

Untersuchungen zu Angiogenin-Interakteuren mit Hilfe des Yeast Two-Hybrid Systems

Dissertation

vorgelegt von
Carsten Schmidt

Prof. Dr. H. Tschesche

Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

Bielefeld, April 2001

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier DIN-ISO 9706

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand unter der Leitung von Prof. Dr. H. Tschesche an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld in der Zeit von Oktober 1997 bis April 2001.

Ich danke Prof. Dr. Tschesche, dass ich diese interessante Aufgabenstellung in seinem Arbeitskreis bearbeiten konnte.

Der gesamten Arbeitsgruppe *Biochemie I* danke ich für die sehr freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre, die sehr dazu beigetragen hat, dass schwierige Phasen erträglicher waren.

Herrn Dr. Bernd Stratmann danke ich für die zur Verfügungstellung der pEG202/TIMP1- und pEG202/TIMP4-Plasmide.

Zu Dank bin ich auch Herrn Dr. Christoph Arkona für das pEG202/GelB-Plasmid aber vor allem für sehr wertvolle Ratschläge und Hilfestellung bei der Anwendung des Two-Hybrid Systems verpflichtet.

Christian Riedel, Nils Kunze und Viola Baumgärtel möchte ich für ihre Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen von Praktika danken.

Herrn Dipl. Chem. Martin Roderfeld danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen	1
2	Zusammenfassung	4
3	Einleitung	8
3.1	Angiogenin (Vallee & Riordan 1997)	8
3.1.1	Angiogenin ist eine schwache RNase	8
3.1.2	Angiogenin wird in den Zellkern transportiert.	10
3.1.3	Angiogenin wirkt auf andere Zellen ein.	11
3.1.4	Angiogenin ist an proteolytischen Prozessen beteiligt.	12
3.2	Das LexA Yeast Two-Hybrid System	15
3.2.1	Vor- und Nachteile des Two-hybrid Systems	17
3.2.2	Falsch positive Klone im Two-Hybrid System	18
4	Zielsetzung	21
5	Materialien	22
5.1	Proteine, Enzyme, Nucleotide,	22
5.2	cDNA-Banken	22
5.3	Antikörper	23
5.4	Standards	23
5.5	Vektoren	23
5.6	Genotyp der Mikroorganismen	23
5.7	Chemikalien-Kits	24
6	Methoden	25
6.1	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	25
6.1.1	Amplifizieren und Reinigung der cDNA-Banken	25

6.2	Proteinchemische Arbeitsmethoden	26
6.2.1	Kopplung von Angiogenin an NHS-Sepharose	26
6.2.2	Konjugation von Angiogenin mit HRPO oder AP	26
6.2.3	ELISA-Bindungstest	27
6.2.4	Interaktionstest mit Ang-Sepharose	27
6.2.5	Interaktion mit Ang-AP- bzw. Ang-AK-AP-Konjugat	28
6.3	LexA Two-Hybrid-System	28
6.3.1	Kultivierungsmedien	28
6.3.2	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (EGY48)	30
6.3.3	Proteinpräparation aus EGY48	31
6.3.4	Gesamt-DNA-Präparation aus EGY48	32
6.3.5	Transformation von EGY48	33
6.3.6	Transformation von EGY48 mit cDNA-Banken	33
6.3.7	Selbstaktivierungstest	35
6.3.8	X-Gal-Test	35
6.3.9	Gal/Raf-Glu-Test	36
6.3.10	Verlusttest	37
6.3.11	ONPG-Test	37
7	Ergebnisse	40
7.1	Klonierungen	40
7.2	DNA-Sequenzierungen	41
7.3	Überprüfung der Konstrukte auf ihre Tauglichkeit im Two-Hybrid-System	42
7.3.1	Selbstaktivierungstest	42
7.3.2	Expressionstest	43
7.4	Herstellung der cDNA-Banken in EGY48	43
7.5	Genbankscreening	45

