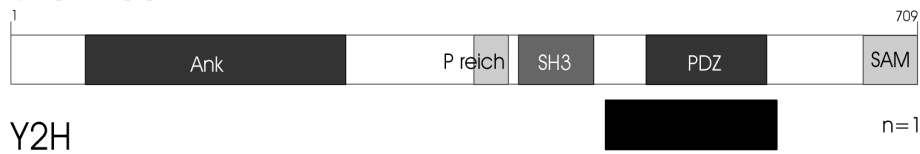


Abb. 20: Domänenstruktur identifizierter Interaktionspartner von mMunc-93. Die Abschnitte, die in den Klonen aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System enthalten sind, wurden unterhalb des Interaktionspartners als schwarze Balken eingezeichnet. n gibt an, wie oft ein bestimmter Klon identifiziert wurde. Balkendiagramme zeigen die relativen grünen Fluoreszenzintensitäten bei der Interaktion des entsprechenden VP16-Fusionsproteins mit einem LexA-mMunc-93-Fusionsprotein durch Aktivierung des GFP-Reportersystems im Hefestamm YRN974.

4.7.2 Verifizierung der Bindung von MAGI3 an Munc-93 *in vitro*

Nach dem Ergebnis der Interaktionstests in YRN974 besteht die stärkste identifizierte Wechselwirkung zwischen mMunc-93 und der membranassoziierten Guanylatkinase MAGI3, die zahlreiche Domänen für Protein-Protein-Interaktionen besitzt. Um diese Bindung zu bestätigen, wurde das erhaltene Fragment von MAGI3 nach Klonierung in den Vektor pSP72 *in vitro* in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin translatiert und mit GST-mMunc-93 inkubiert, das an GSH-Sepharose gebunden war. Aus Abb. 21 ist ersichtlich, daß es auch unter diesen Bedingungen zu der im Hefe-Zwei-Hybrid-System entdeckten Interaktion zwischen mMunc-93 und MAGI3 kommt.

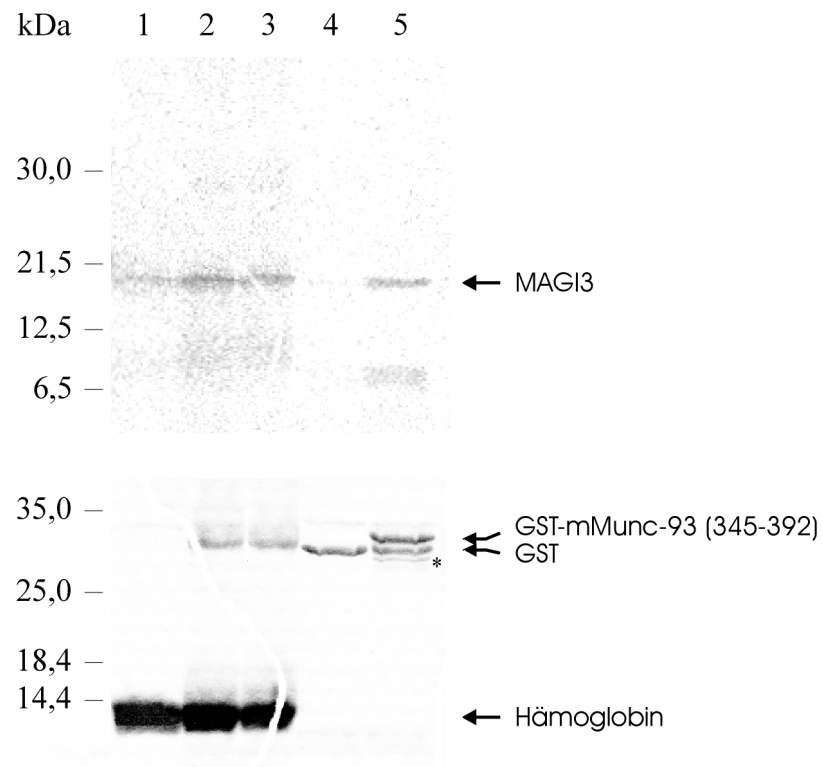


Abb. 21: GST-mMunc-93 (345-392) bindet MAGI3 *in vitro*. Das durch den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen erhaltene cDNA-Fragment von MAGI3 wurde *in vitro* in Gegenwart von [^{35}S]-Methionin transkribiert und translatiert (Spur 1) und ließ sich dann mit GST-mMunc-93 (345-392) präzipitieren (Spur 5), nicht jedoch mit GST allein (Spur 4). Die Proben wurden in einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und radioaktiv markiertes MAGI3 durch Autoradiographie detektiert. Die Spuren 2 und 3 enthalten die Überstände der Proben 4 bzw. 5. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen wurden alle Proben einer Coomassieblaufärbung unterzogen.

Nicht nur das im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen eingesetzte Fragment von mMunc-93, sondern auch hMunc-93 voller Länge bindet MAGI3 *in vitro*. Dies geht aus einem Experiment hervor, bei dem hMunc-93 in Gegenwart von [^{35}S]-Methionin *in vitro* translatiert und anschließend mit GST-MAGI3, das an GSH-Sepharose gebunden war, pelletiert wurde (Abb. 22).

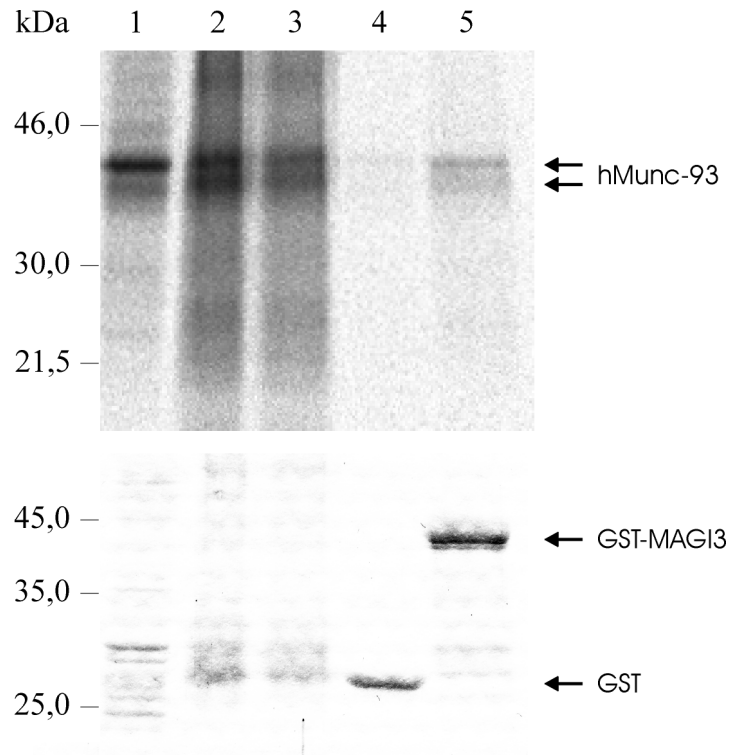


Abb. 22: GST-MAGI3 bindet hMunc-93. hMunc-93 wurde *in vitro* in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin transkribiert und translatiert (Spur 1) und anschließend mit rekombinant hergestelltem, an GSH-Sepharose gebundenem GST-MAGI3 präzipitiert (Spur 5). Eine Inkubation mit gleichen molaren Mengen an GST allein führt nur zu geringer unspezifischer Bindung (Spur 4). Die Proben wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel mit 4 M Harnstoff aufgetrennt und radioaktiv markiertes hMunc-93 durch Autoradiographie detektiert. Die Spuren 2 und 3 enthalten die Überstände der Proben 4 bzw. 5. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen wurden alle Proben auch durch Commassieblaufärbung eines entsprechenden Gels analysiert.

5 Diskussion

Im Zuge der vom Gehirn ausgelösten Muskelbewegungen finden zahlreiche Signaltransduktionsreaktionen statt, die in der Bewegung der angesprochenen Muskeln münden. Einblicke in die molekularen Vorgänge, die bei diesem Prozeß ablaufen, können aus Untersuchung der Unc-Proteine aus *C. elegans* und der entsprechenden homologen Säugerproteinen gewonnen werden. Unc-Proteine spielen in ganz unterschiedlichen Phasen von Muskelanregung und –bewegung eine Rolle und zeichnen sich durch eine unkoordinierte (engl.: uncoordinated) Fortbewegung aus, die durch Mutation oder Deletion jedes einzelnen dieser Gene hervorgerufen wird.

Zu Unc-93, das eine bislang unbekannte Rolle bei der Kopplung zwischen Muskelanregung und –kontraktion spielt, konnten im Rahmen dieser Arbeit mehrere homologe Proteine verschiedener Spezies identifiziert werden. Drei menschliche (hMunc-93, hMunc-93b, ET8) und zwei murine (mMunc-93, mMunc-93B) Homologe sowie zwei Proteine aus *Drosophila melanogaster* (GH10120, GH09628) wurden in dieser Arbeit analysiert, wobei das Hauptaugenmerk auf hMunc-93, dem Säugerprotein mit der größten Ähnlichkeit (56 %) zu Unc-93 lag. Alle untersuchten Proteine haben wie Unc-93 einen ausgeprägt hydrophoben Charakter und 10 bis 12 potentielle Transmembrandomänen. Während hMunc-93 und mMunc-93 hauptsächlich in der Leber und in deutlich geringerem Maße in wenigen weiteren Organen exprimiert werden, sind hMunc-93B und mMunc-93B ubiquitär mit relativ konstanten Expressionsleveln anzutreffen.

In vitro und *in vivo* Studien haben gezeigt, daß es sich bei hMunc-93 um ein integrales Membranprotein handelt, das in eukaryotischen Zellen zur Plasmamembran dirigiert wird. Schließlich gelang es, einige mögliche Interaktionspartner von hMunc-93 im Hefe-Zwei-Hybrid-System zu ermitteln und eine Bindung an das Multi-PDZ-Domänen Protein MAGI3 *in vitro* zu bestätigen.

Die erzielten Ergebnisse und ihre Bedeutung für die Aufklärung der physiologischen Funktion von Unc-93 oder seinen Säugerhomologen sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

5.1 Genstruktur und Transkripte von unc-93 Homologen

5.1.1 Aufbau der cDNAs

Die cDNAs von hMunc-93 und mMunc-93 enthalten eine vollständige kodierende Nukleotidsequenz. In beiden Sequenzen ist sowohl ein 5' als auch ein 3' nicht kodierender Bereich enthalten, der nach einer erkennbaren Kozaksequenz mit dem ATG, das das Startmethionin kodiert, in die kodierende Sequenz übergeht. Der 3' nicht kodierende Abschnitt endet nach einem Polyadenylierungssignal (AATAAA) mit einer Poly-A-Sequenz. Die cDNA von hMunc-93B enthält ebenfalls die Signalsequenz für die Polyadenylierung und eine Poly-A-Sequenz. Das 5'-Ende des kodierenden Bereiches läßt sich jedoch nicht sicher

bestimmen. Am 5'-Ende der cDNA aus IMAGE 2791017 stromaufwärts des ersten ATGs, das das Startmethionin kodieren könnte, ist kein Stoppcodon enthalten, das die 5' untranslatierte Sequenz definiert. Humane oder murine ESTs mit Sequenzen, die mehr als 50 Basen stromaufwärts des ersten ATG aus IMAGE 2791017 liegen, waren in Computerdatenbanken nicht zu finden. Wenn man bedenkt, daß die im Northernblot bestimmte Transkriptgröße von hMunc-93B 2,5 kb beträgt und daß von hMunc-93B bereits 1794 bp kodierende Sequenz, 420 bp 3' nicht kodierende Sequenz und 50 bp aus der Sequenz stromaufwärts des ersten ATG bekannt sind, ist zu erwarten, daß die noch fehlende Sequenz wenn überhaupt nur eine kurze noch weiter N-terminal gelegene Aminosäuresequenz kodiert.

Gene aus *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* enthalten gewöhnlich nur sehr wenige oder gar keine Introns. Die relative hohe Intronichte bei diesen Genen in beiden Spezies könnte auf eine geringe Transkriptionsrate hindeuten, wie sie für das Unc-93 Gen von Levin und Horvitz (1992) gezeigt wurde.

5.1.2 Analyse der Transkripte

Für Unc-93 aus *C. elegans* haben Levin and Horvitz (1992) zwei im 5'-Bereich unterschiedliche Transkripte identifiziert, deren Größe nach dem Ergebnis eines Northernblots beide aus 2,2 kb bestehen. Northernblotanalysen unc-93 homologer Säugergene haben gezeigt, daß die Größe ihrer Transkripte stark schwanken kann (2,0 bis 12,0 kb) und in einigen Geweben mehrere Varianten zu finden sind. Die unterschiedlichen Transkriptgrößen können auf alternatives Splicen zurückzuführen sein, wie es sich beim EST IMAGE 415354 andeutet, das 8 bp einer Sequenz enthält, die stromaufwärts einer Splicesite liegt, die im Klon IMAGE 415697 (hMunc-93) als Akzeptorsite vor dem fünften Exon genutzt wurde. Daß die genomische Sequenz für hMunc-93B auf Sequenzabschnitten kodiert ist, deren Position im humanen Genom noch nicht genau bestimmt ist und in einigen Fällen Chromosom 2, in anderen Chromosom 11 zugeordnet wird, schließt auch die Möglichkeit nicht aus, daß zwei Genorte für hMunc-93B existieren, deren Transkriptionsprodukte unterschiedlich groß sind.

Vergleicht man die Gewebeverteilung der mRNAs der zu unc-93 homologen Säugergene so fällt sofort der Gegensatz zwischen der ubiquitären Expression von munc-93B und der auf wenige Gewebe beschränkten Expression von munc-93 auf. Die ubiquitäre Verteilung von hMunc-93B und mMunc-93B verbunden mit der hohen Homologie (92 %) zwischen ihren Aminosäuresequenzen läßt den Schluß zu, daß diese beiden Proteine in der Maus und im Menschen die gleiche Funktion ausüben. Für hMunc-93 und mMunc-93 ist das eher unwahrscheinlich. Nicht nur der Grad ihrer Homologie ist geringer (81 %), auch die unterschiedliche Gewebespezifität lassen erwarten, daß diese beiden Proteinen, wenn auch sehr ähnliche, so doch nicht die gleiche Funktion haben. Möglich wäre auch eine anders geartete Regulation beider Genprodukt. Während hMunc-93 mRNAs in Leber und Niere mit einer Länge von 2,5 kb zu finden sind, sind die Transkripte im Herzen und Skelettmuskel etwa viermal so groß. Handelt es sich um unterschiedliche Splicevarianten, so könnten 3' oder

5' untranslatierte Sequenzen einen Einfluß auf die Lebensdauer der mRNA oder ihre Translationsrate haben; zusätzlich kodierte Aminosäuren könnte eine besondere regulatorische Bedeutung zukommen. Der Komplex aus Unc-93, Sup-9 und Sup-10 ist mit hoher Wahrscheinlichkeit in Muskelzellen zu finden, da sowohl für Sup-9 als auch für Sup-10 eine Lokalisation in Muskelzellen nachgewiesen wurde (Herman, 1984; de la Cruz et al., 1998). hMunc93 hat mit 56 % von den Säugerproteinen die höchste Homologie zu Unc-93; und die Präsenz seiner beiden großen Transkripte in den beiden untersuchten Muskelgeweben Herz und Skelettmuskel läßt vermuten, daß deren Translationsprodukte tatsächlich funktionelle Gemeinsamkeiten mit Unc-93 haben. Diese Funktion könnte bei der in der Leber und Niere vorhandenen Form und auch bei hMunc-93B erweitert worden sein.

Aus einem Vergleich des Sequenzalignments (Abb. 4) und der Hydrophobizitätsplots geht hervor, daß alle identifizierten Säugergene ausschließlich zur hydrophoben Domäne von Unc-93 homolog sind und wenn überhaupt nur sehr kurze hydrophile N-terminale Sequenzen besitzen. Wenn man die unterschiedlichen Transkriptgrößen und die Tatsache, daß von Unc-93 aus *C. elegans* durch alternatives Splicen zwei Proteine mit unterschiedlichen N-Termini synthetisiert werden, in Betracht zieht, so scheint es durchaus möglich, daß auch durch alternatives Splicing entstandene Säugerproteine einen wesentlich längeren hydrophilen N-Terminus besitzen könnten. Eine Betrachtung der Exon-Intron-Struktur aller untersuchten Gene läßt jeweils ein relativ großes Intron nach einer kurzen N-terminalen Sequenz, bzw. bei Unc-93 zwischen der hydrophilen und der hydrophoben Domäne erkennen. Die Bedeutung dieses Befundes ist allerdings ungeklärt.

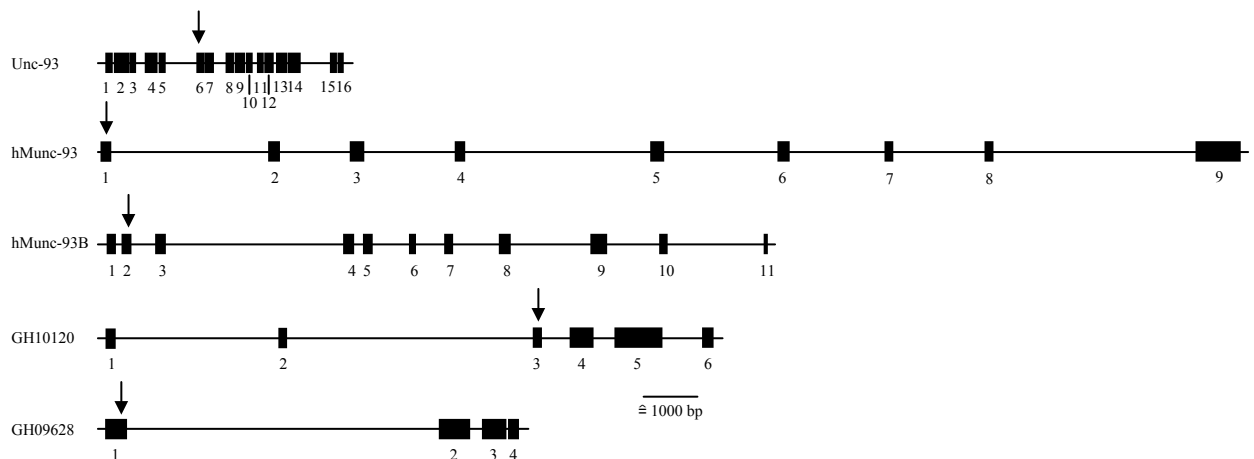


Abb. 23: Schematische Darstellung der Exon-Intron-Struktur von *unc-93* und seinen Homologen. Exons sind nummeriert, die Position der ersten möglichen kodierten Transmembrandomäne ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Auffällig ist der geringe Konservierungsgrad in den hydrophilen N-Termini der untersuchten zu Unc-93 homologen Proteine, die in den beiden Proteinen aus *Drosophila melanogaster* (GH10120 und GH09528) und in hMunc-93B in Ansätzen vorhanden sind, in hMunc-93,

mMunc-93 und ET8 aber gänzlich fehlen. Möglicherweise wurde die Funktion dieser hydrophilen Domäne aus *C. elegans* in den anderen Spezies von einem anderen Protein übernommen, so daß die noch vorhandenen hydrophilen N-terminalen Aminosäuren nur für die Interaktion mit diesem Protein zuständig sind oder sogar völlig bedeutungslos geworden sind und deshalb einer so starken Variabilität unterliegen. Möglich ist aber auch, daß Proteine mit N-terminalen Domänen existieren, die denen aus *C. elegans* entsprechen. Kommt diesen eine regulatorische Funktion zu, so könnten Proteine ohne diese Abschnitte konstitutiv aktiv sein oder als Antagonisten wirken. Trotz intensiver Suche in Sequenzdatenbanken konnten allerdings keine Proteine mit offensichtlicher Homologie zum N-terminalen Abschnitt von Unc-93 identifiziert werden.

5.2 Analyse der Unc-93 homologen Proteine

5.2.1 Molekülmassenermittlung des Translationsproduktes

Aus den Northernblotanalysen geht klar hervor, daß die vier untersuchten murinen und humanen unc-93 homologen Gene transkribiert werden. Für ET8 wurde dies bereits von der Arbeitsgruppe von Perbal (1997) gezeigt.

Die cDNA des Klonen IMAGE 415697 (hMunc-93) sollte nach der bestimmten Aminosäuresequenz ein 50,3 kDa großes Translationsprodukt liefern. Bei einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von *in vitro* translatiertem hMunc-93 erhält man zwei Banden von etwa 40 und 43 kDa (Abb. 9). In HEK 293-Zellen überexprimiertes hMunc-93 wird von einem gegen die letzten 15 Aminosäuren des Proteins gerichteten Antiserum als 43 und 48 kDa Bande erkannt (Abb. 11). Die Detektion von hMunc-93 durch den Antikörper belegt, daß die Nukleotidsequenz ohne Fehler im Leseraster bestimmt wurde, da sonst kein Epitop für den Antikörper vorhanden wäre. Die Größen der Translationsprodukte stimmen in etwa mit der berechneten überein. Der Größenunterschied zwischen *in vitro* translatiertem hMunc-93 und hMunc-93 aus HEK 293-Zellen könnte auf eine posttranslationale Modifikation des Proteins in Zellen zurückzuführen sein. Ungeklärt ist allerdings, warum nicht eine sondern sowohl bei der *in vitro* Translation als auch bei der Überexpression in Eukaryontenzellen zwei Banden für hMunc-93 im Gel zu sehen sind. Eine Möglichkeit ist eine interne Initiation der Translation. Das nächste Methionin des gleichen Leserasters befindet sich in Aminosäureposition 50 und ließe somit eine Molekulargewichtsänderung von etwa 5 kDa erwarten. Werden allerdings die ersten 27 Aminosäuren von hMunc-93 deletiert, so verbleibt das Protein bei Expression in CHO Zellen im endoplasmatischen Retikulum (Daten nicht gezeigt), wohingegen hMunc-93 voller Länge nahezu ausschließlich in der Plasmamembran zu finden ist. Daß die Deletion weiterer 23 Aminosäuren die korrekte Faltung und Translokation wieder ermöglichen kann, scheint eher unwahrscheinlich. Eine posttranslationale Modifikation könnte ebenfalls einen solchen Laufunterschied hervorrufen. Am wahrscheinlichsten ist, daß das unterschiedliche Laufverhalten aus einer unvollständigen Denaturierung durch die Inkubation bei 37 °C resultiert, nach der noch vorhandene

Sekundärstrukturen die Migration im Gel verlangsamen. Letzteres wird durch den Befund erhärtet, daß sich beim Kochen der Proben in Gegenwart von 4 M Harnstoff das Verhältnis der beiden Banden zu Gunsten der niedermolekularen verschiebt (Abb. 10).