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	III
7.6 Ergebnisse des cDNA-Bank-Screenings	51
7.6.1 Fetale Leber-DNA-Bank	52
7.6.2 Plazenta-DNA-Bank	54
7.7 Sequenzierte Interakteure	57
7.8 Ergebnisse der C-terminalen Ansequenzierung	61
7.9 Bemerkungen zu einigen Sequenzen	62
7.10 Beschreibung der gefundenen Proteine	64
7.11 Verlusttest	68
7.12 Umklonierungstest	68
7.13 Angiogeninmutanten R66A und H84S	73
7.14 Direkte Interaktionstest auf Proteinebene	76
8 Diskussion	79
8.1 Vorgehensweise	79
8.2 Identifizierte Angiogenin-Interakteure	80
8.3 Ergebnisse der Expression von LexA-Interakteur-Hybriden	82
8.3.1 Hybridaustausch	82
8.3.2 Molekularmassenbestimmung der Ang-Interakteure	85
8.4 Bewertung der Interaktionen	86
8.5 Ergebnisse der Interaktionstests ohne Two-Hybrid System	88
8.6 Ergebnisse mit R66A und H84S	89
Literatur	91

1 Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylthiazolin-6-sulfonsäure)
Amp, amp	Ampicillin
Ang	Angiogenin
Ang-AK	Angiogenin-Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleotide (ATP,GTP,CTP,TTP)
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGY48[p8oplacZ]	EGY48 transfiziert mit p8oplacZ
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EtBr	Ethidiumbromid
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
Gal	D-Galactose
Gal/Raf u ⁻ h ⁻ l ⁻ trp ⁻	Bezeichnung für ein Kultivierungsmedium (s. 6.3.1)
Glu	D-Glucose
Glu u ⁻ ,	
Glu u ⁻ h ⁻ ,	
Glu u ⁻ h ⁻ trp ⁻ ,	Bezeichnungen für

Glu ⁻ h ⁻ trp ⁻ l ⁻	Kultivierungsmedien (s. 6.3.1)
h ⁻	Histidin fehlt im Medium
hPRI	menschlicher Plazenta Ribonuclease Inhibitor
HPRO	Meerrettich-Peroxidase
IGF	Insulin-like-growth-factor
IGFBP1	Insulin-like-growth-factor-binding-protein 1
kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l ⁻	Leucin fehlt im Medium
LiOAc	Lithiumacetat
LMW	Low molecular weight, Proteinstandard
MCS	multiple cloning site, Klonierungsstelle
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
neg.	negativ
OD(x)	optische Dichte bei Wellenlänge von x nm
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
pB42AD/x	pB42AD mit einklonierter x-cDNA
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pEG202/Ang (Eco/Sal)	pLexA und Ang-cDNA ligiert unter Benutzung
pEG202/Ang (Not/Not)	von <i>EcoRI/SalI</i> bzw. <i>NotI/NotI</i>
pEG202/x	pEG202 mit einklonierter x-cDNA
PMNL	Polymorphkernige Granulozyten
pos.	positiv
PVDF	Polyvinylidendifluorid

Raf	Raffinose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Thi	Thiamin
TIMP	Tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
trp ⁻	Tryptophan fehlt im Medium
u ⁻	Uracil fehlt im Medium
(v/v)	Volumenverhältnis
(w/v)	Gewichts-Volumenverhältnis
wsl.	wahrscheinlich
x	Platzhalter für beliebige cDNA
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
y	Platzhalter für beliebige cDNA
YNB	Yeast nitrogen base
YNB ⁻	YNB fehlt im Medium

2 Zusammenfassung

Angiogenin ist ein seit sechzehn Jahren intensiv untersuchtes Protein, seine physiologische Rolle im menschlichen Körper ist aber bis heute nicht ganz klar. Angiogenin kann Angiogenese hervorrufen (Strydom et al. 1985) und ist in der Lage, die Degranulation von PMNL zu hemmen (Tschesche et al. 1994). In beiden Fällen gibt es Anlass anzunehmen, dass diese Funktionen Rezeptor-vermittelt ablaufen (Hu et al. 1997a, Bicknell et al. 1994). Allerdings ist es nicht gelungen, einen derartigen Rezeptor zu reinigen und zu charakterisieren. Um einen Beitrag zu leisten, diese Wissenslücke zu schließen, wurde in dieser Arbeit versucht, mit Hilfe des Two-Hybrid Systems Proteine zu finden, die an Angiogenin binden, in der Hoffnung einen bereits bekannten Rezeptor darunter zu finden. Beim Durchsuchen einer humanen fetalen Leber cDNA-Bank sowie einer humanen Plazenta cDNA-Bank gelang es, eine Reihe von Angiogenin-bindenden Proteinen zu indentifizieren, darunter einige extrazelluläre Proteine (Plasmaproteine, Proteine der extrazellulären Matrix) sowie auch intrazelluläre Proteine, die an Signaltransduktion und mitotischen Prozessen beteiligt sind. Die nächste Tabelle gibt einen Überblick über die gefundenen Proteine, ihr Vorkommen und ihre Funktion, die für die Mehrzahl der Proteine allerdings nur andeutungsweise verstanden ist. Bei den meisten aufgeführten Proteinen handelt es sich aber um N-terminal mehr oder weniger stark verkürzte Varianten.

Name	Lokalisierung	Funktion
Insulin like growth factor binding protein 1 (IGFBP1)	Plasma, ECM	unbekannt
Hämopexin	Plasma	Hämtransport
δ -Aminolävulinatsynthase	Mitochondrien	Hämsynthese
VAV1-Onkogen	Cytosol	GTP-Austauschfaktor
DEAD-Box-Protein p62	Zellkern	RNA-Helicase
Vitronectin	ECM	bindet Zellen an ECM
Ubiquitin-bindendes Tyrosinphosphoprotein p62	Cytosol	Signaltransduktion (?)
Inter- α -Trypsininhibitor	Plasma, ECM	unbekannt
Cyclin-G1-bindendes Protein 1	Zellkern	unbekannt
DNA mismatch repair protein MLH3	Zellkern	DNA-Reparatur
Fibulin 1C	Plasma, ECM	unbekannt
Kernprotein E3-3 orf1	Zellkern	unbekannt
Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)	ECM	Zellproliferation
Fibronectin	Plasma, ECM	bindet Zellen an ECM
E1B-55kD assoziiertes Protein 5	Zellkern	RNA-Export(?)
Pregnancy Associated Plasma Protein A (PAPP A)	Plasma	unbekannt
Meltrin S (ADAM 12S)	ECM	unbekannt
GAP assoziiertes Tyrosinphosphoprotein p62	Cytosol	Signaltransduktion (?)
α -Actinin 4	Cytosol	Cytoskelettstrukturierung

Tabelle 2.1: Angiogenin-Interaktionspartner, die mit dem LexA Yeast Two-Hybrid System gefunden werden konnten.

Vom IGFBP1, DEAD-Box-Protein p62 und vom Inter- α -Trypsininhibitor konnten Aminosäuresequenzen isoliert werden, die am N-Terminus vollständig sind. Die Sequenzen vom DNA-mismatch repair protein MLH3 und E1B-55kD assoziiertem Protein 5 haben am N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, die in den bislang veröffentlichten Sequenzen nicht vorkommen. Bei Expression von α -Actinin 4 und Ubiquitin-bindendem Tyrosinphosphoprotein p62 in *S.cerevisiae* (EGY48) wurden Molekularmassen gemessen, die stark von den erwarteten Werten abweichen. Somit werden auch hier Proteinvarianten vorliegen, die bislang unbekannt sind.