5.2.2 Unc-93 und seine homologen Proteine sind Multitransmembranproteine

Die im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse über die Membrantopologie von hMunc-93 sprechen für 12 oder 10 membranspannende Domänen wie sie in den Modellen in der Abb. 15 dargestellt sind.

5.2.2.1 Ermittlung der Membrantopologie

Ein im Zytoplasma lokalisierter N-Terminus ergibt sich für alle untersuchten Proteine aus einem Vergleich der Ladungen der Aminosäuren auf beiden Seiten der Transmembrandomäne.

Eine Untersuchung der Membrantopologie durch Einführen von HA-Epitopen hat bei der Hälfte der Mutanten zu einer erfolgreichen Expression in HEK 293-Zellen geführt. Bei den übrigen hatte die Insertion wahrscheinlich so starke Strukturänderungen zur Folge, daß das Protein nach erfolgloser Faltung degradiert wurde. Eckhardt und Kollegen (1999) haben bei HA-Insertionen in den CMP-Sialinsäuretransporter ebenfalls bei einigen Mutanten einen Verlust der Enzymaktivität, bei anderen keine Expression beobachtet. Die Konstrukte mit den HA-Epitopen beginnend in den Positionen 2 und 247 waren zwar in die Membran integriert, die Epitope konnten aber nicht mehr vom anti HA Antikörper detektiert werden. Dies kann auf eine posttranslationale Modifikation des Epitops in der Zelle zurückzuführen sein, die die Antikörperbindung verhindert. Auch ein solches Phänomen wurde bei der Untersuchung der Membrantopologie des CMP-Sialinsäuretransporters bereits beobachtet (Eckhardt et al., 1999). Aus Immunfluoreszenzfärbungen von HEK 293-Zellen, die mit hMunc-93 HA179 transfiziert waren, ist ersichtlich, daß sich der hydrophile Abschnitt zwischen den Aminosäuren 155 und 203 auf extrazellulärer Seite befindet.

Die letzten zwei Transmembrandomänen liegen bei hMunc-93 sehr eng beieinander, so daß sich die Frage stellt, ob es sich tatsächlich um zwei oder doch nur um eine handeln kann. Die Tatsache, daß das anti hMunc-93 Antiserum bei einer Immunfluoreszenzfärbung an nicht permeabilisierten Zellen nicht bindet, steht im Einklang mit einem C-Terminus auf zytoplasmatischer Seite, was ein zweimaliges Durchqueren der Membran im Bereich der Aminosäuren 385 – 425 nahelegt.

5.2.2.2 Sequenzhomologie mit Zuckertransportern

Ein weiteres Indiz, das dafür spricht, daß hMunc-93 aus 12 Transmembrandomänen aufgebaut ist, ist die Sequenzähnlichkeit mit Motiven von Transportern für Zucker oder andere Moleküle. Auch wenn die Homologie mit den Konsensussequenzen nicht so groß ist, wie sie für einen Glucosetransporter zu erwarten wäre, muß auch beachtet werden, daß die geforderte Position der verschiedenen Konsensussequenzen mit ihrer Lage in Unc-93 und seinen

Homologen übereinstimmt (Abb. 7). Beim 12 Transmembranmodell liegt das erste GR[R/K]-Motiv zwischen Transmembrandomäne 2 und 3, das zweite zwischen den Transmembrandomänen 8 und 9. Die erste Konsensussequenz beginnt in der vierten Transmembrandomäne und endet in der Schleife zwischen der vierten und der fünften Transmembrandomäne. Die zweite Konsensussequenz beginnt am Ende der achten Transmembrandomäne und reicht bis in die neunte hinein (Maiden et al., 1987). Nach diesem Modell scheinen Unc-93 und 12-Transmembrandomänenglucosetransporter also einen gemeinsamen Ursprung zu haben. Das Auftreten des GR[R/K]-Motivs zwischen den Transmembrandomänen 2 und 3 sowie 8 und 9 führt zu der Annahme, daß Glucosetransporter durch Genduplikation eines 6-Transmembrandomänenproteins entstanden sind (Maiden et al., 1987). Da Ansätze dieses Motivs auch in Unc-93 zweimal vorkommen, scheint die getrennte Entwicklung erst nach der Genduplikation begonnen zu haben. Auffällig ist das in Unc-93 und allen seinen Homologen konservierte Tryptophan in der zweiten Konsensussequenz, das in Glucosetransportern nicht zu finden ist. Dieses ist möglicherweise für eine spezifische Struktur oder die Bindung oder den Transport eines Metaboliten essentiell. Ob Unc-93 und seine Homologen tatsächlich als Transporter fungieren oder vielleicht als Rezeptoren dienen, die nach Bindung eines Liganden eine Signaltransduktionskaskade in Gang setzen, ist noch völlig unbekannt, und die Identifizierung eines Liganden würde sicherlich einen wertvollen Hinweis auf die physiologische Bedeutung dieser Genfamilie liefern. Für die Existenz verschiedener zu Unc-93 homologer Proteine wären dann mehrere Gründe denkbar. So könnten die verschiedenen Proteine den gleichen Metaboliten binden und in verschiedenen Organen oder Zellen unterschiedliche Signale weiterleiten, oder sie binden den gleichen Metaboliten unter unterschiedlichen Stoffwechselbedingungen, z. B. nieder- und höheraffin wie dies bei den Glucosetransportern (GLUT) 1 und 2 der Fall ist (Silverman, 1991). Während GLUT 1 mit einem K_M -Wert von 1 mM bei durchschnittlicher Blutglucosekonzentration bereits mit Maximalgeschwindigkeit Glucose in Organe wie das Gehirn und die Skelettmuskulatur transportiert, hat GLUT 2 einen K_M -Wert von 15 - 20 mM und transportiert damit in Abhängigkeit von der gegebenen Blutkonzentration Glucose in die Leber und die β -Zellen des Pankreas. In den β -Zellen des Pankreas kann deshalb die Glucosemenge als direktes Maß für die auszuschüttende Insulinmenge verwendet werden, in der Leber findet nur dann Glykogensynthese statt, wenn alle anderen Organe mit ausreichenden Mengen an Glucose versorgt sind. Eine weitere Möglichkeit für die Existenz mehrerer Unc-93 homologer Proteine ist auch die Bindung sehr ähnlicher Metaboliten, deren Signalweiterleitungen gänzlich unabhängig voneinander sind.

5.2.2.3 Das 10 Transmembranmodell

Für das Vorhandensein von nur 10 membranspannenden Domänen in Unc-93 sprechen die für die siebte und/oder zehnte Transmembrandomäne sehr niedrigen Hydropathieindizes in den Proteinen Unc-93 (7. und 10.), hMunc-93 (7.), mMunc-93(7. und 10.), GH10120 (7. und 10.) und GH09628 (7.) (Abb. 15). Es gibt aber auch Transmembrandomänen mit noch deutlich

geringerem Hydropathieindex, so z. B. für das S4-Segment eines spannungsgesteuerten Kaliumkanals. Dort dient die Transmembrandomäne als Spannungssensor und besitzt deshalb auch im membranspannenden Bereich zahlreiche geladene Aminosäuren. Es wäre also möglich, daß auch bei Unc-93 und seinen homologen aus funktionellen Gründen die Transmembrandomänen sieben und zehn polarer sind als üblich. Durch Wechselwirkungen mit anderen Domänen innerhalb des Proteins oder Bindung eines Liganden können solche für Transmembranabschnitte ungünstigen Ladungen neutralisiert werden. Gegen eine Überlegung, die potentiellen Transmembrandomänen sieben und zehn als nicht membranspannende, unpolare Domänen im Proteininneren zu werten, spricht die Möglichkeit eines gemeinsamen Ursprungs mit 12-Transmembrandomänentransportern insofern, als eine zytoplasmatische Lokalisation beider hydrophoben Bereiche in der Evolution eine Umkehrung der Orientierung der zwischen ihnen liegenden Transmembrandomänen (8 und 9) erforderlich gemacht hätte.

Weiteren Aufschluß über die Membrantopologie von hMunc-93 können Proteaseschutzversuche liefern, bei denen *in vitro* in Membranen integriertes Protein mit unterschiedlichen sequenzspezifischen Proteasen behandelt wird. Unter diesen Bedingungen findet eine Spaltung von hMunc-93 nur dann statt, wenn die Erkennungssequenz für die Protease zugänglich ist, das heißt, wenn sie weder in einer Transmembrandomäne noch auf intrazellulärer Seite lokalisiert ist. Luminale Spaltstellen werden bei einer Proteolyse in Gegenwart von Triton X-100 zugänglich. Die Größe der erhaltenen Fragmente und die Bestimmung ihrer N-terminalen Sequenz ermöglichen Rückschlüsse auf die Lage der Transmembrandomänen.

5.2.2.4 Bedeutung der Membrantopologie für die Unc-93 Mutationen

Drei unc-93 Mutationen, die einen Gummiband Phänotyp zur Folge haben, sind genauer charakterisiert worden (Levin and Horvitz, 1992). Bei der ersten (n234) handelt es sich um eine Deletion der letzten 170 Aminosäuren. Die anderen beiden resultieren aus Punktmutationen. Bei n1500 liegt ein G388R Austausch vor. Nach dem hier vorgestellten Modell befindet sich diese Position in der fünften Transmembrandomäne. Das Einfügen einer positiven Ladung an einer solchen Position wird nur in sehr wenigen Fällen keine funktionellen Konsequenzen nach sich ziehen. Bei der Mutante n200 haben zwei Aminosäureaustausche stattgefunden (A49V und G562V). Ob nur die Kombination beider den unkoordinierten Phänotyp auslöst oder eine der beiden allein, ist nicht untersucht. Das Glycin 562 ist in mehreren Unc-93 homologen Proteinen konserviert und befindet sich in der zytoplasmatischen Schleife kurz vor der zehnten Transmembrandomäne. Da Glycin eine Aminosäure mit einer hohen konformationellen Flexibilität ist, könnte die Mutation zu einer Konformationsänderung in der zehnten Transmembranhelix führen und damit Interaktionen der membranspannenden Domänen untereinander oder mit anderen Proteinen verändern.

5.2.2.5 *Unc-93* und seine Homologen sind potentielle Glykoproteine

Die extrazellulär gelegene Schleife mit dem HA-Epitop in Position 179 enthält auch die putative N-Glykosylierungssequenz, die bei alle *Unc-93* homologen Proteinen in ähnlicher Position zu finden ist. Obwohl eine Glykosylierung an dieser Stelle durch das *in vitro* Experiment nicht nachweisbar war, ist es dennoch nicht ausgeschlossen, daß es sich um Glykoproteine handelt. Nilsson und Heijne (1993) konnten zeigen, daß sich eine N-Glykosylierungsstelle 12-14 Aminosäuren entfernt von den Transmembrandomänen befinden muß, damit die Oligosaccharyltransferase aktiv werden kann. Nach dem vorgestellten Modell sind es bei hMunc-93 35 Aminosäuren auf N-terminaler und 13 Aminosäuren auf C-terminaler Seite. Bei allen übrigen untersuchten *Unc-93* Proteinen ist der geforderte Mindestabstand zwischen potentieller N-Glykosylierungsstelle und Transmembrandomäne ebenfalls gegeben. Es ist möglich, daß die zweite, höhermolekulare Bande in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese den Nachweis einer Glykosylierung stört, denn sie befindet sich auf genau der Höhe, auf der auch das glykosylierte Protein zu erwarten wäre. Eine Deglykosylierung hätte dann nur eine Intensitätsverringering zur Folge. In diesem Fall bliebe allerdings die Frage, warum zwei Banden bei der Analyse des hMunc-93-Translationsproduktes im Gel zu sehen sind, und warum nicht auch die langsamer wandernde glykosyliert oder deglykosyliert wird. Keine N-Glykosylierung an dieser Stelle scheint bei einer in nahezu allen homologen Proteinen in der Position konservierten N-Glykosylierungsstelle sehr unwahrscheinlich.

5.2.3 Intrazelluläre Lokalisation von hMunc-93

Das gegen den C-Terminus von hMunc-93 generierte Antiserum zeigt nach seiner Reinigung durch Affinitätschromatographie eine Bindung an Proteine des Zellkernes, deren Muster auf Nukleoli hindeutet. Ein weiterer Befund für die Annahme, daß es sich um Proteine der Nukleoli handelt, ist die Tatsache, daß die Färbung in Zellen, die sich im Stadium der Metaphase befinden nicht vorhanden ist. In den Nukleoli wird von der RNA-Polymerase I das Gen für die 18 S, die 5,8 S und die 28 S rRNA transkribiert. Sie lösen sich während der Prophase auf und bilden sich in der Telophase neu aus. Eine Präinkubation des Antiserums mit einem GST-Fusionsprotein, das das Epitop enthält, gegen das die Antikörper gerichtet sind, verhindert die Markierung der Nukleoli. Dennoch handelt es sich bei dieser Bindung höchstwahrscheinlich um eine unspezifische Reaktion, wie sie bei Verwendung peptidspezifischer Antiseren des öfteren auftritt (Harlow and Lane, 1998). Die Antikörper dieser Antiseren sind gegen kurze denaturierte Epitope gerichtet, die zufällig auch in anderen Proteinen vorkommen können und deshalb unter den denaturierenden Bedingungen, die bei der hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung vorliegen, auch erkannt werden. Für eine unspezifische Bindung spricht auch der Befund, daß dieses Signal in transfizierten Zellen deutlich schwächer ist als in benachbarten nicht transfizierten. In diesen kommt es bei der Bindung des Antikörpers an sein Epitop zu einer Gleichgewichtseinstellung, wobei weniger Antikörpermoleküle an das unspezifische binden, das sich durch eine geringere Affinität

auszeichnet, wenn die Sequenzen nicht exakt übereinstimmen (Harlow and Lane, 1998). Weiterhin ist weder bei der Expression von EGFP-Munc-93 noch bei einer Immunfärbung von HEK 293-Zellen, die mit pcDNA hMunc-93 HA179 transfiziert wurden, mit dem anti HA-Antikörper eine Markierung der Nukleoli zu sehen. Eine Lokalisation endogenen Proteins in den Nukleoli und überexprimierten Proteins in der Plasmamembran erscheint eher unwahrscheinlich. Ein weiteres Indiz für eine unspezifische Antikörperbindung ist das Fehlen eines Kernlokalisierungssignals in allen untersuchten Unc-93 homologen Proteinen der Säuger und von *Drosophila melanogaster*.

Die Reaktion mit Proteinen in der Plasmamembran transfizierter Zellen ist spezifisch. Dies geht vor allem aus Kotransfektionsexperimenten mit EGFP hervor. Nur in Zellen, die EGFP exprimieren, das bedeutet, in solchen, die die hMunc-93 cDNA aufgenommen haben, wird auch die Plasmamembran immunmarkiert. Des weiteren stimmen die Ergebnisse mit denen aus der Expression von EGFP-hMunc-93-Fusionsproteinen und auch mit denen der Membranpräparation überein. In nicht transfizierten Zellen ist keine Plasmamembranfärbung durch das anti hMunc-93 Antiserum zu beobachten. Das bedeutet wiederum, daß Munc-93 in diesen Zellen in so geringem Maße exprimiert wird, daß es in der Immunfluoreszenz nicht detektierbar ist. Tatsächlich sind von einigen Plasmamembranproteinen nur etwa 1000 pro Zelle vorhanden (Harlow and Lane, 1998). Auch unc-93 wird in *C. elegans* nur in sehr geringer Menge exprimiert. Levin und Horvitz (1992) bestimmten die mRNA Menge auf ein hundertstel bis zweihundertfüngzigstel derjenigen von Myosin schwerer Kette. Es ist aber auch möglich, daß endogenes Munc-93 in den untersuchten Zelltypen, bei denen es sich hauptsächlich um Epithelzellen handelt, nicht exprimiert wird.

5.3 Interaktionspartner von mMunc-93 und Implikationen für die Funktion

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden sieben verschiedene potentielle Bindungspartner für mMunc-93 identifiziert. Mit einem Köder, der die Aminosäuren 345 – 392 von mMunc-93 umfaßt, wurden die membranassoziierte Guanylatkinase mit invertierter Orientierung MAGI3, Fettsäuresynthase, DOCK180, das Bir Repeat enthaltende Ubiquitin conjugierende Enzym BRUCE, Polymyositis-Scleroderma (PM-SCL) Autoantigen 1 und das hypothetische Protein FLJ12923 gefischt. Mit dem C-Terminus von mMunc-93 (Aminosäuren 431 – 459) interagiert unter diesen Bedingungen Shank3b. Die bekannten Funktionen dieser Proteine sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

<p>PM-SCL Autoantigen 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gewebeverteilung • Subzelluläre Lokalisation • Physiologische Funktion • Interaktion mit Munc-93 	<ul style="list-style-type: none"> • Starke Expression in sich teilenden Fibroblasten, Muskel- und Endothelzellen. In ruhenden Zellen ist die Expressionsrate gering (Kho et al., 1997). • Wahrscheinlich im Nukleolus und an bestimmten nukleoplasmatischen Punkten lokalisiert (Reimer et al., 1986; Gelpi et al., 1990). • Aktiviert die Transkriptionsfaktoren E12 und E47, die an der Regulation von Zellwachstum und -differenzierung beteiligt sind (Kho et al., 1997). Die Krankheit Polymyositis, die durch Autoimmunantikörper gegen das PM-SCL Autoantigen 1 ausgelöst wird, manifestiert sich in der Muskulatur. Es kommt zu Muskelschwäche und Muskelschmerzen, die Patienten können häufig nicht mehr aus dem Sitzen aufstehen (Pschyrembel, 1994). • Bindung an mMunc-93 (345-392) im Hefe-Zwei-Hybrid-System: +
<p>FLJ12923:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Physiologische Funktion • Interaktion bei Munc-93: 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypothetisches Protein ohne bekannte Motive in der Aminosäuresequenz und ohne signifikante Ähnlichkeit mit anderen Proteinen. • Bindung an mMunc-93 (345-392) im Hefe-Zwei-Hybrid-System: +
<p>BRUCE</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gewebeverteilung • Subzelluläre Lokalisation • Physiologische Funktion • Interaktion mit Munc-93 	<ul style="list-style-type: none"> • Nahezu ubiquitäre Expression. Die Expressionsstärke schwankt während der Entwicklung, das Protein ist aber in jedem Stadium vorhanden (Hauser et al., 1998). • Zytoplasmatisches peripheres Membranprotein des trans-Golgi-Netzwerks und anderer Vesikel (Hauser et al., 1998). • Die Ubiquitin konjugierende Domäne in der Nähe des C-Terminus kann unter ATP-Hydrolyse durch ein Ubiquitin aktivierendes Enzym mit Ubiquitin beladen werden (Hauser et al., 1998). Dieses wird gewöhnlich weiter auf die ε-Aminogruppe eines Lysinrestes des Substrats übertragen. Mehrfach ubiquitinierte Proteine werden durch das Proteasom degradiert (Jentsch et al., 1992). • Weiterhin besitzt BRUCE ein N-terminal gelegenes BIR (<u>B</u>aculovirus <u>i</u>nhibitor of apoptosis <u>r</u>epeat)-Motiv. Diese finden sich in Proteinen, die an der Inhibition der Apoptose beteiligt sind (Clem et al., 1997). Sie wirken durch Bindung von Caspasen (Deveraux et al., 1997). • Apollon, das menschliche Homologe des murinen BRUCE wurde in zahlreichen Krebszelllinien nachgewiesen und macht diese resistent gegen Apoptose (Chen et al., 1999). • Bindung an mMunc-93 (345-392) im Hefe-Zwei-Hybrid-System: ±
<p>Fettsäuresynthase</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gewebeverteilung • Subzelluläre Lokalisation • Physiologische Funktion • Interaktion mit Munc-93 	<ul style="list-style-type: none"> • Ubiquitäre Expression • Lokalisation im Zytosol. • Katalysiert die Synthese von Palmitat aus Acetyl-CoA, Malonyl-CoA und NADPH unter Verwendung von sieben verschiedenen katalytischen Zentren (Jayakumar et al., 1997). • Bindung an mMunc-93(345-392) im Hefe-Zwei-Hybrid-System: + bis ±
<p>MAGI3</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gewebeverteilung • Subzelluläre Lokalisation • Physiologische Funktion • Interaktion mit Munc-93 	<ul style="list-style-type: none"> • Nahezu ubiquitäre Expression. • In MDCK-Zellen und miteinander verbundenen NRK-Zellen an den Tight Junctions lokalisiert, in vereinzelt NRK-Zellen im Zytosol (Die et al., 1999; Nishimura et al., 2000). • Gerüstprotein mit 6 PDZ-Domänen (PDZ 0-5), 1 Guanylatkinasedomäne und 2 WW-Domänen. • MAGI3 interagiert über seine PDZ Domäne 2 mit einer Phosphatase mit Tensinhomologie (PTEN) (H. Wu et al., 2000; Y. Wu et al., 2000). Diese reguliert durch Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,-4,-5-phosphat die Aktivität der Proteinkinase B, die ebenfalls an Tight Junctions lokalisiert ist (Watton and Downward, 1999), und hat damit einen Einfluß auf die Resistenz der Zelle gegen Apoptose (Haas-Kogan et al., 1998; Whang et al., 1998; Wu et al., 1998). • Die PDZ Domäne 4 von MAGI3 interagiert im Gehirn mit dem BAI-1 (<u>b</u>rain specific <u>a</u>ngiogenesis <u>i</u>nhibitor 1)-Rezeptor, der an G-Proteine gekoppelt ist und sieben Transmembranhelices besitzt. BAI-1 verhindert die Angiogenese und spielt deshalb bei der Entwicklung von Tumoren eine wichtige Rolle (Shiratsuchi et al., 1997). • An die PDZ Domäne 5 von MAGI3 bindet der NMDA-Rezeptor 2B (Y. Wu et al., 2000), ein Ca²⁺-Kanal des Gehirns, der sich bei Glutamatbindung öffnet (Collingridge et al., 1992). • Bindung an mMunc-93 (345-392) im Hefe-Zwei-Hybrid-System: ++ • <i>In vitro</i> durch Bindung an GST-Fusionsprotein bestätigt

Munc-93 die Fettsäuresynthaseaktivität durch Modulation der Thioesteraseaktivität reguliert. Denkbar wäre aber auch, daß Munc-93 von der Fettsäuresynthase palmitoyliert wird oder die Palmitoylierung eines an Munc-93 gebundenen Proteins beeinflussen kann. Das mMunc-93-Fragment, an das die Fettsäuresynthase im Hefe-Zwei-Hybrid-System bindet (Aminosäuren 345-392), enthält allerdings kein Cystein, auf das eine Palmitylgruppe übertragen werden könnte. Die Palmitoylierung müßte folglich in einer Domäne stattfinden, die nicht für die Erkennung der Fettsäuresynthase zuständig ist. Reversible Palmitoylierungen von Proteinen können der Regulation der Signaltransduktion in eukaryotische Zellen dienen. Auch gibt es erste Hinweise darauf, daß eine solche Palmitoylierung von GAP-43, einem Protein, das das Auswachsen von Axonen induziert, tatsächlich von der Fettsäuresynthase selbst katalysiert wird (Ueno, 2000).