Mit Fibronectin, IGFBP1 und EGFR gelang es nicht, eine Interaktion mit Angiogenin außerhalb des Two-Hybrid Systems – also mit konventionellen biochemischen Verfahren - nachzuweisen.

Beim Durchsuchen der cDNA-Banken mit dem Two-Hybrid System wurde ein Angiogenin-LexA-Hybrid verwendet, während die Interakteure mit dem Transkriptionsaktivator B42 verbunden waren. Leider stellte sich am Ende heraus, dass sich die so detektierten Interaktionen nicht mehr beobachten ließen, wenn der umgekehrte Fall vorlag, wenn also Angiogenin und B42 bzw. die Interakteure mit LexA Hybride bildeten.

Das eigentliche Ziel dieser Arbeit einen Angiogeninrezeptor zu finden konnte letztlich nicht erreicht werden. Zwar sind mit ADAM 12 und dem EGFR zwei Proteine gefunden worden, die als Rezeptoren dienen können. Im Falle vom EGFR konnte aber nur eine Variante gefunden werden, die keine cytosolische Domäne und keine Transmembrandomäne besitzt. Gleiches gilt für ADAM 12, wo auch nur die Variante ADAM 12S identifiziert werden konnte, welche eine nicht membranständige sekretierte Form von ADAM 12 ist. Die gefundenen Zellkernproteine und ECM-Proteine passen aber sehr gut zu den bis jetzt bekannten Funktionen des Angiogenins. Einerseits muss

Angiogenin in den Zellkern von Endothelzellen transportiert werden um Blutgefäßneubildung zu induzieren, andererseits erfordert Angiogenese eine Umstrukturierung der ECM.

3 Einleitung

3.1 Angiogenin (Vallee & Riordan 1997)

Angiogenin ist eine nicht glykosylierte 14,4 kD RNase, welche aus einer einzigen Kette von 123 Aminosäuren besteht. Das Protein hat drei Disulfidbrücken, sein isoelektrischer Punkt ist mit ca. 9,4 aufgrund des hohen Anteils an basischen Aminosäuren (10,6 % Arginin) auffallend hoch. Angiogenin wird vorwiegend von Leberzellen sezerniert, wird aber auch von vielen anderen Zellen, wie beispielsweise Fibroblasten, vaskulären Endothelzellen, glatten Muskelzellen, peripheren Blutzellen sowie vielen Tumoren synthetisiert (Moenner et al. 1994, Rybak et al. 1987). Es kommt im Blutplasma in geringer Konzentration (ca. 250 ng/l) vor (Bläser et al. 1993). Bis jetzt sind zwei verschiedene biologische Aktivitäten nachgewiesen: Zum einen hat es die Fähigkeit, Angiogenese zu induzieren (Strydom et al. 1985). Zum anderen hemmt es die Degranulation von PMNL und hat somit einen Einfluss auf die unspezifische Immunabwehr (Tschesche et al. 1994). Die angiogenetischen Eigenschaften sind hierbei weitaus besser untersucht. Trotz intensivster Untersuchungen sind bis heute einige wesentliche Fragen ungeklärt. Es gibt beispielsweise starke Hinweise, dass die Angiogeninfunktionen über einen Rezeptor vermittelt werden (s.u.), der aber nie charakterisiert werden konnte. Als Bindungspartner des Angiogenins sind bislang lediglich α -Actin, Heparin, und hPRI bekannt. Außerdem ist völlig unklar, was das natürliche Substrat des Angiogenins sein könnte.

3.1.1 Angiogenin ist eine schwache RNase

Sowohl Primär- als auch Tertiärstruktur von RNase A und Angiogenin sind sich sehr ähnlich. Gut ein Drittel der RNase A-Aminosäuren sind im Angio-

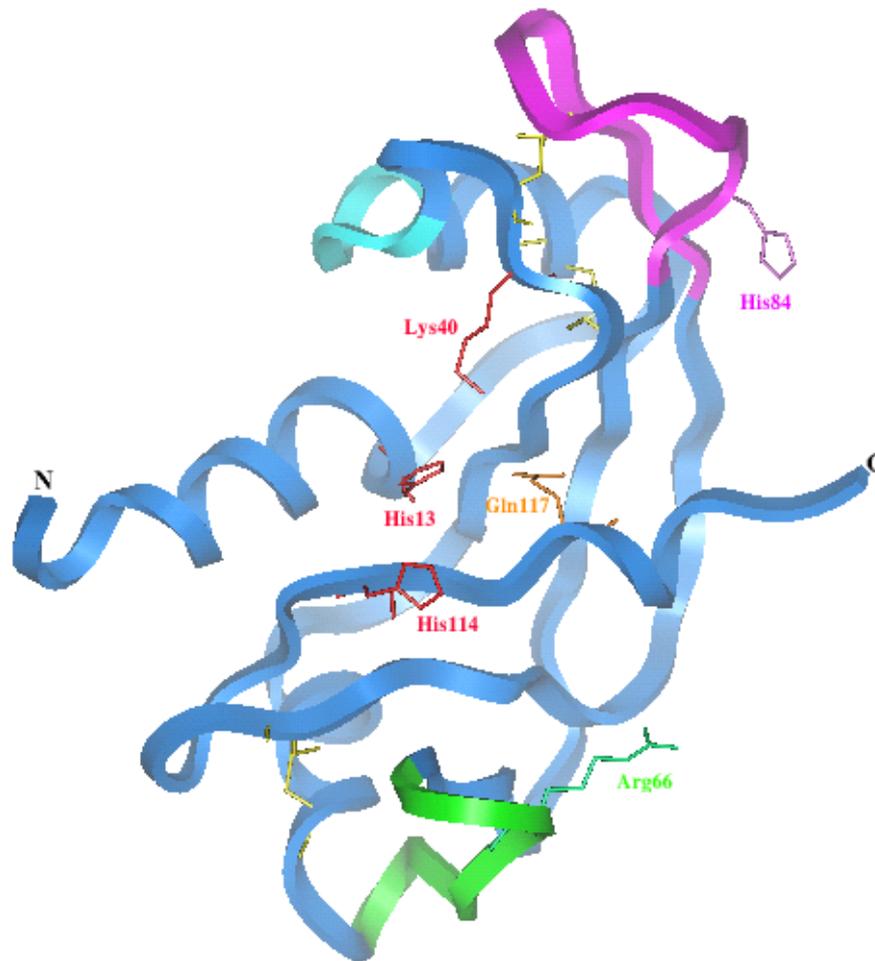


Abbildung 3.1: Strukturmodell des Angiogenins auf der Grundlage von Röntgenstrukturdaten (Archarya 1994, Brookhaven Databank) mit dem Programm *insightII* erstellt. Dargestellt sind neben den drei Disulfidbrücken die katalytischen Aminosäuren (rot), und Gln-117, die den Zugang zum katalytischen Zentrum erschwert. Violett hervorgehoben ist der für die Degranulationshemmung verantwortliche Teil, grün eingefärbt ist der Bereich, der die Bindung an Endothelzellen bewirkt und hellblau der Ort, wo sich die Kernlokalisationssequenz befindet. Angiogenin wurde in dieser Arbeit in Bezug auf die Aminosäuren His-84 und Arg-66 mutiert (H84S, R66A).