5.3.2 MAGI3

Der Abschnitt aus MAGI3, einem Gerüstprotein aus der Familie der membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUK), der, wie in dieser Arbeit gezeigt, im Hefe-Zwei-Hybrid-System und in GST-Fällungsexperimenten an mMunc-93 (345-392) und hMunc-93 bindet, enthält die dritte sowie einen Teil der vierten der insgesamt sechs PDZ-Domänen dieses Proteins. Sowohl mMunc-93 als auch hMunc-93 enthalten im Interaktionsbereich eine PDZ Typ3 (FFV) und eine PDZ Typ 2 Bindungsstelle (DAV). Ob die Bindung tatsächlich über eine dieser beiden Sequenzen mit der dritten PDZ-Domäne erfolgt, kann durch Bindungsexperimente mit Deletions- und Punktmutanten geklärt werden. Ein EGFP-Fusionsprotein mit dem aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-System erhaltenen Abschnitt von MAGI3 wird in MDCK-Zellen, die hMunc-93 überexprimieren, nicht zur Plasmamembran transloziert (Daten nicht gezeigt). Für die *in vivo* Bindung von MAGI3 an hMunc-93 bedeutet das, daß sie entweder nur zu bestimmten Zeitpunkten besteht, oder weitere Protein-Protein-Interaktionen für eine feste Bindung nötig sind. Das Ergebnis bestätigt Studien, nach denen die Membranassoziation von MAGI1b durch Bindung der fünften PDZ-Domäne an β -Catenin erfolgt (Dobrosotskaya and James, 2000). In Arbeiten bei denen die Bindungsaffinität verschiedener Peptide an die PDZ-Domänen 2 und 3 untersucht wurde, wurde das C-terminale Peptid TRWWFDI als Bindungspartner für PDZ 3 identifiziert (Fuh et al., 2000). In wieweit dieses Ergebnis auf die *in vivo* Situation übertragbar ist, ist ungeklärt, zumal auch eine Beteiligung weiterer Aminosäuren, die zur Bindung an PDZ-Domänen beitragen nicht ganz auszuschließen ist (Sudol, 1998). Außerdem wurden bei diesen Experimenten nur C-terminale PDZ-Bindungsdomänen analysiert, nicht aber interne, wie sie bei PDZ-Domänen des Typs 3 vorliegen (Fuh et al., 2000). Für die Bindung an die PDZ Domäne 2 wurde das Peptid ITWV bestimmt, dessen Affinität zu dieser Domäne 600 mal stärker ist als die der C-terminalen Sequenz des identifizierten Interaktionspartners PTEN (ITKV) (Fuh et al., 2000).

Der Kaliumkanal Kir3.2c, dessen Aktivierung durch Acetylcholin induziert und durch G-Proteine vermittelt wird, öffnet sich nur dann, wenn sein C-Terminus an eine PDZ-Domäne

der membranassoziierten Guanylatkinase SAP97 gebunden ist. Für die Aktivität ist die Guanylatkinasedomäne essentiell, obwohl sie nicht direkt mit dem Kanalprotein interagiert. Die Bindung eines weiteren Proteins an die Guanylatkinasedomäne von SAP97 scheint die Aktivierung von Kir3.2c zu ermöglichen (Hibino et al., 2000). Für die Assoziation von Unc-93 mit dem zweiporigen Kaliumkanal Sup-9 könnte das bedeuten, daß auch die Leitfähigkeit dieses Kanals durch ein Protein, das an die Guanylatkinasedomäne von MAGI3 gebunden vorliegt, reguliert wird. Eine Mutation die die Wechselwirkung von Unc-93 mit Sup-9 oder mit MAGI3 beeinflusst, könnte sich auf die Öffnungseigenschaften des K^+ -Kanals auswirken. Nach Untersuchungen von de la Cruz und Horvitz ist Sup-9 homolog zu TASK 1 (2000). Der Ausstrom von K^+ -Ionen durch TASK 1 ist pH abhängig (Duprat et al., 1997). Bei Ansäuerung auf extrazellulärer Seite, wie sie bei der Ausschüttung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt vorkommt, schließt er sich und erleichtert damit eine Depolarisierung der Membran. Ein unkontrolliert geöffneter Kanal hat eine Hyperpolarisation der Membran zur Folge und die Kontraktion der Muskelzellen wird erschwert. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, daß der schwerste Gummiband-Phänotyp durch eine Mutation im Sup-9 Gen hervorgerufen wird. Die Nematoden sind so stark geschädigt, daß sie sich in ihrem Leben um nicht mehr als ihre eigene Körperlänge fortbewegen (Levin and Horvitz, 1993).

5.3.3 DOCK180

DOCK180 aktiviert im Komplex mit CRK das kleine G-Protein RacI (Kiyokawa et al, 1998) (Abb. 24) und leitet damit eine Signaltransduktionskaskade ein, die eine polarisierte Erweiterung der Zelloberfläche ermöglicht (Reddien and Horvitz, 2000), wie sie für die Zellwanderung und Phagozytose notwendig ist. Ebenso spielt CED-5, das homologe Protein aus *C. elegans* eine Rolle bei der Zellwanderung in der Entwicklung des Nematoden (Blleloch et al., 1999) und ist auch dort zusammen mit CED-2 und CED-10, den Homologen von CRK und RacI an der Phagozytose apoptotischer Zellen beteiligt. Ein zweiter, redundanter Stoffwechselweg läuft über CED1, CED6 und CED7. CED-7 ist das Homologe zum humanen ABC Transporter ABC1 (Driscoll, 1996). In *Drosophila melanogaster* ist das zu DOCK180 homologe Protein Myoblast city essentiell für die Fusion von Myoblasten zu Synzytien, wobei es wahrscheinlich bei der Zellerkennung und Zelladhäsion eine Rolle spielt (Doberstein et al., 1997; Paululat et al., 1999).

Das bedeutet, daß der Unc-93 Phänotyp durch eine gestörte Kommunikation von Zellen untereinander ausgelöst werden könnte. Von den Muskelzellen, die für die Eiablage in *C. elegans* zuständig sind, werden nur vier direkt vom Motoneuron HSN aktiviert. Die übrigen zwölf stehen mit diesen über Gap Junctions in Verbindung und auch die Körperlängsmuskelzellen eines Quadranten sind über Gap Junctions miteinander verbunden. Wird die DOCK180 Aktivität nicht korrekt kontrolliert, kann diese Verbindung entweder ganz unterbrochen sein, was eine Kontraktion der 12 nicht innervierten Muskelzellen von Uterus und Vulva unmöglich machen würde, oder es sind zu viele Gap Junctions zwischen

den Zellen vorhanden. Ist letzteres der Fall kann Inositol-3-phosphat, ein Übermittler für die Kontraktion, zu schnell von einer Zelle zur nächsten diffundieren, und die verbundenen Zellen kontrahieren in zu enger zeitlicher Abfolge. Die Anzahl der Gap Junctions einer Zelle könnte Unc-93 über die Interaktion mit einem Ubiquitin konjugierenden Enzym wie BRUCE beeinflussen. In Vertebraten unterliegen Connexine, die Kanalproteine der Gap Junctions, einem schnellen Wechsel von Neusynthese und Degradation. Ihre Halbwertszeit beträgt oft nur 1 - 5 h (Fallon and Goodenough, 1981; Laird et al., 1991; Musil and Goodenough, 1991; Beardslee et al., 1998), selten mehr als einen Tag (Jiang et al., 1993). Einer der Abbauege verläuft über Endozytose der Connexine gefolgt von Ubiquitinierung und Degradation im Proteasom. Obwohl Connexine und Innexine, die Porenbildner der Gap Junctions in Invertebraten keine Sequenzhomologien aufweisen, wäre es möglich, daß auch sie einer schnellen Abfolge von Degradation und Neusynthese unterliegen. Eine gestörte Regulation der Ubiquitinierungsaktivität von BRUCE könnte zu einer Erhöhung der Anzahl an Gap Junctions und damit zu einer schnelleren Weiterleitung von Aktionspotentialen in den Muskelzellen führen. Das Ausbleiben der Ubiquitinierung von Innexinen der Gap Junctions, ließe sich durch Immunmarkierung ermitteln. Ist der Abbau dieser Innexine gestört, so sammeln sie sich in der Plasmamembran an.

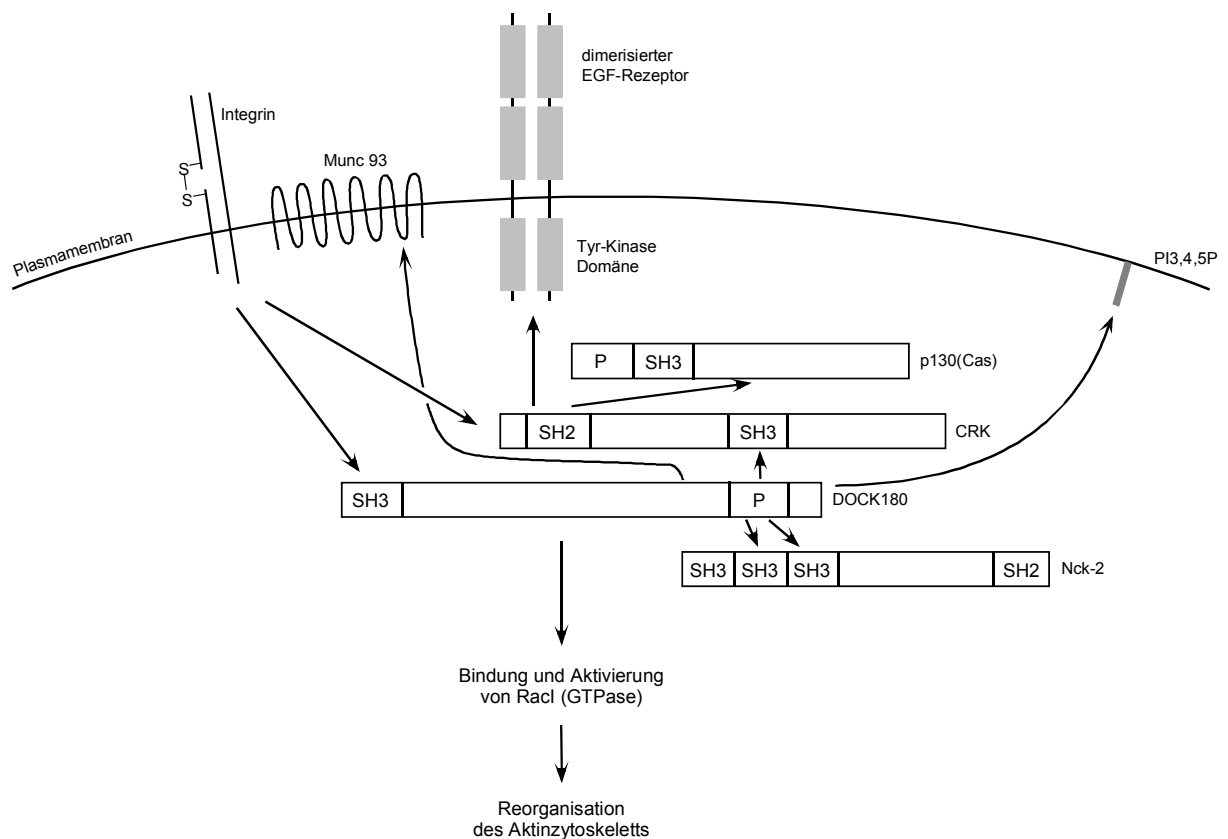


Abb. 24: Schematische Darstellung von DOCK180 und assoziierten Proteinen. EGF: epidermaler Wachstumsfaktor; P: prolinreiche Sequenz; PI3,4,5P: Phosphatidylinositol-3,-4-,5-phosphat; SH: Src-Homologie; Tyr: Tyrosin

5.3.4 Shank3b

In dieser Arbeit wurde eine Wechselwirkung der PDZ-Domäne von Shank3b, einem Protein mit zahlreichen Domänen für Protein-Protein-Interaktionen (vgl. Abb. 25) mit mMunc-93 (431-459) im Hefe-Zwei-Hybrid-System nachgewiesen. mMunc-93 besitzt wie hMunc-93 und GH10120 ein C-terminales PDZ-Typ 1 Bindungsmotiv (KTKI bzw. QTKM oder VTRL). Die bestcharakterisierte Interaktion von einem Protein mit der PDZ-Domäne von Shank ist die mit dem Guanylatkinase assoziierten Protein GKAP, das mit weiteren Gerüstproteinen in Verbindung steht (Boeckers et al., 1999b; Naisbitt et al., 1999; Tu et al., 1999; Yao et al., 1999). Die Bindung an Shank erfolgt über die PDZ-Domänen bindenden C-terminalen vier Aminosäuren (QTRL). Splicevarianten von GKAP mit veränderter C-terminaler Sequenz binden nicht. Neben GKAP wurde auch eine Bindung der metabotropen Glutamatrezeptoren 1 α und 5 sowie des Somatostatinrezeptors 2 an die PDZ-Typ 1 Domäne von Shank1 und 2 nachgewiesen (Tu et al., 1999; Zitzer et al., 1999a, b). Die Somatostatinrezeptoren 1 und 3 besitzen ebenfalls ein C-terminales PDZ-Typ 1-Bindungsmotiv, zeigen aber im Hefe-Zwei-Hybrid-System keine Interaktion mit Shank (Zitzer et al., 1999a), was belegt, daß weitere Aminosäuren für die Bindung eine Rolle spielen.

Da Shank3 ebenso wie TASK1 hauptsächlich im Herzmuskel exprimiert wird (Kim et al., 1998; 1999; Lim et al., 1999), einem der vier Organe, in dem auch hMunc-93 mRNA zu finden ist, ist ein Zusammenwirken dieser drei Proteine auch beim Menschen möglich. GKAP dagegen wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert, nicht aber im Herzen, der Milz, dem Skelettmuskel, der Leber oder der Niere (Naisbitt et al., 1997) und kann demzufolge die nur schwache Wechselwirkung zwischen Shank3b und Munc-93 nicht behindern.

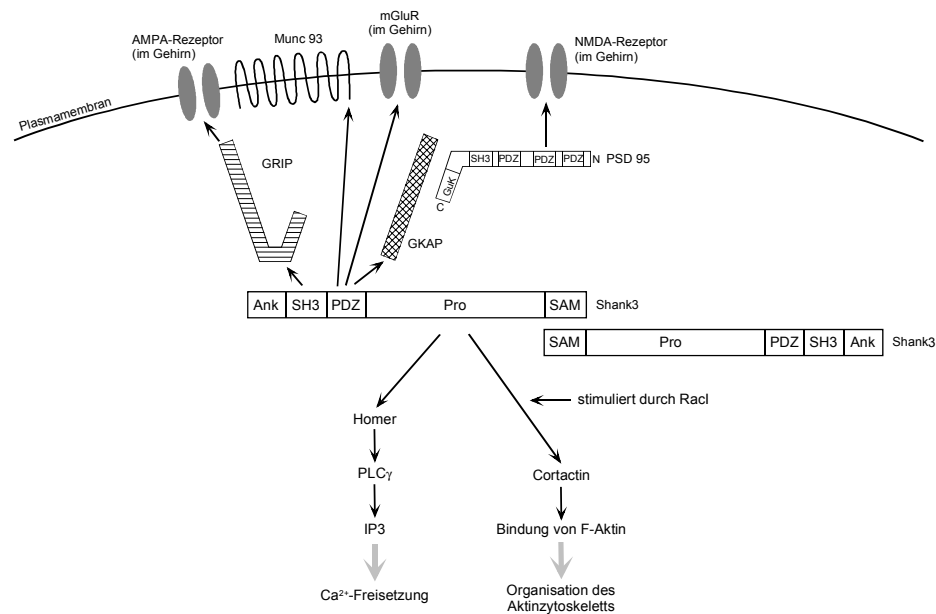


Abb. 25: Schematische Darstellung von Shank3b und assoziierten Proteinen. Ank: Ankyrin Bindungsstelle; GKAP: Guanylatkinase assoziiertes Protein; GuK: Guanylatkinase-Domäne; IP3: Inositol-3-phosphat; Pro: prolinreiche Sequenz; PDZ: PSD-95/ Dlg/ZO-1 ähnliche Domäne; PLC γ : Phospholipase C γ ; SH3: Src-Homologie3; SAM: steriles alpha Motiv; mGluR: metabotroper Glutamatrezeptor

5.3.5 Mögliche Bedeutung der Wechselwirkung mit MAGI3, Shank3b und DOCK180 für die Funktion von Munc-93

Die gefundenen Interaktionen von Munc-93 mit MAGI3, DOCK180 und Shank3b machen deutlich, daß Munc-93 in ein Geflecht vieler Proteine in der Nähe der Plasmamembran eingebunden ist. Nur wenn das Zusammenspiel aller Proteine funktioniert, können zytoplasmatische Proteine an die Plasmamembran rekrutiert werden oder integrale Membranproteine so versammelt werden, daß sie ihre Funktion ausüben können. Das zeigt sich zum Beispiel für den GABA_A-Rezeptor in der postsynaptischen Membran von Hippocampusneuronen. Können sich diese durch das Fehlen der γ 2-Untereinheit nicht zusammenlagern, haben sie eine deutlich verringerte Leitfähigkeit (Günther et al., 1995; Essrich et al., 1998). Außerdem spielt in diesen Zellen die Organisation des Aktinzytoskeletts durch RacI eine entscheidende Rolle für die Aktivität des GABA_A-Rezeptors (Meyer et al., 2000). Shank und DOCK180 sind beide an der Regulation der RacI Aktivität beteiligt. Da in *C. elegans* ein GABA_A-Rezeptor in der Plasmamembran der Körperlängsmuskeln für die Relaxation dieser Zellen bei der Schlängelbewegung zuständig ist, wäre es denkbar, daß eine durch Mutation im unc-93 Gen hervorgerufene verringerte Aktivität des GABA_A-Rezeptors für den Gummiband-Phänotyp verantwortlich ist, weil die Muskelzelle nicht auf das inhibitorische Signal GABA reagieren kann. Dabei ist allerdings zu beachten, daß unc-47 Mutanten, denen der GABA_A-Rezeptor fehlt, ebenfalls eine zeitgleiche Kontraktion aller Körpermuskeln zeigen, aber nicht den für Unc-93 Mutanten typischen Gummiband-Phänotyp, das heißt die schnelle Abfolge mehrerer Kontraktionen und Relaxationen aller Muskelzellen. Muscimol, ein GABA Agonist, der GABA_A-Rezeptoren in der Körpermuskulatur öffnet (Eldefrawi and Eldefrawi, 1987), löst in Wildtypnematoden einen Gummiband-Phänotyp aus (Levin and Horvitz, 1992). Dieser Effekt beruht nicht auf einer Hyperpolarisierung der Zellen durch Öffnung von Cl⁻-Kanälen sondern auf einer Verringerung der Anzahl an GABA_A-Rezeptoren in der Membran durch Internalisierung bei wiederholter Stimulation (Tehrani and Barnes, 1991; Meyer et al., 2000).