genin konserviert. Dazu gehören auch die katalytischen Aminosäuren His-12, Lys-41 und His-119, die im Angiogenin His-13, Lys-40 und His-113 entsprechen. Tatsächlich ließ sich für Angiogenin eine äußerst schwache Ribonucleasfunktion nachweisen, die allerdings ca. 1 Million Mal schwächer als die von RNase A ist (Shapiro et al. 1986). Polyribonucleotide werden bevorzugt auf der 3'-Seite von Pyrimidinbasen hydrolysiert, wobei eine gewisse Spezifität für ribosomale RNA und tRNAs besteht (Lee et al. 1989). Intensive Mutagenesestudien ergaben, dass für die verminderte RNase-Aktivität die C-terminalen Aminosäuren – und hier besonders Gln-117 – verantwortlich sind, die beim Angiogenin im Gegensatz zur RNase A den Eingang ins katalytische Zentrum blockieren. Die gegenüber der RNase A fehlende vierte Disulfidbrücke ist allerdings ein bedeutenderer Grund für die geringe RNase-Aktivität des Angiogenins (Shapiro et al. 1998).

Interessant ist, dass Angiogeninmutanten, die die RNasefunktion verloren haben, nicht mehr in der Lage sind, Angiogenese zu induzieren (Shapiro et al. 1988).

3.1.2 Angiogenin wird in den Zellkern transportiert.

Angiogenin wird von nicht-konfluenten Endothelzellen sowie von glatten Muskelzellen aufgenommen und gelangt danach in den Zellkern, wo es im Nucleolus akkumuliert (Hu et al. 1997a, Hatzi et al. 2000). Der Mechanismus des Zellkerntransports ist kaum untersucht (Li et al. 1997), das Protein hat aber eine Kernlokalisationssequenz (R31-R32-R33-G34-L35). Die Funktion des Angiogenins im Nucleolus ist unbekannt, laut Hu et al. (2000) bindet es dort an DNA, wobei aber keine spezifische Basensequenz gefunden werden konnte. Ohne Zellkerntranslokation kann Angiogenin keine Angiogenese induzieren (Moroianu et al. 1994).

In diesem Zusammenhang ist ein 170 kD Protein entdeckt worden, welches an Angiogenin bindet und sich nur dann auf der Endothelzelloberfläche befindet, wenn die Zellen noch nicht konfluent sind. Es könnte sich um einen Angiogeninrezeptor handeln, der die Zellkerntranslokation vermittelt. Das entsprechende Protein ist aber bis heute nicht charakterisiert worden (Hu et al. 1997a).

3.1.3 Angiogenin wirkt auf andere Zellen ein.

Neben der degranulationshemmenden Wirkung auf PMNL sind Wechselwirkungen mit Endothelzellen sowie glatten Muskelzellen nachgewiesen (Badet et al. 1989, Hatzi et al. 1999). In Bezug auf die Bindung an Endothelzellen ist beim Angiogenin eine Bindungsregion identifiziert worden, die die Aminosäuren 60 bis 68 und zusätzlich Asn-109 umfasst. Die degranulationshemmende Wirkung wird hingegen von einer ganz anderen Angiogeninregion ausgeübt, die aus den Aminosäuren 83 bis 95 besteht. Dabei haben die ersten drei Aminosäuren dieser Sequenz, Leu-83, His-84, und Gly-85 eine herausragende Bedeutung. Die Bindung des Angiogenins an PMNL-Membranen ist mit FITC-gekoppelten Anti-Angiogeninantikörpern fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen worden (Kopp 1998).

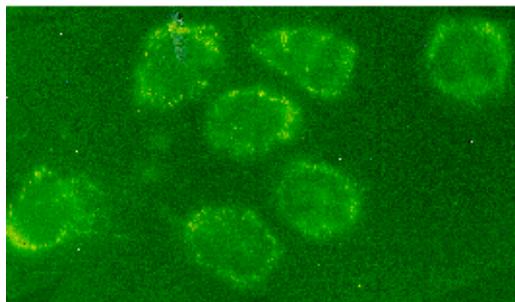


Abbildung 3.2: PMNL mit gebundenem FITC-markiertem Angiogenin (helle Punkte)