Der Komplex aus Unc-93, Sup-9 und Sup-10 könnte die Signaltransduktionskaskade beeinflussen, die die Internalisierung oder Fusion von mit GABA_A-Rezeptoren beladenen Vesikeln mit der postsynaptischen Membran reguliert. Die Bindung eines Liganden auf intra- oder extrazellulärer Seite an Unc-93 oder der Transport eines möglicherweise auf präsynaptischer Seite sezernierten Metaboliten aus dem synaptischen Spalt in die Zellen könnte das Signal für die Induktion eines der beiden Prozesse sein. Es ist dann denkbar, daß eine Mutation in einem der drei Proteine die Internalisierung beschleunigt, weil die Signalkaskade ständig induziert wird, oder die Fusion behindert, weil ein in dieser involvierter Faktor gebunden wird. Kann sich der Komplex aus Unc-93, Sup-9 und Sup-10 nicht bilden, weil eines der drei Gene deletiert ist, so können andere Signalkaskaden deren Funktion übernehmen.

Ein solcher Mechanismus kann auch für die Serotoninrezeptoren in der Plasmamembran der von den HSN Motoneuronen innervierten Muskelzellen des Uterus in Frage kommen, die nach Bindung des Neurotransmitters die Kontraktion für die Eiablage induzieren. Ein Indiz für einen postsynaptischen Defekt in den Unc-93 Mutanten, der durch das Fehlen von Serotoninrezeptoren verursacht sein kann, ist die Beobachtung von D. J. Reiner, D. Weinshenker und J. H. Thomas, daß eine Gabe von Serotonin die Eiablage nicht induzieren kann (1995).

Auch wenn GABA_A-Rezeptoren nicht in der Membran von Säugermuskeln vorkommen, könnte ein dem Unc-93/Sup-9/Sup-10-Komplex verwandter Komplex eine Fusion bestimmter Vesikel mit der postsynaptischen Membran einleiten. Dabei könnte hMunc-93, das nur in der Leber, der Niere, dem Herzen und dem Skelettmuskel exprimiert wird, auf ein spezifisches Signal hin aktiv sein, während hMunc-93B einen ubiquitär vorkommenden Liganden bindet.

Daß keine weiteren Fehlfunktionen in Unc-93 mutierten Nematoden zu sehen sind kann darauf beruhen, daß alle drei Proteine nur in diesen Muskelzellen exprimiert werden. Dies scheint, wenn man bedenkt, daß Sup-18 und Sup-10 nur in diesen Zellen vorkommen, durchaus wahrscheinlich. Des weiteren wird nicht die Aktivität aller Neurotransmitterrezeptoren durch Internalisierung reguliert. Die Aktivität des NMDA-Rezeptors zum Beispiel wird durch eine Verringerung seiner Affinität zum Liganden oder den Eintritt in einen langlebigen inaktiven Zustand herabgesetzt (Carroll et al., 1999; Nahum-Levy et al., 2001).

6 Ausblick

hMunc-93 ist in der Plasmamembran lokalisiert und besitzt wie alle zu Unc-93 aus *C. elegans* homologen Proteine Ähnlichkeiten mit Transportern mit 12 Transmembrandomänen. Durch Interaktionen mit Proteinen des Membranzytoskeletts scheint es mit zahlreichen weiteren Membran- und membranassoziierten Proteinen in Kontakt zu treten. Durch diese Wechselwirkungen könnte es entweder eine Rolle in der Organisation des Aktinkortex spielen, der zum Beispiel für die Funktion von GABA_A-Rezeptoren essentiell ist (Meyer et al., 2000), oder an der koordinierten Öffnung von Ionenkanälen beteiligt sein, deren Aktivität das Membranpotential beeinflusst. Für das bessere Verständnis der regulatorischen Aktivität von Unc-93 sind allerdings noch weitere Untersuchungen nötig.

In vitro und *in vivo* Bindungsexperimente müssen zeigen, ob tatsächlich alle im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Interaktionen in der Zelle relevant sind. Für die zytoplasmatische Schleife zwischen den Transmembrandomänen sechs und sieben wurden sechs verschiedene Bindungspartner identifiziert. Sind tatsächlich alle diese Wechselwirkungen in der Zelle von Bedeutung, so geben Kompetitionsversuche und die Bestimmung der genauen Bindungsstelle jedes einzelnen durch Bindungsstudien mit verkürzten Proteinen oder Punktmutanten Aufschluß über das Zusammenwirken aller Proteine im Komplex. Dabei ist auch die Bestimmung von Zellen, in denen diese Proteine koexprimiert werden wichtig. Einen guten Ansatzpunkt, um solche Zellen zu finden stellen *in situ* Hybridisierungen an Mausorganen dar.

Für die Eingliederung von Unc-93 und seinen Homologen in eine Signaltransduktionskaskade könnte die Untersuchung ihrer Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen hilfreich sein. Das ist besonders für die Sequenzabschnitte interessant, die zu den Aminosäuren 226 bis 248 und 470 bis 494 von Unc-93 homolog sind, weil in diesen in vielen der Proteine potentielle Phosphorylierungsmotive vorhanden sind.

Unc-93 zeigt Sequenzähnlichkeiten mit einem Transporter für Zucker oder andere Metaboliten. Einen bedeutenden Aspekt im Verständnis der Funktion von Unc-93 und seinen Homologen würde die Bestimmung des von ihnen transportierten oder gebundenen Moleküls darstellen. Das würde vielleicht auch das Verständnis erleichtern, warum es in Säugern mindestens zwei zu Unc-93 homologe Proteine gibt, die so unterschiedliche Expressionsmuster zeigen. Falls Munc-93 und Munc-93B für den Transport des gleichen Metaboliten in unterschiedliche Zellkompartimente verantwortlich sind, wie das zum Beispiel bei Nukleotidzuckertransportern zu beobachten ist, ließe sich dieses durch Lokalisierung von hMunc-93B in der Zelle überprüfen. Dazu könnten entweder entsprechende GFP-Fusionsproteine exprimiert oder Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt werden.

Einen weiteren Schritt für das Verständnis der Funktion von Munc-93 würde die Identifizierung eines Munc-93 liefern, das eine zur N-terminalen hydrophilen Domäne von Unc-93 homologe Sequenz besitzt oder eines Proteins, das die Funktion dieser Domäne aus

C. elegans übernommen hat. Wichtige Erkenntnisse könnte auch die Identifizierung der Homologen zu Sup-9 und Sup-10, direkten Bindungspartnern von Unc-93 in der Membran bringen. Bei computergestützten Suchen in Gendatenbanken wurden bisher allerdings keine entsprechenden Sequenzen gefunden. Durch die Lokalisation von hMunc-93 in der Plasmamembran und seine Interaktion mit mehreren Proteinen, die in der Nähe der Plasmamembran aktiv sind, bietet sich für die Suche nach den entsprechenden Homologen die Durchführung eines zweiten modifizierten Hefe-Zwei-Hybrid-Experimentes an, bei dem Interaktionen in der Umgebung der Plasmamembran betrachtet werden (Aronheim et al., 1997). Verwendet wird dabei der Hefestamm cdc25H, der sich durch eine temperatursensitive Mutation im Gen des Nukleotidaustauschfaktors cdc25 auszeichnet. Derartig veränderte Hefezellen können zwar noch bei 25 °C wachsen, nicht aber bei 37 °C. In diesen Zellen werden die Gene einer cDNA-Genbank mit src-Myristoylierungssignalsequenz und ein zytoplasmatischer Abschnitt von Munc-93 als hSos-Fusionsprotein exprimiert. Bei einer Wechselwirkung zwischen einem membranverankerten Protein aus der Bibliothek mit dem Munc-93 hSos-Fusionsprotein wird hSos, das menschliche Homologe von cdc25, zur Plasmamembran dirigiert, wo es den Ras-Stoffwechselweg aktiviert und damit den Hefezellen ein Wachstum bei 37 °C ermöglicht.

Die Sequenz von Sup-9 ist bisher nicht publiziert. Handelt es sich wie von der Arbeitsgruppe von Horvitz berichtet um einen zweiporigen Kaliumkanal mit Homologie zu TASK-1, so ließe sich ein Einfluß von Munc-93 auf das zugehörige Kanalprotein durch Patch-Clamp-Messungen an *Xenopus Oocyten* näher charakterisieren. Für die Ausbildung eines funktionstüchtigen Kanals ist dazu möglicherweise die gleichzeitige Expression des Sup-10 Homologen und vielleicht sogar von MAGI3 notwendig (Hibino et al., 2000). In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant zu überprüfen, ob die C-terminale PDZ-TypI-Bindungsdomäne von TASK-1 an eine der sechs PDZ-Domänen von MAGI3 binden kann.

Aufschlußreich wäre auch eine Untersuchung des Effektes von *C. elegans* Mutationen im Säugerprotein. Sowohl durch Expression von Munc-93 Mutanten in *Xenopus Oocyten* oder kultivierten Muskelzellen, bei denen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik ein verändertes Membranpotential nachweisbar sein sollte, wenn diese Mutationen tatsächlich eine gestörte K⁺-Kanalaktivität zur Folge haben, als auch durch Funktionsanalyse von Munc-93 anhand transgener Mäuse, die ein mutiertes munc-93 Gen exprimieren.

7 Literatur

ALBERT ML, KIM JI, BIRGE RB (2000). alphavbeta5 integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* **2**: 899–905

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410.

AMERSHAM (1992). ECL Western Blotting protocols.

ARNDT-JOVIN DJ, JOVIN TM (1989). Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell Biol* **30**: 417–448

ARONHEIM A (1997). Improved efficiency sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives. *Nucleic Acids Res* **25**: 3373–3374

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

BARTEL PL, FIELDS S (1995). Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol* **254**: 241–263

BEARDSLEE MA, LAING JG, BEYER EC, SAFFITZ JE (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* **83**: 629–635

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

BLATTEIGER B AND NEWHALL W (1982). The use of Tween-20® as a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes *Journal of Immunological Methods* **55**: 297–307

BLELLOCH R, NEWMAN C, KIMBLE J Biol (1999). Control of cell migration during *C. elegans* development. *Curr Opin Cell* **11**: 608–613

BOECKERS TM, KREUTZ MR, WINTER C, ZUSCHRATTER W, SMALLA KH, SANMARTI-VILA L, WEX H, LANGNAESE K, BOCKMANN J, GARNER CC, GUNDELFINGER ED (1999a). Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J Neurosci* **19**: 6506–6518

BOECKERS TM, WINTER C, SMALLA KH, KREUTZ MR, BOCKMANN J, SEIDENBECHER C, GARNER CC, GUNDELFINGER ED (1999b). Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 247–252

BOLIVAR F, RODRIGUEZ RL, GREENE PJ, BETLACH MC, HEYNEKER HL, BOYER HW (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95–113

BOYER HW, ROULLAND-DUSSOIX D (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**: 459–472

BRANDT NR, CASWELL AH, BRUNSCHWIG JP, KANG JJ, ANTONIU B, IKEMOTO N (1992). Effects of anti-triadin antibody on Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **299**: 57–59

- BROSE N, HOFMANN K, HATA Y, SUDHOF TC (1995). Mammalian homologues of *C. elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins.. *J Biol Chem* **270**: 25273–25280
- BUCHER P, KARPLUS K, MOERI N, HOFMANN K (1996). A flexible search technique based on generalized profiles. *Computers and Chemistry* **20**: 3–24
- CAIRNS P, OKAMI K, HALACHMI S, HALACHMI N, ESTELLER M, HERMAN JG, JEN J, ISAACS WB, BOVA GS, SIDRANSKY D (1997). Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* **57**: 4997–5000
- CALFIE M AND WHITE J (1988). The nervous system. In „The Nematode *C. elegans*”. W. Wood and the community of *C. elegans* researchers, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor, New York*. 337–392
- CHEN Z, NAITO M, HORI S, MASHIMA T, YAMORI T, TSURUO T (1999). A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 847–854
- CHINNAIYAN AM, O’ROURKE K, LANE B, DIXIT VM (1997). Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: A molecular framework for cell death. *Science* **275**: 1122–1126
- CLARK EA, BRUGGE JS (1993). Redistribution of activated pp60c-src to integrin-dependent cytoskeletal complexes in thrombin-stimulated platelets. *Mol Cell Biol* **13**: 1863–1871
- CLEM RJ AND DUCKETT CS (1997). The iap genes: unique arbitrators of cell death. *Trends Cell Biol* **7**: 337–339
- COLLINGRIDGE GL, RANDALL AD, DAVIES CH, ALFORD S (1992). The synaptic activation of NMDA receptors and Ca²⁺ signalling in neurons. *Ciba Found Symp* **164**:162-171
- CORMACK BP, BERTRAM G, EGERTON M, GOW NA, FALKOW S, BROWN AJ (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP)a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**: 303–311
- CORMACK BP, VALDIVIA RH, FALKOW S (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33–38
- CUMMINS C, ANDERSON, P (1991). Analysis of the *mlc-1,2 sup-10(X)* region. *International Worm Meeting Abstract* **84**
- DAGERT, M AND EHRLICH, SD (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Genes* **6**: 23–28
- DE LA CRUZ IP HORVITZ HR (2000). Characterization of *sup-11* and *sup-18*, two regulators of the SUP-9/SUP10/UNC-93 two-pore potassium channel complex. *East Coast Worm Meeting Abstract* **168**
- DE LA CRUZ IP, CANNON SC, HORVITZ HR (1998). *Sup-9* and *Sup-10* may be two components of a K⁺ channel involved in the regulation of muscle contraction. *East Coast Worm Meeting Abstract* **153**
- DE LA CRUZ IP, HORVITZ HR (1997). THE *sup-9* rubber-band gene may encode a potassium channel. *International Worm Meeting Abstract* **123**
- DEVERAUX QL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, REED JC (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**: 300–304

- DOBERSTEIN SK, FETTER RD, MEHTA AY, GOODMAN CS (1997). Genetic analysis of myoblast fusion: blown fuse is required for progression beyond the prefusion complex. *J Cell Biol* **136**: 1249–1261
- DOBROSOTSKAYA IY, JAMES GL (2000). MAGI-1 interacts with beta-catenin and is associated with cell-cell adhesion structures. *Biochem Biophys Res Commun* **270**: 903–909
- DONOSO P, PRIETO H, HIDALGO C (1995). Luminal calcium regulates calcium release in triads isolated from frog and rabbit skeletal muscle. *Biophys J* **68**: 507–515
- DOWER WJ, MILLER JF, RAGSDALE CW (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**: 6127–6145
- DRISCOLL M (1996). Cell death in *C. elegans*: molecular insights into mechanisms conserved between nematodes and mammals. *Brain Pathol* **6**: 411–425
- DU Y, WEED SA, XIONG WC, MARSHALL, TD PARSONS JT (1998). Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol* **18**: 5838–5851
- DUPRAT F, LESAGE F, FINK M, REYES R, HEURTEAUX C, LAZDUNSKI M (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J* **16**: 5464–5471
- ECKHARDT M, GOTZA B, GERARDY-SCHAHN R (1999). Membrane topology of the mammalian CMP-sialic acid transporter. *J Biol Chem* **274**: 8779–8787
- ELDEFRAWI AT, ELDEFRAWI ME (1987). Receptors for gamma-aminobutyric acid and voltage-dependent chloride channels as targets for drugs and toxicants. *FASEB J* **1**: 262–271
- ELLIS RE, JACOBSON DM, HORVITZ HR (1991). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *C. elegans*. *Genetics* **129**: 79–94
- ESSRICH C, LOREZ M, BENSON JA, FRITSCHY JM, LUSCHER B (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* **1**: 563–571
- FALLON RF AND GOODENOUGH DA (1981). Five-hour half-life of mouse liver gap junction protein. *J Cell Biol* **90**: 521–526
- FIELDS S AND SONG O (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–246
- FROEMMING GR, OHLENDIECK K (2001). The role of ion-regulatory membrane proteins of excitation-contraction coupling and relaxation in inherited muscle diseases. *Front Biosci* **6**: D65–74
- FUH G, PISABARRO MT, LI Y, QUAN C, LASKY LA, SIDHU SS (2000). Analysis of PDZ domain-ligand interactions using carboxyl-terminal phage display. *J Biol Chem* **275**: 21486–21491
- GELPI C, ALGUERO A, ANGELES MARTINEZ M, VIDAL S, JUAREZ C, RODRIGUEZ-SANCHEZ JL (1990). Identification of protein components reactive with anti-PM/Scl autoantibodies. *Clin Exp Immunol* **81**: 59–S64
- GISH W, STATES DJ (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genet* **3**: 266–272.

- GREENWALD IS, HORVITZ HR (1980). *unc-93(e1500)*: A behavioral mutant of *C. elegans* that defines a gene with a wild-type null phenotype. *Genetics* **96**: 147–164
- GREENWALD IS, HORVITZ HR (1982). Dominant suppressors of a muscle mutant define an essential gene of *C. elegans*. *Genetics* **101**: 211–225
- GREENWALD IS, HORVITZ HR (1986). A visible allele of the muscle gene *sup-10X* of *C. elegans*. *Genetics* **113**: 63–72
- GRIBSKOV M, MCLACHLAN AD EISENBERG D (1987). Profile analysis: detection of distantly related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4355–4358
- GUAN, KL AND DIXON, JE (1991). Eukaryotic Proteins Expressed in *Escherichia coli*: An Improved Thrombin Cleavage and Purification Procedure of Fusion Proteins with Glutathione S-Transferase. *Anal. Biochem.* **192**: 262–267
- GUNTHER U, BENSON J, BENKE D, FRITSCHY JM, REYES G, KNOFLACH F, CRESTANI F, AGUZZI A, ARIGONI M, LANG Y, ET AL. (1995). Benzodiazepine-insensitive mice generated by targeted disruption of the gamma 2subunit gene of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7749–7753
- GUO W, CAMPBELL KP (1995). Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **270**: 9027–9030
- HAAS-KOGAN D, SHALEV N, WONG M, MILLS G, YOUNT G, STOKOE D (1998). Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* **8**: 1195–1198
- HALL DH, HEDGECOCK EM (1991). Kinesin-related gene *unc-104* is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell* **65**: 837–847
- HARLOW E AND LANE D (1998). In „Using Antibodies. A Laboratory Manual“. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor, New York* 44–45, 144
- HARTMANN E, RAPOPORT TA, LODISH HF (1989). Predicting the orientation of eukaryotic membrane-spanning proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5786–5790
- HASEGAWA H, KIYOKAWA E, TANAKA S, NAGASHIMA K, GOTOH N, SHIBUYA M, KURATA T, MATSUDA M (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol Cell Biol* **16**: 1770–1776
- HATA Y, SLAUGHTER CA, SUDHOF TC (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains *unc-18* homologue bound to syntaxin.. *Nature* **366**: 347–351
- HAUSER HP, BARDORFF M, PYROWOLAKIS G, JENTSCH S (1998). A giant ubiquitin-conjugation enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* **141**: 1415–1422
- HEMPSTEAD BL, BIRGE RB, FAJARDO JE, GLASSMAN R, MAHADEO D, KRAEMER R, HANAFUSA H (1994). Expression of the *v-crk* oncogene product in PC12 cells results in rapid differentiation by both nerve growth factor- and epidermal growth factor-dependent pathways. *Mol Cell Biol* **14**: 1964–1971
- HENGARTNER MO AND HORVITZ RH (1994). Programmed cell death in *C. elegans*. *Curr Opin Genet Dev* **4**: 581–586

HERMAN RK (1984). Analysis of genetic mosaics of the nematode *Caneorhabditis elegans*. *Genetics* **108**: 165–180

HIBINO H, INANOBE A, TANEMOTO M, FUJITA A, DOI K, KUBO T, HATA Y, TAKAI Y, KURACHI Y (2000). Anchoring proteins confer G protein sensitivity to an inward-rectifier K(+) channel through the GK domain. *EMBO J* **19**: 78–83

HOFMANN K AND STOFFEL W (1993). Tmbase – A database of membrane spanning protein segments. *Biol Chem Hoppe Seyler* **347**: 166

HOWELL KE, PALADE GE (1982). Hepatic Golgi fractions resolved into membrane and content subfractions. *J Cell Biol* **92**: 822–832.

IDE N, HATA Y, NISHIOKA H, HIRAO K, YAO I, DEGUCHI M, MIZOGUCHI A, NISHIMORI H, TOKINO T, NAKAMURA Y, TAKAI Y (1999). Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAI-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells. *Oncogene* **18**: 7810–7815

IKEMOTO N, RONJAT M, MESZAROS LG, KOSHITA M (1989). Postulated role of calsequestrin in the regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* **28**: 6764–6771

JAYAKUMAR A, CHIRALA SS, WAKIL SJ (1997). Human fatty acid synthase: assembling recombinant halves of the fatty acid synthase subunit protein reconstitutes enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 12326–12330

JIANG JX, PAUL DL, GOODENOUGH DA (1993). Posttranslational phosphorylation of lens fiber connexin46: a slow occurrence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**: 3358–3563

JULIANO RL, HASKILL S (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **120**: 577–585

KHO CJ, HUGGINS GS, ENDEGE WO, PATTERSON C, JAIN MK, LEE ME, HABER E (1997). The polymyositis-scleroderma autoantigen interacts with the helix-loop-helix proteins E12 and E47. *J Biol Chem* **272**: 13426–13431

KHYSE-ANDERSON J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from acrylamid to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203–209

KIM D, FUJITA A, HORIO Y, KURACHI Y (1998). Cloning and functional expression of a novel cardiac two-pore background K⁺channel (cTBAK-1). *Circ Res* **82**: 513–518

KIM Y, BANG H, KIM D (1999). TBAK-1 and TASK-1, two-pore K(+) channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am J Physiol* **277**: H1669–1678

KIYOKAWA E, HASHIMOTO Y, KOBAYASHI S, SUGIMURA H, KURATA T, MATSUDA M (1998). Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes Dev* **12**: 3331–3336

KNUDSON CM, STANG KK, JORGENSEN AO, CAMPBELL KP (1993). Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem* **268**: 12637–12645

KOBAYASHI S, SHIRAI T, KIYOKAWA E, MOCHIZUKI N, MATSUDA M, FUKUI Y (2001). Membrane recruitment of DOCK180 by binding to PtdIns(3,4,5)P₃. *Biochem J* **354**: 73–78

- LAEMMLI, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- LAIRD DW, PURANAM KL, REVEL JP (1991). Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured myocytes. *Biochem J* **273**: 67–72
- LAMBALLE F, KLEIN R, BARBACID (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *M Cell* **66**: 967–679
- LAMBALLE F, KLEIN R, BARBACID M (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**: 967–979
- LAMOUREUX P, ALTUN-GULTEKIN ZF, LIN C, WAGNER JA, HEIDEMANN SR (1997). Rac is required for growth cone function but not neurite assembly. *J Cell Sci* **110**: 635–641
- LENNON GG, AUFRAY C, POLYMEROPOULOS M, SOARES MB (1996). The I.M.A.G.E. consortium: An integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* **37**: 151–152
- LEONG P, MACLENNAN DH (1998). A 37-amino acid sequence in the skeletal muscle ryanodine receptor interacts with the cytoplasmic loop between domains II and III in the skeletal muscle dihydropyridine receptor. *J Biol Chem* **273**: 7791–7794
- LEVIN JZ, HORVITZ HR (1992). The *C. elegans* unc-93 gene encodes a putative transmembrane protein that regulates muscle contraction. *J Cell Biol* **117**: 143–155
- LEVIN JZ, HORVITZ HR (1993). Three new classes of mutations in the *C. elegans* muscle gene sup-9. *Genetics* **135**: 53–70
- LIM S, NAISBITT S, YOON J, HWANGM JI, SHU PG, SHENG M, KIM E (1999). Characterization of the shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative splicing and differential expression in brain and development. *J Biol Chem* **274**: 29510–29518
- LONGLEY RL, WOODS A, FLEETWOOD A, COWLING GJ, GALLAGHER JT, COUCHMAN JR (1999). Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci* **112**: 3421–3431
- MAIDEN MCJ, DAVIS EO, BALDWIN SA, MOORE DCM, HENDERSON PJF (1987). Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* **325**: 641–643
- MANCINI A, NIEDENTHAL R, JOOS H, KOCH A, TROULIARIS S, NIEMANN H, TAMURA T (1997). Identification of a second Grb2 binding site in the v-Fms tyrosine kinase. *Oncogene* **15**: 1565–1572
- MAYER T, TAMURA T, FALK M, NIEMANN H (1988). Membrane integration and intracellular transport of the coronavirus glycoprotein E1, a class III membrane glycoprotein. *J Biol Chem* **263**: 14956–14963
- MCKNIGHT JL, KRISTIE TM, ROIZMAN B (1987). Binding of the virion protein mediating alpha gene induction in herpes simplexvirus 1-infected cells to its cis site requires cellular proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7061–7065
- MEYER DK, OLENIK C, HOFMANN F, BARTH H, LEEHUIS J, BRUNIG I, AKTORIES K, NORENBURG W (2000). Regulation of somatodendritic GABAA receptor channels in rat hippocampal neurons: evidence for a role of the small GTPase Rac1. *J Neurosci* **20**: 6743–6751

- MINO A, OHTSUKA T, INOUE E, TAKAI Y (2000). Membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation (MAGI)-1/brain angiogenesis inhibitor 1-associated protein (BAP1) as a scaffolding molecule for Rap small G protein GDP/GTP exchange protein at tight junctions. *Genes Cells* **5**: 1009–1016
- MUSIL LS AND GOODENOUGH DA (1991). Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* **115**: 1357–1374
- NAHUM-LEVY R, LIPINSKI D, SHAVIT S, BENVENISTE M (2001). Desensitization of NMDA Receptor Channels Is Modulated by Glutamate Agonists. *Biophys J* **80**: 2152–2166
- NAISBITT S, KIM E, TU JC, XIAO B, SALA C, VALTSCHANOFF J, WEINBERG RJ, WORLEY PF, SHENG M (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* **23**: 569–582
- NAISBITT S, KIM E, WEINBERG RJ, RAO A, YANG F-C, CRAIG AM, SHENG M (1997). Characterization of Guanylate Kinase-Associated Protein, a Postsynaptic Density Protein at Excitatory Synapses That Interacts Directly with Postsynaptic Density-95/Synapse-Associated Protein 90. *J Neurosci* **17**: 5687–5696
- NILSSON IM, VON HEIJNE G (1993). Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **268**: 5798–5801
- NISHIMURA W, IIZUKA T, HIRABAYASHI S, TANAKA N, HATA Y (2000). Localization of BAI-associated protein1/membrane-associated guanylate kinase-1 at adherens junctions in normal rat kidney cells: polarized targeting mediated by the carboxyl-terminal PDZ domains. *J Cell Physiol* **185**: 358–365
- PAULULAT A, HOLZ A, RENKAWITZ-POHL R (1999). Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev* **83**: 17–26
- PAWSON T (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**: 573–580
- PAWSON T, SCOTT JD (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* **278**: 2075–2080
- PROUDFOOT NJ, BROWNLEE GG (1976). 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**: 211–214
- PSCHYREMBEL (1994). Klinisches Wörterbuch. *Walter de Gruyter Verlag, New York* 1224
- QIAGEN (1995). Plasmid Purification Handbook.
- RAND JB, RUSSELL RL (1984). Choline acetyltransferase-deficient mutants of the nematode *C. elegans*. *Genetics* **106**: 227–248
- RASHEED BK, STENZEL TT, MCLENDON RE, PARSONS R, FRIEDMAN AH, FRIEDMAN HS, BIGNER DD, BIGNER SH (1997). PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res* **57**: 4187–4190
- REDDIEN PW, HORVITZ HR (2000). CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *C. elegans*. *Nat Cell Biol* **2**: 131–136

- REIMER G, SCHEER U, PETERS JM, TAN EM (1986). Immunolocalization and partial characterization of a nucleolar autoantigen (PM-Scl) associated with polymyositis/scleroderma overlap syndromes. *J Immunol* **137**: 3802–3808
- REINER DJ, WEINSHENKER D, THOMAS, JH (1995). Genes regulating muscle activation (Mac). *Worm Breeders Gazette* **13**: 30
- REIZER J, REIZER A, SAIER MH JR (1992). A new subfamily of bacterial ABC-type transport systems catalyzing export of drugs and carbohydrates. *Protein Sci* **1**: 1326–1332
- RICHARDSON A AND PARSONS JT (1995). Signal transduction through integrins: a central role for focal adhesion kinase? *Bioessays* **17**: 229–236
- ROY N, DEVEREAUX QL, TAKAHASHI R, SALVESEN GS, REED JC (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* **16**: 6914–6925
- RUBIN GM (2001). Comparing species. *Nature* **409**: 820–821
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463–5467
- SCHIESTL, RH AND GIETZ, R (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as carrier. *Curr Genet* **16**: 339–346
- SCOTT JH, SCHEKMAN R (1980). Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J Bacteriol* **142**: 414–423
- SHENG M AND KIM E (2000). The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci* **113**: 1851–1856
- SHIRATSUCHI T, NISHIMORI H, ICHISE H, NAKAMURA Y, TOKINO T (1997). Cloning and characterization of BAI2 and BAI3, novel genes homologous to brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). *Cytogenet Cell Genet* **79**: 103–108
- SMITH DB AND JOHNSON KS (1988). Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase *Gene* **67**: 31–40
- SMITH RF, WIESE BA, WOJZYNSKI MK, DAVISON DB, WORLEY KC (1996). BCM Search Launcher—An Integrated Interface to Molecular Biology Data Base Search and Analysis Services Available on the World Wide Web. *Genome Res* **6**: 454–462.
- STRYER L (1988). Muscle contraction and cell motility. In „*Biochemistry*“ Freeman and Company. *New York* 922-923
- SUDOL M (1998). From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the ‚protein recognition code‘. *Oncogene* **17**:1469–1474
- SULSTON JE, HORVITZ HR (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *C. elegans*. *Dev Biol* **56**: 110–156
- SUREAU A, SORET J, GUYON C, GAILLARD C, DUMON S, KELLER M, CRISANTI P, PERBAL B (1997). Characterization of multiple alternative RNAs resulting from antisense transcription of the PR264/SC35 splicing factor gene. *Nucleic Acids Res* **25**: 4513–4522

SUREAU A, SORET J, GUYOR C, GAILLARD C, DUMON S, KELLER M, CHRISTI P, PERBAL B (1997). Characterization of multiple alternative RNAs resulting from antisense transcription of the PR264/SC35 splicing factor gene. *Nucleic Acids Res* **22**: 4513-4522

TAKETO A (1988). DNA transfection of Escherichia coli by electroporation. *Biochim Biophys Acta* **949**: 318-324

TANAKA S, HATTORI S, KURATA T, NAGASHIMA K, FUKUI Y, NAKAMURA S, MATSUDA M (1993). Both the SH2 and SH3 domains of human CRK protein are required for neuronal differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **13**: 4409-4415

TASHIRO H, BLAZES MS, WU R, CHO KR, BOSE S, WANG SI, LI J, PARSONS R, ELLENSON LH (1997). Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* **57**: 3935-3940

TEHRANI MH, BARNES EM JR (1991). Agonist-dependent internalization of gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepinereceptors in chick cortical neurons. *J Neurochem* **57**: 1307-1312

THOMPSON JD, HIGGINS DG, GIBSON TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680

TOSELLO-TRAMPONT AC, BRUGNERA E, RAVICHANDRAN KS (2001). Evidence for a conserved role for CrkII and Rac in engulfment of apoptotic cells. *J Biol Chem* [epub ahead of print]

TRENT C, TSUNG N, HORVITZ RH (1983). Egg-laying defective mutants of the nematode *C. elegans*. *Genetics* **104**: 619-647

TU JC, XIAO B, NAISBITT S, YUAN JP, PETRALIA RS, BRAKEMAN P, DOAN A, AAKALU VK, LANAHAN AA, SHENG M, WORLEY PF (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* **23**: 583-592

TU Y, KUCIK DF, WU C (2001). Identification and kinetic analysis of the interaction between Nck-2 and DOCK180. *FEBS Lett* **491**: 193-199

UENO K (2000). Involvement of fatty acid synthase in axonal development in mouse embryos. *Genes Cells* **5**: 859-869

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

WARD S, THOMSON N, WHITE JG, BRENNER S (1975). Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *C. elegans*. *J Comp Neurol* **160**: 313-337

WATERSTON RH (1988). Muscle. In „The Nematode *C. elegans*". W. Wood and the community of *C. elegans* researchers, editors. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor, New York* 281-335

WATTON SJ, DOWNWARD J (1999). Akt/PKB localisation and 3' phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. *Curr Biol* **9**: 433-436

WEED SA, DU Y, PARSONS JT (1998). Translocation of cortactin to the cell periphery is mediated by the small GTPase Rac1. *J Cell Sci* **111**: 2433-2443

WHANG YE, WU X, SUZUKI H, REITER RE, TRAN C, VESSELLA RL, SAID JW, ISAACS WB, SAWYERS CL (1998). Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5246–5250

WHITE J, SOUTHGATE, E, THOMSON N, BRENNER S (1986). The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. London (Biol)* **314**: 1–340

WU H, PARSONS JT (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *J Cell Biol* **120**: 1417–1426

WU X, HEPNER K, CASTELINO-PRABHU S, DO D, KAYE MB, YUAN XJ, WOOD J, ROSS C, SAWYERS CL, WHANG YE (2000). Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4233–4238

WU X, SENECHAL K, NESHAT MS, WHANG YE, SAWYERS CL (1998). The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15587–15591

WU Y, DOWBENKO D, SPENCER S, LAURA R, LEE J, GU Q, LASKY LA (2000). Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J Biol Chem* **275**: 21477–21485

YANO K, ZARAIN-HERZBERG A (1994). Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *Mol Cell Biochem* **135**: 61–70

YAO I, HATA Y, HIRAO K, DEGUCHI M, IDE N, TAKEUCHI M, TAKAI Y (1999). Synamon, a novel neuronal protein interacting with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein. *J Biol Chem* **274**: 27463–27466

ZHANG L, KELLEY J, SCHMEISSER G, KOBAYASHI YM, JONES LR (1997). Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **272**: 23389–23397

ZITZER H, HONCK HH, BACHNER D, RICHTER D, KREIENKAMP HJ (1999). Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J Biol Chem* **274**: 32997–33001

ZITZER H, RICHTER D, KREIENKAMP HJ (1999). Agonist-dependent interaction of the rat somatostatin receptor subtype 2 with cortactin-binding protein 1. *J Biol Chem* **274**: 18153–18156

8 Anhang

8.1 hMunc-93

mögliche CAAT-Box mögliche TATA-Box

aatctagacagaaatggctgacttcacagaactttgaaacaatctgcagacatcaagttttacttataa 70
 ttgaataaaaaataatTTTTCTTGCTTATTAGCTATGACATTTGTGGTAAGTTGCTTAAAGCTCCGACTT 140
 accccgtctaatacagttgtctctagccacatgtgggttaaattttaattgtaattaactaaaaggagatg 210
 cagttgtgaactcattttatcagttgcacttgccacatttcagaactcaatagtcacatgtggcgagtgg 280
 ctaccatactggacaacactgccccagaccaaaataccaaatcatttaacttttctgaagctgtttcctg 350
 tcttataatgggtctaagattttctaagtatcattagcatagcactattgttggttaacatgaaataatgca 420
 tgaaattccttgcatattgtaaagtactatactcatgtaagttgttttttctttaataattgtctgact 490
 gtgtgtgaaactgtacagctcttgcaactaagactttggcccaggatcttacaatcacgttagctc 560
 ttttcagaagttgaactatgtgtcctggaagtgcattttagccttggcttctttaagactgaagtcctca 630
 ttctgcaccactgacaacttctgacagtttctcttactgtggaaggttctattctatatacacataaaaa 700
 gtgaaacatatcactttaccatctggaccatgtctattagaatttaataggaaaaagcgcaattaacta 770
 gaagctggtaagagtaatgatctttgccccatacaaagtggacattgtggatcacagagaaggtaaag 840
 agtaacagagctcccgtatgcttcatggggcagtgataaccaagttcattaacgagtgacagtcttaat 910
 gactaacacacctctaacatttcacctctagctcagatgagagagagaatgggacttcttggtagtatt 980

gtttttcccatgacctcaattgggtttcttttagggagctacaaatttacgtgttccactggtgattgatctt 1050

EST IMAGE415697

MunI Munc-93 (2) FW
Munc-93 FW XbaI

ttcatccagcacaatggacagaatggacagaagtctaaggaaacgtccttctggtttcccttgggttcctg 1120
 M D R S L R N V L V V S F G F L 16

cttctctttacagcctatggaggtctgcagagcctgcagagcagcctgtacagcgaggagggcctgggtg 1190
 L L F T A Y G G L Q S L Q S S L Y S E E G L G 39

SphI

tcacagcgtcagcaccctctatggagcctatgctcctgtcctccatgttccctcccaccgctcctcatcga 1260
 V T A L S T L Y G G M L L S S M F L P P L L I E 63

gaggctgggctgcaaggggaccatcatcctctccatgtgtggctacgtggccttctccgtgggcaacttc 1330
 R L G C K G T I I L S M C G Y V A F S V G N F 86

EST IMAGE415697

366N23 FW (34387-34405) AvaI

ttcgcagctggtacactttgatccccacctccatactgctgggactcggggccgccccgctgtggtctg 1400
 F A S W Y T L I P T S I L L G L G A A P L W S 109

cacagtgacatacctcacgatcacgggaaacacacatgcagagaagggcggaaagcgtggcaaagacat 1470
 A Q C T Y L T I T G N T H A E K A G K R G K D M 133

ggtgaaccagtatTTTTGGCATCTTCTTCTCATATTCCAGTCATCCGGTGTGTGGGGCAACTTGATCTCA 1540
 V N Q Y F G I F F L I F Q S S G V W G N L I S 156

Munc93 G178N A179S XkoI (RV)

tcgctggtattttggccagactcccagccaagagacccttcagaagagcagctcacgtcctgtggggcca 1610
 S L V F G Q T P S Q E T L P E E Q L T S C G A 179

Munc93 A179S XhoI (FW)

gtgactgcctgatggccaccacaaccaccaacagcaccagagggcctcccagcagctggtctacaccct 1680
 S D C L M A T T T T N S T Q R P S Q Q L V Y T L 203

cctgggcatctacactgggagtggtgtcctggctgtcctgatgatagctgcgttccctccaaccatacga 1750
 L G I Y T G S G V L A V L M I A A F L O P I R 226

Sall HincII

gatgttcagcgggaaagtgaaggagagaagaatcagtacctttctggtccactttactgtcagctttca 1820
 D V Q R E S E G E K K S V P F W S T L L S T F 249

agctataatagagataaacgtctgtgcctcttaattctgctgccgctgtacagtgattgcagcaaggatt 1890
 K L Y R D K R L C L L I L L P L Y S G L Q Q G F 273

cctctccagcgaatacacaaaggtcctatgtcacctgcaccctgggcatccagttcgtcggctacgtgatg 1960
 L S S E Y T R S Y V T C T L G I Q F V G Y V M 296

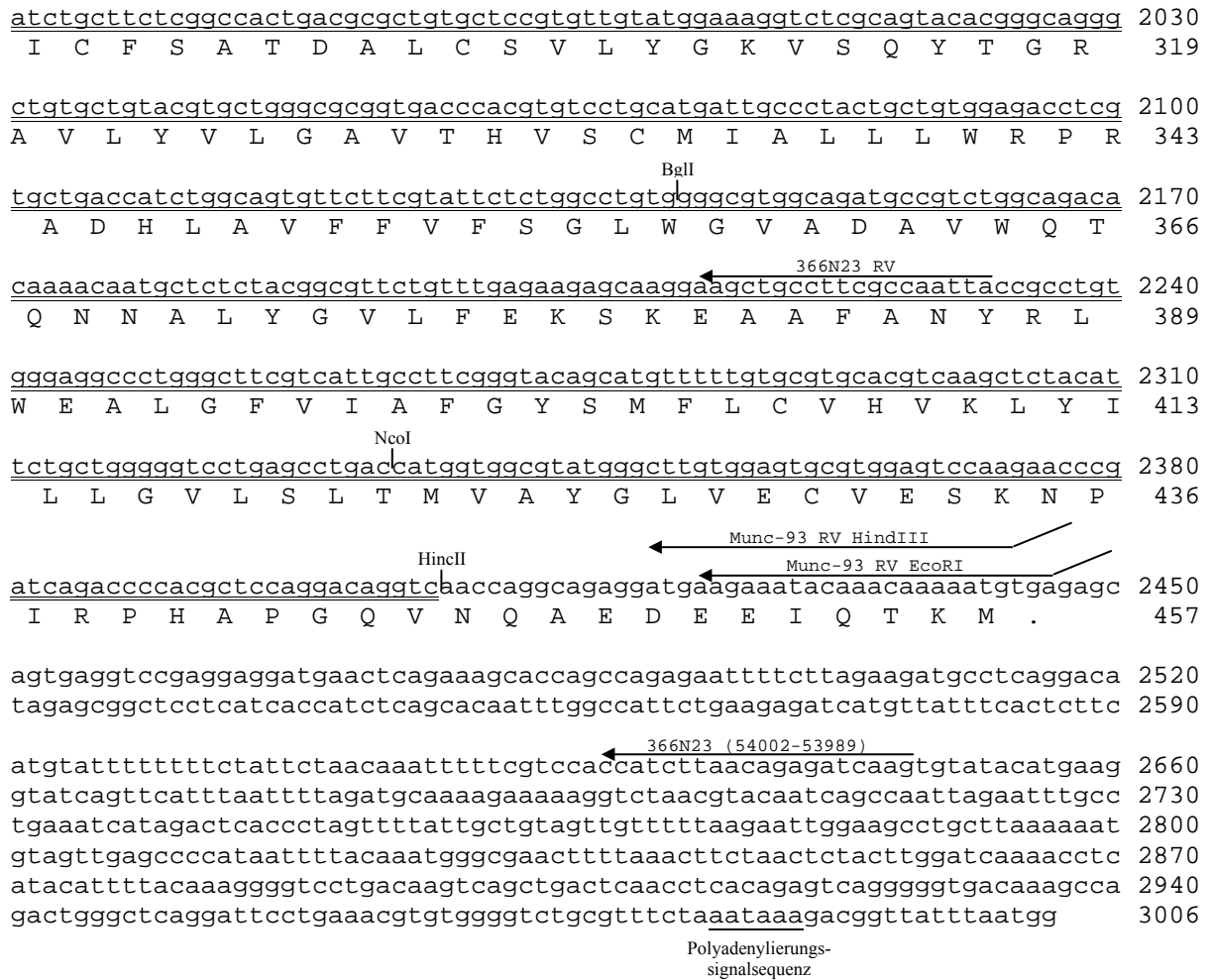
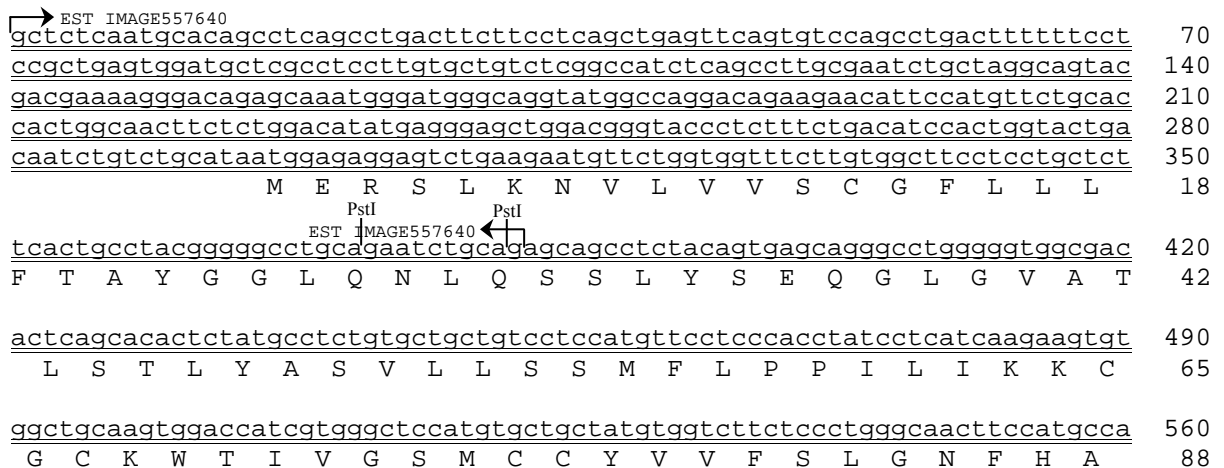


Abb. 26: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von hMunc-93. Gezeigt sind die gesamte Sequenz des ESTs IMAGE 415697, sowie ein Teil des weiter stromaufwärts gelegenen chromosomalen Abschnitts. Der bisher vom EST bekannte Bereich ist durch Pfeile markiert. Alle in dieser Arbeit für Sequenzreaktionen oder PCRs verwendeten Oligonukleotide sind ebenfalls eingezeichnet. Die zur Herstellung der Sonden für die Northernblotanalyse eingesetzten DNA-Fragmente sind doppelt unterstrichen.