Endothelzellen entwickeln unter Angiogenineinfluss proteolytische Aktivitäten, die es ihnen ermöglichen, Basalmembranen sowie die extrazelluläre Ma-

trix zu durchdringen (Hu et al. 1994). Soncin (1992) fand heraus, dass Angiogenin als Adhäsionsprotein für Endothelzellen und Fibroblasten fungieren kann. Außerdem wirkt Angiogenin als ein – wenn auch im Vergleich zu anderen angiogenetischen Faktoren – schwaches Mitogen (Hu et al. 1997a). Endothelzellproliferation, das Durchdringen von Basalmembranen und das Einwandern in die extrazelluläre Matrix sind wesentliche Schritte bei der Bildung neuer Blutgefäße (Bussolino et al. 1997).

Zudem ist in Endothelzellen unter Angiogenineinwirkung Aktivierung der Phospholipase C und Phospholipase A₂ beobachtet worden (Bicknell et al. 1988). Dies wird als starker Hinweis angesehen, dass es auf Endothelzellen einen Rezeptor für Angiogenin gibt.

Da sowohl Endothelzellen wie auch glatte Muskelzellen Bestandteile von Blutgefäßen sind und Angiogenin im Plasma vorhanden ist, wird spekuliert, dass die physiologische Aufgabe des Angiogenins in einem Beitrag zur Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität besteht (Soncin 1992, Hatzi et al. 2000). Dies wird auch darin unterstützt, dass Angiogenin in das Fibrinolyse-system (Plasminogenaktivierung) eingreifen kann (Hu et al. 1993b).

3.1.4 Angiogenin ist an proteolytischen Prozessen beteiligt.

Angiogenin bindet an Actin an der Oberfläche von Endothelzellen (Hu et al. 1993a). Der Komplex kann dann abdissoziieren und die Plasminogenation aus Plasminogen durch t-PA beschleunigen (Hu et al. (1993b). Dieser Sachverhalt dient als Erklärung für die von Angiogenin induzierten proteolytischen Eigenschaften von Endothelzellen.

Weiterhin ist bekannt, dass Elastase Angiogenin spaltet, wobei zwei Fragmente entstehen, die über eine Disulfidbrücke zusammengehalten werden. Derart prozessiertes Angiogenin hat zwar leicht erhöhte RNase-Aktivität,

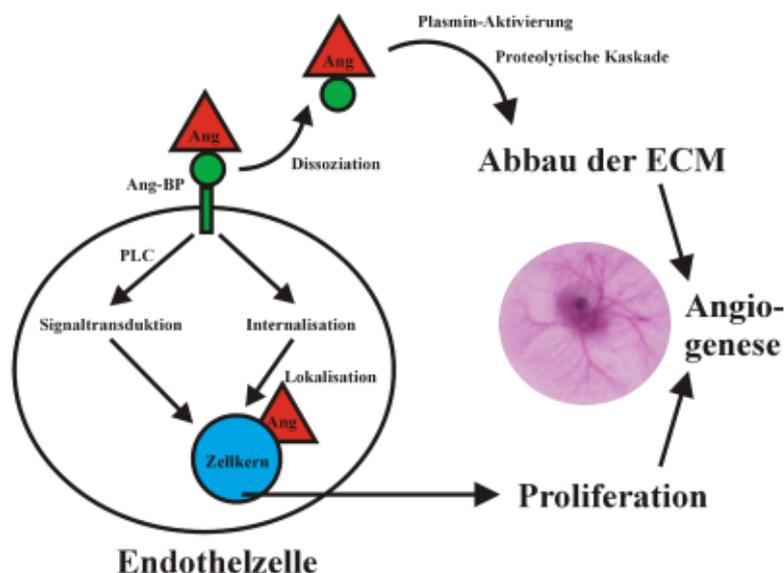


Abbildung 3.3: Graphische Darstellung der postulierten Wirkungsweise des Angiogenins nach Vallee und Riordan (1997); Das Angiogeninbindungsprotein (Ang-BP) steht sowohl für das Zelloberflächenactin (Dissoziation als Komplex von Zellmembran) als auch für den möglichen Rezeptor. Das runde Bild, welches Angiogenese demonstrieren soll, zeigt einen Hühnerembryo, der Blutgefäße ausbildet.

wird aber nicht mehr in den Zellkern transportiert. Die angiogenetischen Eigenschaften gehen also durch die Spaltung verloren. Plasminogen bewirkt eine Steigerung der proteolytischen Aktivität der Elastase gegenüber Angiogenin (Hu 1997b).