8.2 mMunc-93



actggtacaccctgatccctacctccatcttgctgggctgggtgctggccctctgtggtcggctcaggg 630
N W Y T L I P T S I L L G L G A A P L W S A Q G 112

NcoI

tacctacctcaccacbatgggaaatctgcaagcggaaaagggtggggaagcttggcaaatggtggaac 700
T Y L T T M G N L Q A E K V G K L G K D V V N 135

cagtattttggcatctttttcctggtattccaatcttctggagtggtgggcaacctgatttcctcactgg 770
Q Y F G I F F L V F Q S S G V W G N L I S S L 158

tgttcggcaagatgtccatgcaagaagccatcccagaggaacagctcatgtcctgtggagccaaagactg 840
V F G K M S M Q E A I P E E Q L M S C G A K D C 182

cctgatgggtccagcggccaccaacagtaactcatcacccctcacagcagctgatctacacactgctgggc 910
L M G P A A T N S T H H P S Q Q L I Y T L L G 205

mMunc-93 FW (225-231)

atctacaccggctgtggtgctcctggccatcctgctggtagctgtgtttctggagctccttgggaagataagc 980
I Y T G C G V L A I L L V A V F L E S L E D K 228

ttgagaatgaaggagagagggagggccagaccaccacctctttgggtccacattactgtcaaccttcatgct 1050
L E N E G E R R P R P P P L W S T L L S T F M L 252

gttttagagacaagcgtttgtgtctcctgatgttcctgcccactgtacagtgggtttcaacaagagttcctc 1120
F R D K R L C L L M F L P L Y S G F Q Q E F L 275

mMunc-93 RV (284-278)

tctggagagtacacaaagtcttatgtgacctgtgccctgggtatccactttgtgggctacgtgatgatct 1190
S G E Y T K S Y V T C A L G I H F V G Y V M I 298

BglII

gcttctcagccatgactgcactgtgctcctgctgtatgggaatgatctccaagtacacgggcagggcgcc 1260
C F S A M T A L C S L L Y G K I S K Y T G R A A 322

gctctatgcactgggagcagccattcacttctcttgccattgtggtcttctcctgctgtggcaccacaaacacc 1330
L Y A L G A A I H F S C I V V F L L W H P N T 345

mMunc-93 FW (345-350)

aaccaactgctctcttctcgtcctctctggcctgtggggaatgtctgacgctgtctggcagacacaga 1400
N Q L P V F F V L S G L W G M S D A V W Q T Q 368

mMunc-93 RV (392-387)

acaatgctcttttcgggtgtcctggttgaggagaacaaagaacctgcttttgccaactaccgcttggaga 1470
N N A L F G V L F E E N K E P A F A N Y R L G E 392

agccatagggtttgtcattgcttttggttacagctcatttctgtgtgtgagtaccaagctctacatcctc 1540
A I G F V I A F G Y S S F L C V S T K L Y I L 415

NcoI

mMunc-93 FW (431-436)

ttgggtgctttagctctggccatgggttggttacgggacagttgagtacctggaagtcaaggctgcttcca 1610
L G V L S L A M V G Y G T V E Y L E V K A A S 438

mMunc-93 RV (459-453)

aggtccttgggtgcagaaaagaaaaaccaggcagaagaggaaatgaaaacaaaaatataaatgtggac 1680
K V L G A E K K N Q A E E E E M K T K I . 458

aagtgatggctgagaaccagcctgggtcagcagaggcgggtccacgtagcagcgtcaggcgatagactc 1750
gacctccacaactgtttcgtcaatatgtggacatttctaaagatcatctatagtttttttttctctgtat 1820
tttctcgtatttaacaaatttctagttttctactcatggagatcaaaggatgcaaagggctgtcatt 1890
atagtcagtgctattgtgcatccttagcaaacacaaggccacacgatcagcccacaaaggaagccgtag 1960
ctaggtactaggggtggaggaagtggctctgtcattaaagcatttctaggctgagcacgaggaccccagt 2030
ttgaacctcaacctggttttttgtgttttctgttttgttttgttttgttttgttttgttttgt 2100
tttgttttgttttgttttgttttgtttttaaatacagggaaaggtaatgtgcatgtataattcctgt 2170
actggggaggcagaggcagaggcagaaaagatccgtggagccattggctagtagccaggagggccaggacc 2240

BglII

atgagctccgggttcagtcctcagatcttgggtcccaagaactaagggttagtagcaaccaaggacacataa 2310
tgtctacctcctcacagacacacacacacacacacacacacacacacaccactacacatggaagtatc 2380
tactaatttaattggtaaatatgaatgcaatctcaaaaatttccagaatatgtttaccttagctttttgtt 2450
gtgcttaataattggaagaacctcatattataaaaatataaacaccataattgtacaaatgggtgaatac 2520
ctaatacacaaaattttacaaacgggtacaggaagtcacctgaacaaagacactgggcagttttgggcct 2590
cttaaaagttcccgggggattttctaaataaaacagtgaattgttttatgg 2641

Abb. 27: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von mMunc-93. Gezeigt ist die gesamte Sequenz des ESTs IMAGE 557640. Der bisher vom EST bekannte Bereich (Zugangsnummer: AA104857) ist durch Pfeile markiert. Alle in dieser Arbeit für PCRs verwendeten Oligonukleotide sind ebenfalls eingezeichnet. Gekennzeichnete Restriktionsschnittstellen wurden zur Subklonierung von DNA-Fragmenten für die Sequenzierung des Gens genutzt oder zur Isolierung des doppelt unterstrichenen DNA-Fragmentes, das zur Herstellung der Sonde für die Northernblotanalyse eingesetzt wurde.

8.3 hMunc-93B

```

ccacgcgtccgctccggggcgaccgccgcgagtcgagtagttcggggccatggaggcggagccgccgct 70
                                     M E A E P P L 7
ctaccgatggcgggggctgcggggcccagggcgacgaggacctgctcggggctcccggacgggcccag 140
  Y P M A G A A G P Q G D E D L L G V P D G P E 30
gccccgctggacgagctggtggggcgctaccccaactacaacgaggaggaggagcgcgctactacc 210
  A P L D E L V G A Y P N Y N E E E E E R R Y Y 53
gccgcaagcgcctggggcgctcaagaacgtgctggctgccagcgccgggggcatgctcacctacggcgt 280
R R K R L G V L K N V L A A S A G G M L T Y G V 77
                                     PaeI
ctacctgggctcctgcacgatgcagctgatcctgcactacgacgagacctaccgcgaggtgaagtatggc 350
  Y L G L L Q M Q L I L H Y D E T Y R E V K Y G 100
                                     PstI
aacatggggctgcccgcacatcgacagcaaaaatgctgatgggcatcaacgtgactcccatcgccgcctg 420
  N M G L P D I D S K M L M G I N V T P I A A L 123
tctacacacctgtgctcatcaggttttttggaaacgaagtggatgatgttcctcgctgtgggcatctacgc 490
L Y T P V L I R F F G T K W M M F L A V G I Y A 147
cctctttgtctccaccaactactgggagcgctactacacgcttgtgccctcggctgtggccctgggcatg 560
  L F V S T N Y W E R Y Y T L V P S A V A L G M 170
gccatcgctcctctttgggcttccatgggcaactacatcaccaggatggcgcgagaagtaccatgagctact 630
  A I V P L W A S M G N Y I T R M A Q K Y H E Y 193
cccactacaaggagcaggatgggcaggggatgaagcagcggcctccgcggggctcccacgcgccctatct 700
S H Y K E Q D G Q G M K Q R P P R G S H A P Y L 227
cctggctcttccaagccatcttctacagcttcttccatctgagcttcgctgcgccagctgccatgatt 770
  L V F Q A I F Y S F F H L S F A C A Q L P M I 250
tatttctgaaccactacctgatgacctgaaccacacgctgtacaatgtgcagagctgcccacccaaca 840
  Y F L N H Y L Y D L N H T L Y N V Q S C G T N 273
                                     BamHI
gccacgggatcctcagcggcttcaacaagacggttctgcggacgctcccgcggagcggaaacctcattgt 910
S H G I L S G F N K T V L R T L P R S G N L I V 297
                                     EST IMAGE2791017
ggtagagagcgtgctcatggcagtgcccttctggccatgctgctggtgctgggtttgtgcggagccgct 980
  V E S V L M A V A F L A M L L V L G L C G A A 320
taccggccccacggaggagatcgatctgcgcagcgtgggctggggcaacatcttccagctgcccttcaagc 1050
  Y R P T E E I D L R S V G W G N I F Q L P F K 343
                                     Eco72I
adgtgcgtgactaccgcctgcgccacctcgtgcctttctttatctacagcggcttcgaggtgctctttgc 1120
H V R D Y R L R H L V P F F I Y S G F E V L F A 367
ctgcactggatcgcccttgggctatggcgtgtgctcgggtggggctggagcggctggcttacctcctcgtg 1190
  C T G I A L G Y G V C S V G L E R L A Y L L V 390

```

```

gcttacagcctgggcgccctcagccgctcactcctgggctgctgggctgtggctgccacgcccgggtgc 1260
A Y S L G A S A A S L L G L L G L W L P R P V 413

ccctgggtggctggagcaggggtgcacctgctgctcaccttcatcctctttttctgggcccctgtgectcg 1330
P L V A G A G V H L L L T F I L F F W A P V P R 437

          BamHI
ggctcctgcaacacagctggatcctctatgtggcagctgccctttggggtgtgggcagtgcctgaacaag 1400
V L Q H S W I L Y V A A A L W G V G S A L N K 460

actggactcagcacactcctgggaatcttgtacgaagacaaggagagacaggacttcatcttcaccatct 1470
T G L S T L L G I L Y E D K E R Q D F I F T I 483

accactgggtggcagggctgtggccatcttcaccgtgtacctgggctcgagcctgcacatgaaggctaagct 1540
Y H W W Q A V A I F T V Y L G S S L H M K A K L 507
EST IMAGE2791017 ←

CDAAP0025
ggcgggtgctgctgggtgacgctgggtggcggccgcggtctcctacctgcgatggagcagaagctgcggcgg 1610
A V L L V T L V A A A V S Y L R M E Q K L R R 530

ggcgtggccccgcgcccagccccgcatccccgcggccccagcacaaggtgcgcggttaccgctacttggagg 1680
G V A P R Q P R I P R P Q H K V R G Y R Y L E 553

aggacaactcggacgagagcgcacgcggagggcgagcatggggacggcgcggaggaggaggcgccgcccgc 1750
E D N S D E S D A E G E H G D G A E E E A P P A 577

agggcccaggcctggccccgagcccgctggactcggccgcccggccctgcccgtacgaacaggcgcagggg 1820
G P R P G P E P A G L G R R P C P Y E Q A Q G 610

ggagacggggccggaggagcagtgaggggcccgcctggtccccggactcagcctccctcctcgccggcctca 1910
G D G P E E Q . 617

gtttaccacgtctgaggtcggggggacccccctccgagtcctcgcgctgtcttcaaaggccccctgtctccc 1980
tccccgacgttggggacgcccctccagagcccaggtcacctccgggcttccgcagccccctccaaggcg 2050
gagtggagccttgggaaccctcggccaagcacaggggttcgaaaatacagctgaaacccccgcccgcct 2120
tagcacgcgccccagcgcggagcacggtcagggctcttcttgcgaccggcccgtccagatccccacag 2190
ctctcggccgcggacccgggcccgcgtgtgagcgcactttgcacctcctatccccaggggtccgcccagagc 2260

CDAAP0025 ←
cacgatttttttacagaaaatgagcaataaaagagattttgtactgtc 2330
Polyadenylierungs-
signalsequenz

```

Abb. 28: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von hMunc-93B. Gezeigt ist die gesamte Sequenz des ESTs IMAGE 2791017 sowie ein stromabwärts gelegener Abschnitt des Klonen CDAAP0025. Der bisher vom EST bekannte Bereich (Zugangsnummer: AW516192) sowie die Sequenz von CDAAP0025 sind durch Pfeile markiert. Gekennzeichnete Restriktionsschnittstellen wurden zur Subklonierung von DNA-Fragmenten für die Sequenzierung des Gens genutzt oder zur Isolierung des doppelt unterstrichenen DNA-Fragmentes, das zur Herstellung der Sonde für die Northernblotanalyse diente.

8.4 mMunc-93B Teilsequenz

```

agagccaaggcattctgaatggcttcaacaagacgggtccttcggacgctgccgcgcaaaaaaccttat 70
S Q G I L N G F N K T V L R T L P R S K N L I 23

tgttgtagagagcgtgctcatggcgggtggccttcttggccatgctgatgggtgctgggcccctgtgtggagcc 140
V V E S V L M A V A F L A M L M V L G L C G A 46
          bisher
          unbekannt ← ACC36530
gcttaccggcccacggaagagatcgacctgcgcagcgtgggatggcgcagcatcttccagctgcccttca 210
A Y R P T E E I D L R S V G W R S I F Q L P F 69

```

<u>aacacgctgcgtgactcacgattacgccatctggcgcccttcccttatctacagtggtctttgaggtgctctt</u>	280
K H V R D S R L R H L V P F L I Y S G F E V L F	93
<u>tgcttgcactgggttttgccttgggctacggcgtgtgctccatggggctggagcgactggcatacctgctc</u>	350
A C T G F A L G Y G V C S M G L E R L A Y L L	116
acagcttacagcctgggtgcctcagcctcctcggttctggggctgctgggactgtggctgcctcactctg	420
T A Y S L G A S A S S V L G L L G L W L P H S	139
ccccgctcgtggctggggcaggactgcacactactgctcacccttagcctctttttctgggctcctgctcc	490
A P L V A G A G L H L L L T L S L F F W A P A P	163
tcgggtcctccagcaca ^{ACC36530} agttggatc	515
R V L Q H S W I	171

Abb. 29: Ausschnitt aus der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von mMunc-93B. Die bisher bekannte Sequenz (Zugangsnummer: ACC36530) ist durch Pfeile markiert und ebenso der neu identifizierte Abschnitt. Alle in dieser Arbeit für PCRs verwendeten Oligonukleotide sind ebenfalls eingezeichnet. Das doppelt unterstrichene DNA-Fragment wurde zur Herstellung der Sonde für die Northernblotanalyse eingesetzt.

8.5 GH10120

cggccagcgatcaacggttggccaccacagcagcactcgagagcgataacgagcagctgattttgctga	70
tttttagctgatttcggctgatttttgccattatccattttatctggcaccgcaacggcagcagcaacaac	140
aactgcaacaactacaacaacagcaacaaggccatcgcatctctctctctctctctcccccgcaacaaca	210
acaattataataacgatctgtgacaagacaacaacaacaacaacaacaacagcgataaataatcaaga	280
aaaaagtgaagtgaactctcgggcgtctctcgctctcgctttcggccaacttcggcttttttcgggctt	350
cgcttcgggctccggcttgtaaaactctgcaaaagttaatttttagtctcggcttttaataaccgtttttagtg	420
cgttttcaagttggctcgtgtgctattccctctctctgaaaatttgataaaagaacaaatttcaatttcg	490
aaaataaattacaattcgaaaataatccaataacgctataaataaataaaagctaaagcacatatgtgact	560
ttttttggtgaccacgcacatccttgtgacattttttttttgccgatcaattttttcgcccaacggaaatgta	630
aaccattcgcccccaaaaagcccccttaagcttctgcttcaaagtccagaacaaaaagagcaacaaa	700
atccattcaattgcataacatttaattgccaaaaaaacaaacaaaaaattataaaaaataaataaaata	770
aaagcaataatatcataattcaggagttcaaaaacgcgctcaccaatacgaaggcgatcgattaaaaga	840
cggaagtgcattttttttcgtaagcggcaaaagcagcgcacctgtttttttgggcttccaacacgctc	910
acgcacacacacgcaccccgaacacaagcccacacactcacacacacacacacaggcagtgaggactg	980
gaagtcgctctctcgtttaagagttgcagatccacaaataacgcccactttttcccttggttaattgatt	1050
aaccagggcccaataaatacctcaaaaagggagcggacaacacaaaagcagcaagatgactggtttcacgaa	1120
M T G F T N	6
cgccggtttcgagaacgatgagcccgctcaagccaaaagctggtttcgagcccgataaccgctcgtcgcga	1190
A G F E N D E P V K P K A G F E P D T A S L R	29
gagaaagttgtgctgaatccgggcgagaaatggcgcacatcttaagaataatctcgatcatctcgatcgctt	1260
E K V V L N P G E K W R I L K N I S I I S I A	52
tcatgggtgcagtttacagcgtttcagggcacggccaatctgcaatcctctataaacgcaaaggatggcct	1330
F M V Q F T A F Q G T A N L Q S S I N A K D G L	76
gggcacagtgctcgcttagtgcgatctacgccgccttgggtggtctcctgcaccttctgcccactctgatc	1400
G T V S L S A I Y A A L V V S C I F L P T L I	99
attagaaactaacgggtcaaatggacattggtgtgcagcatgctctgctacgcaccatacatcgattcc	1470
I R K L T V K W T L V C S M L C Y A P Y I A F	122
agctcttccccgcgattctatacgttggtggcccgccggtatccttggggatggggcggcgacccatggtg	1540
Q L F P R F Y T L V P A G I L V G M G A A P M W	146

ggcgtccaaggccacctatTTgacgcaggttggacaggtgtatgccaagatcacggaacaggcgggtggat 1610
A S K A T Y L T Q V G Q V Y A K I T E Q A V D 169

gccattatagtgcgattcTTTggcttcttcttctggcctggcaatccgctgagctctggggcaatctca 1680
A I I V R F F G F F F L A W Q S A E L W G N L 192

tctccagtttggtcctctccagcggcgctcatggcgggtggcagcagctcgaacacgacggtcagcgagga 1750
I S S L V L S S G A H G G G S S S N T T V S E E 216

ggatttgcagttctgcgggtgccaacttctgcaccaccggaagcggcggccatggcaacctggagcgtccg 1820
D L Q F C G A N F C T T G S G G H G N L E R P 239

ccagaggatgagatcttctcgagatctcgatgatctatctgtcctgcattgtggccgctctgcatcatcg 1890
P E D E I F E I S M I Y L S C I V A A V C I I 262

ccttcttcttggatcccctcaagcgggtatgggtgagaagcgcgaagggctccaattctgccgccgagttgtc 1960
A F F L D P L K R Y G E K R K G S N S A A E L S 286

cggactgcagctgctgtccgccaccttccgccagatgaagaaaccgaatctgcagctcctcatccctatc 2030
G L Q L L S A T F R Q M K K P N L Q L L I P I 309

accgttttcattggcatggagcaggctttcatcggtgccgatttcaactcaggcctatgtggcctgcgcc 2100
T V F I G M E Q A F I G A D F T Q A Y V A C A 332

tgggagtgaacaagattggcttctgcatgatctgtttcgggtgtggatgcctctgctcgatcctctt 2171
L G V N K I G F V M I C F G V V N A L C S I L F 356

cggatcggtaatgaagtatatcggccgcacgcccacatcattgtactgggcgctcgtccacttcaccctg 2241
G S V M K Y I G R T P I I V L G A V V H F T L 379

atcacggttgagctcttctggcgccccaatcccgataatcccacatcttctatgccatgtccggcctgt 2310
I T V E L F W R P N P D N P I I F Y A M S G L 402

ggggcgtcggcgatgccgtgtggcagaccagatcaacggactgtacggactgctgttccgcaggaacaa 2380
W G V G D A V W Q T Q I N G L Y G L L F R R N K 426

ggaggctgccttctccaactaccgcctatgggagtccgccgattcgttattgcctacgcctatgccaca 2450
E A A F S N Y R L W E S A G F V I A Y A Y A T 449

acactctgcacgcagatgaagctctacattctgctggctgtactcacgctcggctgcatcggctacgtga 2520
T L C T Q M K L Y I L L A V L T L G C I G Y V 472

ttgtggagatcctgtacaggaagaagcaacgcaagctcaagaagcaggagaagctggaggccgcggagaa 2590
I V E I L Y R K K Q R K L K K Q E K L E A A E K 496

ggagaaggaggccgcccgcggcggcagccgcccggcttggccgcccggaggcaggagcagatggcgtc 2660
E K E A A A A A A A A L A A A E A G A D G V 519

gaggagaccgacgacgagctggacgatctcgaggaggacattgtggtcacgcgctgtaaattgtttttt 2730
E E T D D E L D D L E E D I V V T R L . 538

ctcacccaaggacacccccaaaaacaaaaacatttacaggcgcgtgaccacaatgtcctc 2790

Abb. 30: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von GH10120. Die Sequenz ist in der NCBI Datenbank unter der Zugangsnummer AAD38632 zu finden.

8.6 GH09628

→ EST GH09628 5'
 gttcacttcaatccgatcagctctaacggacacctgtttctaaaagccattcaaatttccttttttgggc 70
 tgtcaagattgtaaagaaatattcaattcagggctgctgacctgaccccgaaactggacatggtttac 140
 M V Y 3

 ccagtgacacgtcggacgccaacaacgaggagctggcgctggagcacagtgttgacatggcaatgtcc 210
 P S D T S D A N N E E L A L E H S V A H G N V 26

 acggtaacggcactggcactgggtggtagctcacccgggacaacaactgctccgaacggggacaacaagt 280
 H G N G T G T G G S S P G T T T A P N G D N K V 50

 caatcagcgcattacgagccggccgagcgttcatcatcaccaagaacgtggctgctgataggcctggct 350
 N Q R H Y E P A E R F I I T K N V V V I G L A 73

 ttcattgattcacttcacggccttccacggcacatcgaatctgcagagctcggatgaacgcggataaggccc 420
 F M I H F T A F H G T S N L Q S S V N A D K A 96

 tgggcaccaccacgcttgccgtcatctacggctcgtgataactgtccaacatcttctgcccgatgacctg 490
 L G T T T L A V I Y G S L I L S N I F L P M T V 120

 gataagatggttcggttgccggttgaccatggcgctggccctcttcgcctacatgcctacatagccgcc 560
 I R W F G C R L T M A L A L F A Y M P Y I A A 143

 cagttttaccacggttcgagaccctaatcccggcgccctgatgggtgggtttcgggtggcggccattgt 630
 Q F Y P R F E T L I P A A L M V G F G G G P L 166

 ← EST GH09628 5'
 ggtgctccaagtgcacctacctatccaccgtctccgaggcacttaccaggtgccccgaacaagtgcg 700
 W C S K C T Y L S T V S E A L T Q V R G N K S R 190

 taaggatgtgaacaccgtcaagttcttcggcctgttcttcatcttctaccagatggcccaggtgtggggc 770
 K D V N T V K F F G L F F I F Y Q M A Q V W G 213

 aacctcatatcctcctcggtttctaaccctgagtgcccctgctgcccattccgcggaatgattctttcg 840
 N L I S S S V L T L S A P A A Q S A A N D S F 236

 agctggagggtgcagcgggaactggagagaaaacaggggtggccgaactctgccccgctttctgtcccgg 910
 E L E V Q R E L E R N R V A E L C G A R F C P G 260

 agtgggagcagaggccaatccaaacctagtgccccagctccggagcagatccagctgctcaactccatc 980
 V G A E A N P N L V P P A P E Q I Q L L N S I 283

 ttctcactgcatggcagcggcgggtggtcatgatgatcttcggcgtgagctccctcaaacgggatggag 1050
 F L T C M A A A V V M M I F G V S S L K R Y G 306

 taaagcgcggagacactggcgacgggatgtcggggctaaagctcctcacggtgaccataaatcttctgcg 1120
 V K R G D T G D G M S G L K L L T V T I N L L R 330

 caaacgtcgccaaatcctgatgctgcccacacgatgttcatcgggctggaggaggccttctggccgtg 1190
 K R R Q I L M L P I T M F I G L E E A F L A V 353

 gacttccccgcttcgcttggcctgaggatggggatctctagaatcgggttcgcaatgatatgctttg 1260
 D F T R S F V A C G W G I S R I G F A M I C F 376

 → EST GH09628 3'
 gcgtggcgaatgcgggtggctgcccggatcgcaggcgcgctggtggagcgcattggacgggtcactctggc 1330
 G V A N A V A A G I A G A L V E R I G R V T L A 400

 cgcactatgtgccgtgggtcaacctctgtctgctcacctacatgtacacctgggaagcgcgagagggcgac 1400
 A L C A V V N L C L L T Y M Y T W E A R E G D 423

```

tatatgagctactgcacctttgcgcggtttggggcatctgcatggagtctggctggttggtgcaatg 1470
Y M S Y C T F A A V W G I C D G V W L V V V N 446

ctttttatggcattctgtttccgaaccatctgattgccgcttatagcaacttccgctgtgggaaagcac 1540
A F Y G I L F P N H L I A A Y S N F R L W E S T 470

tggttctgttatcggctacgtcatcagttcgcagctttgcacctccacgaaattggtgattttgattatt 1610
G S V I G Y V I S S Q L C T S T K L V I L I I 493

tttatttttagtggggttgcgtgggatatggcctcatcgagtaccgcttttggcagaagcaaaagaacttgg 1680
F I L V G C V G Y G L I E Y R F W Q K Q K N L 516

aagtcagctgagtgactgattagctcttcaaggctaattccatatcttgccattttcatttccgattaa 1750
E V M L S D . 522
tttcagctatccccctaacttattttcgttaaggaataaggatataagaagttatcttatgtgatattg 1820

ccaaatattgtaggaaattcgttgatttcgttactcaataaaaccaagtttgttt 1877
EST GH09628 3' ←

```

Abb. 31: Potentielle Nukleotid- und Aminosäuresequenz von GH09628. Die bisher aus dem EST bekannten am 5' und 3'-Ende liegenden Sequenzen (Zugangsnummern: AI110145 bzw. AI402180) sind durch Pfeile markiert. Die übrige Sequenz wurde durch Analyse der zugehörigen chromosomalen Sequenz mit dem Programm BCM Gene Finder (Smith et al., 1996) ermittelt.

8.7 Fettsäuresynthese

MEEVVIAGMS	GKLPESENLQ	EFWANLIGGV	DMVTDDRRW	KAGLYGLPKR	SGKLDLSKF	60
DASFFGVHPK	QAHTMDPQLR	LLLEVSYEAI	VDGGINPASL	RGTNTGVWVG	VSGSEASEAL	120
SRDPETLLGY	SMVGCQRAMM	ANRLSFFDF	KGPSIALDTA	CSSLLALQN	AYQAIRSGEC	180
PAALVGGINL	LLKPNTSVQF	MKLGMLSPDG	TCRSFDDSGS	GYCRSEAVVA	VLLTKKSLAR	240
RVYATILNAG	TNTDGSKEQG	VTFPSGEVQE	QLICSLYQPA	GLAPESLEYI	EAHGTGTKVG	300
DPQELNGITR	SLCAFRQAPL	LIGSTKSNMG	HPEPASGLAA	LTKVLLSLEH	GVWAPNLHFH	360
NPNPEIPALL	DGRLQVDRP	LPVRGGNVGI	NSFGFGGSNV	HVILQPNTRQ	APAPTAHAAL	420
PHLLHASGRT	LEAVQDLLEQ	GRQHSQDLAF	VSMLNDIAAT	PTAAMPFRGY	TVLGVVEGRVQ	480
EVQQVSTNKR	PLWFICSGMG	TQWRGMGLSL	MRLDSFRESI	LRSDAVKPL	GVKVSLLLLS	540
TEDRTFDDIV	HAFVSLTAIQ	IALIDLTSV	GLKPDGIIGH	SLGEVACGYA	DGCLSQREAV	600
LAAYWRGQCI	KDAHLPPGSM	AAVGLSWEEC	KQRCPAGVVP	ACHNSEDVT	ISGPQAAVNE	660
FVEQLKQEGV	FAKEVRTGGL	AFHSYFMEGI	APTLQALKK	VIREPRRSA	RWLSTSIPEA	720
QWQSSLARTS	SAEYVNNLV	SPVLFQEALW	HIPEHAVVLE	IAPHALLQAV	LKRGVKSSCT	780
IIPLMKRDHK	DNLEFFLTNL	GKVHLTGINV	NPNALFPPVE	FPAPRGTPLI	SPHIKWDHSQ	840
TWDVPAEDF	PNGSSSSSAT	VYSIDASPES	PDHYLVDHCI	DGRVIFPGTG	YLCLVWKTLA	900
RSLGLSLEET	PVVVFENVSFH	QATILPKTGT	VALEVRLLLEA	SHAFEVSDTG	NLIVSGKVYL	960
WEDPNSKLF	HPEVPTPPES	ASVSRLTQGE	VYKELRLRGY	DYGPQFQGIC	EATLEGEQK	1020
LLWKDNWVTF	MDTMLQVSIL	GSSQQSLQLP	TRVTAIYIDP	ATHRQKVYRL	KEDTQVADVT	1080
TSRCLGITVS	GGIHISRLQT	TATSRRQQEQ	LVPTLEKVFV	TPHMEAECLS	ESTALQKELQ	1140
LCKGLARALQ	TKATQQGLKA	AMLGQEDPPQ	HGLPRLAAA	CQLQLNGNLQ	LELGEALAEQ	1200
RLLLPEDPLI	SGLLNSQALK	ACVDTALENL	STLKMVAEV	LAGEGHLYSR	IPALLNTQPM	1260
LQLEYTATDR	HPQALKDVQT	KLQQHDVAQG	QWNPSDPAPS	SLGALDLLVC	NCALATLGDP	1320
ALALDNMVA	LKEGGFLLVH	TVLKGHALGE	TLACLPSEVQ	PAPSLLSQEE	WESLFSRKAL	1380
HLVGLKRSFY	GTALFLCRR	IPQEKPIFLS	VEDTSFQWVD	SLKSTLATSS	SQPVWLTAMD	1440
CPTSGVVGLV	NCLRKEPGGH	RIRCILLSNL	SNTSHAPKLD	PGSPELQQVL	KHDLVMNVYR	1500
DGAWGAFRHF	QLEQDKPKEQ	TAHAFVNVLT	RGDLASIRW	SSPLKHTQPS	SSGALCTVY	1560
YASLNFRDIM	LATGKLSFDA	IPGKWARDC	MLGMEFSGRD	RCGRRVMGLV	PAEGLATSVL	1620
LSSDFLWDVP	SSWTLLEEAS	VPVYTTAYY	SLVVRGRIQR	GETVLIHSGS	GGVGQAASI	1680
ALSLGCRVFT	TVGSAEKRAY	LQARFPQLDD	TSFANSRDT	FEQHVLHHTG	GKGVLDLNS	1740
LAEEKLQASV	RCLAQHGRFL	EIGKFDLSNN	HPLGMAIFLK	NVTFHGILLD	ALFEEANDSW	1800
REVAALLKAG	IRDGVVKPLK	CTVFPKAQVE	DAFRYMAQK	HIGKVLVQVR	EEEPEAVLPG	1860
AQPTLISAIS	KTFCPAHKSY	IITGGLGGFG	LELARWLVL	GAQRLVLT	SGIRTYQAK	1920
HIREWRRQGI	QVLVSTSNVS	SLEGARALIA	EATKLGVPVG	VFNLAMVLRD	AMLENQTP	1980
FQDVNPKPKYN	GTLNLDRA	EACPELDYFV	AFSSVSCGRG	NAGQTNYGFA	NSTMERICEQ	2040
RRHDGLPGLA	VQWGAIGDVG	IVLEAMGTND	TVIGGTLQ	ISSCMEVLDL	FLNQPHAVLS	2100

SFVLAIEKKAV	AHGDGDTQRD	LVKAVAHILG	IRDLAGINLD	STLADLGLDS	LMGVEVRQIL	2160
..... Klon 1						
----- Klon 5 -----						
EREHDLVLPM	REVRQLTLRK	LQEMSSKTDS	ATDTPAPKSR	SDTSLKQNL	NLSTLLVNPE	2220
..... Klon 2						- Klon 1
----- Klon 3 -----						
----- Klon 4 -----						
----- Klon 5 -----						
GPTLTQLNSV	QSSERPLFLV	HPIEGSTTVF	HSLAAKLSVP	TYGLQCTQAA	PLDSIPNLAA	2280
..... Klon 1						
..... Klon 2						
..... Klon 3						
..... Klon 4						
----- Klon 5 ----->						
YYIDCIKQVQ	PEGPYRIAGY	SFGACVAFEM	CSQLQAQQGP	APTHNNLFLF	DGSHTYVLAY	2340
..... Klon 1						
Klon 2 ->	----- Klon 3 -----					
----- Klon 4 -----						
TQSYRAKMP	GCEAEAEAEA	LCFFIKQFLD	VEHSHVLEAL	LPLKSLEDRV	AASVDLITKS	2400
..... Klon 3						
HHS�DRRELS	FAAVSFYHKL	RAADQYKPKA	KYHGNVTLRL	AKTGGTYGED	LGADYNLSQV	2460
CDGKVSVHII	EGDHRTLLEG	SGLESIINII	HSSLAEPRVS	VREG		

Abb. 32: Aminosäuresequenz von Fettsäuresynthase. Fragmente, die im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit mMunc-93 interagieren, sind unterstrichen.

8.8 MAGI3

MSKTLKKKKH	WLSKVQECAV	SWAGPPGDFG	AEIRGGAERG	EFPYLGRLE	EPGGGTCCIV	60
SGKAPNPSDV	LLEVNGTPVS	GLTNRDTLAV	IRHFREPIRL	KTVKPGKVIN	KDLRHYSLSQ	120
FQKGSIDHKL	QQVIRDNLYL	RTIPCTTRAP	RDGEVPGVDY	NFISVEQFKA	LEESGALLES	180
GTYDGNFYGT	PKPPAEPSPF	QPDPVDQVLF	DNEFDAESQR	KRTTSVSKME	RMDSSLPEEE	240
EDEDKGAING	SGNAENRERH	SESSDWMKTV	PSYNQTNSSM	DFRNYMMRDE	TLEPLPKNWE	300
MAYTDTGMIY	FIDHNTKTTT	WLDPRLCCKA	KAPEDCEDGE	LPYGWEKIED	PQYGTYYVDF	360
TLVAQAGVQW	HDLGSLQPPP	PGFNHLNQKT	QFENPVEEAK	RKKQLGQVEI	GSSKPDMEKS	420
HFTRDPSQLK	GVLVRASLKK	STMGFGFTII	GGDRPDEFLO	VKNVLKDGPA	AQDGKIAPGD	480
VIVDINGNCV	FGHTHADVVO	MFQLVPVNQY	VNLTLCRQY	LPDDEDPVV	DIVAATPVIN	540
<u>GQSLTKGETC</u>	<u>MNPQDFKPGA</u>	<u>MVLEQNGKSG</u>	<u>HTSTGDGLNG</u>	<u>PSDASEQRVS</u>	<u>MASSGSSQPE</u>	600
<u>LVTIPLIKGP</u>	<u>KGFGFAIADS</u>	<u>PTGQKVKMIL</u>	<u>DSQWCQGLQK</u>	<u>EDIKEIYHQ</u>	<u>NVQNLTHLQV</u>	660
<u>VEVLKQFPVG</u>	<u>ADVPLLLLRG</u>	<u>GPPSTTKTAK</u>	<u>MKTDKKNAG</u>	<u>SLEAINEPIP</u>	<u>QPMPFPPSII</u>	720
<u>RSGSPKLDPS</u>	<u>EVYLKSKTLY</u>	<u>EDKPPNTKDL</u>	<u>DVFLRKQESG</u>	<u>FGFRVLGGDG</u>	<u>PDQSIYIGAI</u>	780
<u>IPLGAAEKDG</u>	<u>RLRAADELMC</u>	<u>IDGIPVKGKS</u>	<u>HKQVLDLMTT</u>	<u>AARNGHVLLT</u>	<u>VRRKIFYGK</u>	840
<u>QPEDDSSQAF</u>	<u>ISTQNGSPRL</u>	<u>NRAEVPARPA</u>	<u>PQEPYDVVLQ</u>	<u>RKENEGFGFV</u>	<u>ILTSKNKPPP</u>	900
<u>GVIPHKIGRV</u>	<u>IEGSPADRCG</u>	<u>KLKVGDHISA</u>	<u>VNGQSIVELS</u>	<u>HANIVQLIKD</u>	<u>AGVTVTLTVI</u>	960
<u>AEHEHHGPPS</u>	<u>GTNSARQSPA</u>	<u>LQHRPMGQSQ</u>	<u>ANHIPGDRSA</u>	<u>LEGEIGKDV</u>	<u>TSYRHSWSDH</u>	1020
<u>KHLAQPDVAV</u>	<u>ISVVGSRHNQ</u>	<u>NLGCYPVELE</u>	<u>RGPRGFGFSL</u>	<u>GGKEYNMGL</u>	<u>FILRLAEDGP</u>	1080
<u>AIKDGRIVHG</u>	<u>DQIVEINGEP</u>	<u>TQGITHTRAI</u>	<u>ELIQAGGNKV</u>	<u>LLLLRPGTGL</u>	<u>IPDHGLAPSG</u>	1140
LCSYVKPEQH						

Abb. 33: Aminosäuresequenz von MAGI3. Das Fragment, das im Hefe-Zwei-Hybrid-System und bei in vitro-Bindungsstudien mit Munc-93 interagiert, ist unterstrichen.

8.9 BRUCE

MAAAAAEASG	PSCSSAAAAA	GAGAAGVSEW	LVLRDGCMRC	DADGLHSLSY	HPALNAILAV	60
TSRGTIKVID	GTSGATLQAS	ALSAKPGGQV	KCQYISAVDK	VIFVDDYAVG	CRKDLNGILL	120
LDTALQTPVS	KQDDVVQLEL	PVTEAQQLLS	ACIEKIDVSS	TEGYDLFITQ	LKDGLKNISH	180
ETAANHKVAK	WATVTFHLP	HVLKSIASAI	VNELKKINQN	VAALPVASSV	MDRLSYLLPS	240
ARPELGVGPG	RSVDRALMYS	EANRRETFTS	WPHVGYRWAQ	PDPMAQAGFY	HQPASSGDDR	300
AMCFTCSVCL	VCWEPTDEPW	SEHERHSPNC	PFVKGEHTQN	VPLSVTLATS	PAQLPSADGA	360
DRIACFGSGS	CPQFLAAATK	RGKICIWVDS	KLMKVHLKFE	INAYDPAIVQ	QLILSGDPSS	420
GVDSRRPTLA	WLEDSSSCSD	IPKLEGDSDD	LLEDSDSEEH	SRSDSVTGHT	SQKEAMEVSL	480
DITALSILQQ	PEKLQWEIVA	NVLEDTVKDL	EELGANPSLT	NSKSEKTEK	HQEQHNIQFP	540
CLLAGLLTY	KSPATSPISS	NSHRSLDGLS	RTQGESISEQ	GSTDNESCTN	SELNSPLVRR	600
TLPVLLLLYSI	KESDEKAGKI	FSQMNNIMSK	SLHDDGFTVP	QIIEMELDNQ	EQLLLQDPPV	660
TYIQQFADAA	ASLTSPDSEK	WNSVFPKPGT	LVQCLRLPKF	AEEETLCIDS	ITPCADGIHL	720
LVGLRTPCSVE	SLSAINQVEA	LNNLNKLNSA	LCNRRKGDLE	SNLAVVNGAN	ISVIQHESPA	780
DVPEHLLIRP	EQRNVVSGGY	LVLKMNYYT	RIVTLEEEPV	KIQHIKDPQD	TITSLILLPP	840
DILDNREDDC	EPAEEMQLA	SKNGIEREKK	SDISTLGHV	VTTQGGYVKV	LDLSNFEILA	900
KVEPPKKEGT	EEQDTFVSVI	YCSGTDRLCA	CTKGGEHLFL	QIGGTCDDID	EADILVDGSL	960
SKGIEPALEG	SRPLSNPSSP	GISGVELLVD	QPFTEILTS	LVELTRFETL	TPRFSATVPP	1020
CWVEVQQEQQ	QRRHPQHLHQ	QHHGDAAQHT	RTWKLQTDNS	SWDEHVFELV	LPKACMVGHV	1080
DFKFVLSNSI	TSVPQIQVTL	LKNKAPGLGK	ANALNIEVEH	NGNPSLVDLN	EEMHHMDVEE	1140
SQCLRLCPFL	EDHKEDILCG	PVWLASGLDL	SGHAGMLTTL	SPKLVKGMAG	GKYRSFLIHV	1200
KAVSDRGAAD	EMCSSGLRPV	VRLPSLKQQG	HKGYSLASLL	AKVAAGKEKS	SNVKNENAGG	1260
TRKSENLRGC	DLLQEVSVTI	RRFKKTSICK	ERVQRCAMLQ	FSEFHEKLLN	TLCRRSDDGQ	1320
VEHAQSLVL	DALCWLAVGH	SNGSGSSKEG	NECLLSKTRK	CLSDIVRVCF	FEAGRSIAHK	1380
CARFLALCIS	NKCEPCQPG	FGSVLLKALL	DNMCFLPAAA	TGGSVYWFV	LLNYVKDEDL	1440
AGCSTACAAL	LTAVSRQLQD	RLTPLEALLQ	TRYGLYSSPF	DPVLFDLEMS	GSSWKTIVYSS	1500
STAVQSDEID	LSDVLSGNR	VSSCTAAEGS	FTSLTGLLEV	EPLHFTCVST	SDGTRIERDD	1560
ASTFTVSSFG	VPPAVGGLSS	GTVGEASTAL	SSAAQVALQS	LSHAMASAEQ	QLQVLQEKQQ	1620
QLLKLQQQKA	KLEAKLHQT	AAAAAAAASAA	AAAAAGPVHN	AVPSNPVAAP	GFFIHPSDVI	1680
PPTPKTTPLF	MTPPLTPPNE	AVSVVINAEL	AQLFPGSVID	PPAVNLAAQN	KNSSKSRMNP	1740
LGSGLALAIS	HASHFLQPPP	HQSIIIERMH	SGARRFVTL	FGRPILLTDV	LIPTCGDLAS	1800
LSIDIWTLGE	EVDGRRLVVA	TDISTHSLIL	HDLIPPPVCR	FMKITVIGRY	GSTNARAKIP	1860
LGFYYGHSYI	LPWESELKLM	HDPLRGEGES	ASQPEIDQHL	AMMVALQEDI	QCRYNLACHR	1920
LEALLQSIDL	PPLNSANNAQ	YFLRKPDKAV	EEDSRVFSAY	QDCIQLQLQL	NLAHNAVQRL	1980
KVAIGASRKL	LNETSQPEDL	IQTSSTEQLR	TIVRYLLDTL	LSELLHSSNGH	SVPAVLQSTF	2040
HAQACEELFK	HLCISGTPKI	RLHTGLLLVQ	LCGGERWWRQ	FLSNVLQELY	NSEQLLIFPQ	2100
DRVFMLLSCI	GQRSLSNSGV	LESLLNLLDN	LLSPLQPELS	MHRRTEGVLD	IPMISWVVML	2160
VSRLLDYVAT	VEDEAAAAAK	PLNGNQWSFI	NNNLHTQNLN	RSSKGGSSLD	RLYSRKIRKQ	2220
LVHHKQQLNL	LKAKQKALVE	QMEKEKIQSN	KGSSYKLLVE	QAKLKQATSK	HFKDLIRLRR	2280
TAEWSRSNLD	TEVTTTKESP	EIEPLPFTLA	HDCISVVQK	LVLFLLSMDF	TCHADLLLFV	2340
CKVLARIANA	TRPTIHLCEI	VNEPQLERLL	LLLVTDFNR	GDISWGGAWA	QYSLTCMLQD	2400
ILLAGELLAPV	AAEAMEEGTV	SEDVGATAGD	SDDSLQQSPA	QLETTIDEPL	THEIAGTPPL	2460
SSLEKDKID	LELLQDLMEV	DIDPLDIDLE	KDPLAAKVFK	PISSTWYDYW	GADYGTYNYN	2520
PYIGGLGMPV	AKPPSNTEKN	GSQTVSVSVS	QALDARLEVG	LEQQAELMLK	MMSTLEADSI	2580
LQALTNTSPT	FSQSPTGTDD	SLLGNLQPAN	QNSQLMIQLS	SVPMNLNVCFN	KLFSMLQVHH	2640
VQLESLLQLW	LTLNLSNSSSS	GNKENGADIF	LYNANRIPVI	SLNQASIASF	LTVLAWYPNT	2700
LLRTWCLVLH	SLTLMTNMQL	NSGSSSSIGI	QETTAHLLVS	DPNLIHVLVK	FLSGTSPHGT	2760
NQHSPQVGPT	ATQAMQEFLL	RLQVHLSSTC	PQIFSELLLK	LIHILSTERG	AFQTGQGPLD	2820
AQVKLLEFTL	EQNFVSVSVS	TISAVIESVT	FLVHHYITCS	DKVMSRSGSD	SSAGARACFG	2880
GLFANLIRPG	DAKAVCGEMT	RDQLMFDLLK	LVNIIVLQPL	SSNREYSARV	SVTTNTTDSV	2940
SDEEKVSGGK	DVNGSSASIP	GSPACVADLV	LANQQIMSQI	LSALGLCNSS	AMAMIIGASG	3000
LHLTKHENFH	GGLDAISVGD	GLFTILTTL	KKASTVHMML	QPILTYMACG	YMGRQGSLAT	3060
CQLSEPLLWF	ILRVLDTSDA	LKAFHDMGGV	QLICNNMVT	TRAIVNTARS	MVSTIMKFLD	3120
SGPNKAVDST	LKTRILASEP	DNAEGIHNF	PLGTITSSSP	TAQPAEVLLQ	ATPPHRRARS	3180
AAWSYIFLPE	EAWCDLTIHL	PSAVLLKEIH	IQPHLASLAT	CPSSVTVEVS	ADGVNMLPLS	3240
TPVVTSGLTY	IKIQLVKAEV	ASAVCLRHR	PRDASTLGLS	QIKLLGLTAF	GTTSSATVNN	3300
PFLPSEDQVS	KTSIGWLRLL	HHCLTHISDL	EGMMASAAAP	TANLLQTCAA	LLMSPYCGMH	3360
SPNIEVVLVK	IGLQSTRIGL	KLIDILLRNC	AAGSDPTDL	NSPLLFGRLN	GLSSDSTIDI	3420
LYQLGTTQDP	GTKLRIQALL	KWVSDSAKMA	ALKRSGRMNY	MCPSSSAVEY	LLMSPSPSHL	3480
HCVAAILWHS	YELLVEYDLP	ALLDRELFE	LFNWSMSLPC	NVVLKKAVIDS	GLCSMCHIHP	3540
NYFSLLMGWM	GIIPPPVQCH	HRLSMTDDSK	KQDLSSSLTD	DSKNAQAPLS	LTESHLATLA	3600
SSSQSPEAIK	QLLDSGLPSL	LVRSLASF	SHISYSESA	QSVDNSQDKL	RRHHVPQHCN	3660

KMPITADLVA	PILRFLTEVG	NSHIMKDWLG	GSEVNPLWTA	LLFLLCHSGS	TAGGHNLGAQ	3720
QSSTRSASHS	SATTTVLTTQ	QRTAIENATV	AFFLQCISCH	PNNQKLMAQV	LCELFQTAPQ	3780
RGSLPTSGNI	SGFVRRFLQ	LMLEDEKVTM	FLQSPCPLYK	GRINATSHVI	QHMFAGGAGHK	3840
FRTLHLVPST	TLSDVLDLDRVS	DTPSITAKLI	SEQKDDKEKK	NHEEKEKVKA	ENGFQDNYSV	3900
VVASGLKSQS	KRAVASTPPR	PPSRRGRTPV	DKIGSASSSA	DAASKIITVP	VFHLFHRLLA	3960
GQPLPAEMTL	AQLLTLLYDR	KLPQGYRSID	LTVKLGSKVI	TDPSSLKTDS	FKRLHPEKDH	4020
GDLVGSCPED	EALTPSDECM	DGVLDESLE	TCPIQSPLQV	FAGMGGLALI	AERLPMLYPE	4080
VIQQVSAPVI	ASTTQEKPKD	SDQFEWVTIE	QSGELVYEAP	ETIAAEPPPV	KSAVQATSPI	4140
PAHSLAAFGL	FLRLPGYAEV	LLKERKHAQC	LLRLVLGVTD	DGEGSHILQS	PSANVLPTLP	4200
FHVLRSLSFSA	TPLTTDDGVL	LRRMALEIGA	LHLILVCLSA	LSHHAPRVPN	SSLSQTEPQV	4260
SNSHNPTSAE	EQQLYWAKGT	GFGTGSTASG	WDVEQALTKQ	RLEEEHVTC	LQVLASYINP	4320
MSGAVNGEAQ	ASPESRAQNS	SALPSMLLEL	LSQSCLIPAM	SSYLRNDSVL	DMARHVPLYR	4380
ALLELLRAIA	SCTSMVPLLL	PLSTENGE	EDEQSECQTS	VGTLAKMKT	CVDTYTNRLR	4440
SKRENVKAGV	KPDAPDQEP	GLALLVPDIQ	RTAEIVHAAT	ANLRQANQEK	KLGEYSKKVV	4500
MKPKPLSVLK	SLEEKYVAVM	KKLQFDTFEM	VSEDDDGKLG	FKVNYHYMSQ	VKNANDANSA	4560
ARARRLAQEA	VTLSTSLPLS	SSSSVFVRC	EERLDIMKVL	ITGTPADTPYA	NGCFEFDVYF	4620
PQDYPSSPPL	VNLETTGGHS	VRFNPNLYND	GKVCLILNT	WHGRPEEKWN	PQTSSFLQVL	4680
VSVQSLILVA	EPYFNEPGYE	RSRGTSPGTQ	SSREYDGNIR	QATVKWAMLE	QIRNPSPCFK	4740
EVIHKHFYLK	RIELMAQCEE	WIADIQQYSS	DKRVGRTMSH	HAAALKRHTA	QLREELLKLP	4800
CPEGLDPDIE	DASPVCRA	GAEDTLTHDH	VNPSSSKDLP	SDFQL		

Abb. 34: Aminosäuresequenz von BRUCE. Das Fragment, das im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit mMunc-93 interagiert, ist unterstrichen.

8.10 PM-SCL Autoantigen 1

MKETPLSNCE	RRFLRAIEE	KKRLDGRQTY	DYRNIRISFG	TDYGCCIVEL	GKTRVLGQVS	60
CELVSPKLN	ATEGILFFNL	ELSQMAAPAF	EPGRQSDLLV	KLNRLLERCL	RNSKCIDTES	120
LCVVAGEK	QIRVDLHLLN	HDGNIIDAAS	IAAIVALCHF	RRPDVSVQGE	EVTLYTPEER	180
DPVPLSIH	PICVSFAFFQ	QGTYYLLVDPN	EREERVMDGL	LVIAMNKHRE	ICTIQSSGGI	240
<u>MLLKDQVFR</u>	<u>SKIAGVKVAE</u>	<u>ITELIQKALE</u>	<u>NDQVRKEGG</u>	<u>KFGFAESIAN</u>	<u>QRITAFKMET</u>	300
APIDTSNIEE	RAEELIAEAE	PPPEVVSQPV	LWTPGTAQIG	DGIENSWGDL	EDSEKEEEEE	360
EGGIDEAVIL	DDTKMDTGEV	SDIGSQGAPI	VLSDSEEEEM	IILEPEKNPK	KIRAQTSANQ	420
KAPSKQGK	KKKKRTAN					

Abb. 35: Aminosäuresequenz des Polymyositis Scleroderma Autoantigens 1. Das Fragment, das im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit mMunc-93 interagiert, ist unterstrichen.

8.11 FLJ12923

MYPELLPVCS	LKAKNPQDKI	VFTKAEDNLL	ALGLKHFEGT	EFPNPLISKY	LLTCKTAHQ	60
TVRIKLNLMN	RAPDNIKIFY	KKTKQLPVLG	KCCEEIQPHQ	WKPPIEREEH	RLPFWLKASL	120
PSIQEELRHM	ADGAREVGNM	TGTTEINSDR	SLEKDNLELG	SESRYPLLLP	KGVVLKLPV	180
ATRFPRKAWR	QKRSSVLKPL	LIQPSPSLQP	SFNPGKTPAR	STHSEAPSSK	MVLRIPHPIQ	240
<u>PATVLQTVPG</u>	<u>VPPLGVSGGE</u>	<u>SFESPAALPA</u>	<u>VPPEARTSFP</u>	<u>LSESQTLSS</u>	<u>APVPKVMLPS</u>	300
LAPSKFRKPY	VRRRPSKRRG	VKASPCMKA	PVIHHPASVI	FTVPATTVKI	VSLGGGCNMI	360
<u>QPVNAAVAQS</u>	<u>PQTIPITLL</u>	<u>VNPTSFPCL</u>	<u>NQSLVASSVS</u>	<u>PLIVSGNSVN</u>	<u>LPIPSTPEDK</u>	420
AHVNVDIACA	VADGENAFQG	LEPKLEPQEL	SPLSATVFPK	VEHSPGPPLA	DAECQEGLSE	480
NSACRWTVVK	TEEGRQALEP	LPQGIQESLN	NPTPGDLEEI	VKMEPEEARE	EISGSPERDI	560
CDDIKVEHAV	ELDTGAPSEE	LSSAGEVTKQ	TVLQKEEERS	QPTKTPSSSQ	EPPDEGTSGT	620
DVNKGSSKNA	LSSMDPEVRL	SSPPGKPEDS	SSVDGQSVGT	PVGPEGTGGEK	NGPEEEEEED	480
FDDLTDDEED	EMSSASEESV	LSVPELQVRA	GEYSQVFRGL	SNMYHLLICH	LLACCTMDSP	540
KIICI						

Abb. 36: Aminosäuresequenz des hypothetischen Proteins FLJ12923. Das Fragment, das im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit mMunc-93 interagiert, ist unterstrichen.

8.12 DOCK180

MTRWVPTKRE	EKYGVAFYNY	DARGADELSL	QIGDTVHILE	TYEGWYRGYT	LRKKSCKGIF	60
PASYIHLKEA	IVEGKGQHET	VIPGDLPLIQ	EVTTTLREWS	TIWRQLYVQD	NREMFRSVRH	120
MIYDLIEWRS	QILSGTLPQD	ELKELKKKVT	AKIDYGNRIL	DLDLVVRDED	GNILDPELTS	180
TISLFRAHEI	ASKQVEERLQ	EESKQKQONID	INRQAKFAAT	PSLALFVNK	NVCKIGEDA	240
EVLMSLYDPV	ESKFISENYL	VRWSSSGLPK	DIDRLHNLRA	VF'TDLGSKDL	KREKISFVCQ	300
IVRVGRMELR	DNNTRKLTSG	LRRPFGVAVM	DVTDIINGKV	DDEDKQHFIP	FQPVAGENDF	360
LQTVRINKVIA	AKEVNHGQGG	LWVTLKLLPG	DIHQIRKEFP	HLVDRTTAVA	RKTGFPEIIM	420
PGDVRNDIYV	TLVQGFDFKG	SKTTAKNVEV	TVSVYDEDGK	RLEHVIFPGA	GDEAISEYKS	480
VIYYQVKQPR	WFETVKVAIP	IEDVNRSHLR	FTFRHRSSQD	SKDKSEKIFA	LAFVKLMRYD	540
GTTLRDGEHD	LIVYKAEAKK	LEDAATYLSL	PSTKAELEEK	GHSATGKSMQ	SLGSCISKD	600
SFQISTLVCS	TKLTQNVDDL	GLLKWSNTS	LLQQNLRQLM	KVDGGEVVKF	LQDTLDALFN	660
IMMENSESET	FDTLVFDALV	FIIGLIADRK	FQHFNPVLET	YIKKHFSATL	AYTKLTKVLK	720
NYVDGAEKPG	VNEQLYKAMK	ALESIFKFIV	RSRILFNQLY	ENKGEADFVE	SLLQLFRSIN	780
DMMSSMSDQT	VRVKGAAALKY	LPTIVNDVKL	VFDPKELSKM	FTEFILNVM	GLLTIQKLYC	840
LIEIVHSDLF	TQHDCREILL	PMMTDQLKYH	LERQEDLEAC	CQLLSHILEV	LYRKDVGPTQ	900
RHVQIIMEKL	LRTVNRTVIS	MGRDSELIGN	FVACMTAILR	QMEDYHYAHL	IKTFGKMRTD	960
VVDFLMETFI	MFKNLIGKNV	YPFDWVIMNM	VQNKVFLRAI	NQYADMLNKK	FLDQANFELQ	1020
LWNNYFHLAV	AFLTQESLQL	ENFSSAKRAK	ILNKYGMRR	QIGFEIRDMW	YNLGQHKIKF	1080
IPEMVGPPILE	MTLIPETELR	KATIPIFFDM	MQCFHSTRS	FQMFENEIIT	KLDHEVEGGR	1140
GDEQYKVLFD	KILLEHCRKH	KYLAKTGETF	VKLVVRLMER	LLDYRTIMHD	ENKENRMSCT	1200
VNVLNIFYKEI	EREEMYIRYL	YKLCDLHKEC	DNYTEAAYTL	LLHAKLLKWS	EDVCVAHLTQ	1260
RDGYQATTQG	QLKEQLYQEI	IHYFDKGKMW	EEAIALGKEL	AEQYENEMFD	YEQLSELLKK	1320
QAQFYENIVK	<u>VIRPKPDYFA</u>	<u>VGYYGQGFPT</u>	<u>FLRGKVFYR</u>	<u>GKEYERREDF</u>	<u>EARLLTQFPN</u>	1380
<u>AEKMKTTSP</u>	<u>GDDIKNSPGQ</u>	<u>YIQCFTVKPK</u>	<u>LDLPPKFHRP</u>	<u>VSEQIVSFYR</u>	<u>VNEVQRFES</u>	1440
RPIRKGEKNP	DNEFANMWIE	RTIYTTAYKL	PGLLRWFEVK	SVMVEISPL	ENAIETMQLT	1500
NDKINSMVQQ	HLDDPSLPIN	PLSMLLNGIV	DPAVMGGFAN	YEKAFFTDYR	LQEHPAHEK	1560
IEKLDLIAW	QIPFLAEGIR	IHGDKVTEAL	RPFHERMEAC	FKQLKEKVEK	EYGVIMPSS	1620
LDDRRGSRPR	SMVRSFTMPS	SSRPLSVASV	SSLSSDSTPS	RPGSDGFALE	PLPKMHSR	1680
SQDKLKDDDL	EKEKKDKKKE	KRNSKHQEIF	EKEFKPTDIS	LQQSEAVILS	ETISPLRPQR	1740
PKSQVMNVIG	SERRFSVSPS	SPSSQQTPPP	VTPRAKLSFS	MQSSLELNGM	TGADVADVPP	1800
PLPLKGSVAD	YGNLMENQDL	LGSPTPPPPP	PHQRHLPPPL	PSKTPPPPPP	KTTRKQTSVD	1860
SGIVQ						

Abb. 37: Aminosäuresequenz von DOCK180. Das Fragment, das im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit mMunc-93 interagiert, ist unterstrichen.

8.13 Shank3b

MGLCGSLLPT	FSLSEQFRYK	RRVYAQNLI	DKQFAKLHTK	ANLKKFMDYV	QLHSTDKVAR	60
LLDKGLDPNF	HDPDSGECPL	SLAAQLDNAT	DLLKVLNRGG	AHLDFRTRDG	LTAVHCATRQ	120
RNAGALTLL	DLGASPDYKD	SRGLTPLYHS	ALGGGDALCC	ELLHHDHAQL	GTTDENGWQE	180
IHQACRFHGV	QHLEHLLFYG	ANMGAQNASG	NTALHICALY	NQESCARVLL	FRGANKDVNR	240
YNSQTAQVA	IIAGNFELAE	VIKTHKDSDV	VPFRETPSYA	KRRRLAGPSG	LASPRLQRS	300
ASDINLKGQD	PAASPGPTLR	SLPHQLLLQR	LQEEKDRDRD	GELENDISGP	SAGRGGHNKI	360
SPSGPGGSGP	APGPGPASPA	PPAPPPRGPK	RKLYSAVPGR	KFIAVKAHSP	QGEGEIPLHR	420
GEAVKVLISG	EGGFWEQTVK	GRTGWFPAAC	<u>VEEVQMRQYD</u>	<u>TRHETREDRT</u>	<u>KRLFRHYTVG</u>	480
<u>SYDSLTSBSD</u>	<u>YVIDDKVAIL</u>	<u>QKRDHEGFGF</u>	<u>VLRGAKAETP</u>	<u>IEEFTPTPAF</u>	<u>PALQYLESVD</u>	540
<u>VEGVAVRAGL</u>	<u>RTGDFLIEVN</u>	<u>GVNVVKVGHK</u>	<u>QVVGLIRQGG</u>	<u>NRLVMKVSV</u>	<u>TRKPEEDGAR</u>	600
RRAPPPPKRA	PSTTLTLRSK	SMTAELEELE	KLDEILAVAA	EPTLRPDIAD	ADSRAATVKQ	660
RPTSRITPA	EISSLFRQGG	LPGPEKLPSS	LRKGIPTKTS	VGSSAASVS		

Abb. 38: Aminosäuresequenz von Shank3b. Das Fragmente, das im Hefe-Zwei-Hybrid-System mit mMunc-93 interagiert, ist unterstrichen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Astrid Regine Kollewe
Geburtsdatum 24. Juni 1973
Geburtsort Hildesheim, Niedersachsen
Anschrift Nelkenstr. 12
30167 Hannover
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1979-1983 Grundschule Hildesheim-Ochtersum
1983-1992 Marienschule Hildesheim, staatlich anerkanntes Gymnasium
Mai 1992 Abitur

Studium

WS 1992/93-WS 1997/98 Studium der Biochemie an der Universität Hannover (Dipl. Biochemie)
Dezember 1997 Diplom in Biochemie an der Universität Hannover
Diplomarbeit: Expression von SNARE-Proteinen aus Säugerneuronen in *S. cerevisiae* (an der Medizinischen Hochschule Hannover, Institut für Physiologische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Niemann)
Gesamtnote: Sehr gut

Beruflicher Werdegang

Dezember 1995 Studentische Hilfskraft: Physiologisch chemisches Praktikum für Studenten der Allgemeinmedizin, Abteilung Medizinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
June 1996 Studentische Hilfskraft: Biochemisches Praktikum für Studenten der Biochemie, Abteilung Physiologische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover
seit 15. März 1998 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologische Chemie, OE4310, der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Niemann und Dr. T. Binz zum Zwecke der Promotion

Veröffentlichungen

Wei S, Xu T, Ashery U, Kollewe A, Matti U, Antonin W, Rettig J, and Neher E (2000). Exocytotic mechanism revealed by truncated and zero layer mutants of the C-terminus of SNAP-25. *EMBO J.* **19**: 1279–89
Kollewe A and Niemann H (1999). Human homologue of unc-93 of *C. elegans* is highly expressed in liver cells. Fall Meeting of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie in Hamburg, *Biological Chemistry* **380**: 167