Interessant ist dabei, dass Plasminogen ebenfalls ein Substrat der Elastase ist. Dabei entsteht Angiostatin, ein Protein, welches Angiogenese inhibiert.

Elastase könnte demnach eine Rolle bei der Regulation der Angiogenese spielen. Hier könnte zudem ein Grund liegen, warum Angiogenin die Degradation von PMNL hemmt, da PMNL auch Elastase sekretieren können. Angiogenin schützt sich dabei sozusagen selber vor proteolytischer Inaktivierung (Hu et al. 1997b).

Aus den bisher dargelegten Sachverhalten geht hervor, dass die physiologische Aufgabe des Angiogenins in der Induktion zur Bildung neuer Blutgefäße

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10
 1 **Gln - Asp - Asn - Ser - Arg - Tyr - Thr - His - Phe - Leu**
 CAG-GAT-AAC-TCC-AGG-TAC-ACA-CAC-TTC-CTG-
 11 **Thr - Gln - His - Tyr - Asp - Ala - Lys - Pro - Gln - Gly**
 ACC-CAG-CAC-TAT-GAT-GCC-AAA-CCA-CAG-GGC-
 21 **Arg - Asp - Asp - Arg - Tyr - Cys - Glu - Ser - Ile - Met**
 CGG-GAT-GAC-AGA-TAC-TGT-GAA-AGC-ATC-ATG-
 31 **Arg - Arg - Arg - Gly - Leu - Thr - Ser - Pro - Cys - Lys**
 AGG-AGA-CGG-GGC-CTG-ACC-TCA-CCC-TGC-AAA-
 41 **Asp - Ile - Asn - Thr - Phe - Ile - His - Gly - Asn - Lys**
 GAC-ATC-AAC-ACA-TTT-ATT-CAT-GGC-AAC-AAG-
 51 **Arg - Ser - Ile - Lys - Ala - Ile - Cys - Glu - Asn - Lys**
 CGC-AGC-ATC-AAG-GCC-ATC-TGT-GAA-AAC-AAG-
 61 **Asn - Gly - Asn - Pro - His - Arg - Glu - Asn - Leu - Arg**
 AAT-GGA-AAC-CCT-CAC-AGA-GAA-AAC-CTA-AGA-
 71 **Ile - Ser - Lys - Ser - Ser - Phe - Gln - Val - Thr - Thr**
 ATA-AGC-AAG-TCT-TCT-TTC-CAG-GTC-ACC-ACT-
 81 **Cys - Lys - Leu - His - Gly - Gly - Ser - Pro - Trp - Pro**
 TGC-AAG-CTA-CAT-GGA-GGT-TCC-CCC-TGG-CCT-
 91 **Pro - Cys - Gln - Tyr - Arg - Ala - Thr - Ala - Gly - Phe**
 CCA-TGC-CAG-TAC-CGA-GCC-ACA-GCG-GGG-TTC-
 101 **Arg - Asn - Val - Val - Val - Ala - Cys - Glu - Asn - Gly**
 AGA-AAC-GTT-GTT-GTT-GCT-TGT-GAA-AAT-GGC-
 111 **Leu - Pro - Val - His - Leu - Asp - Gln - Ser - Ile - Phe**
 TTA-CCT-GTC-CAC-TTG-GAT-CAG-TCA-ATT-TTC-
 121 **Arg - Arg - Pro -**
 CGT-CGT-CCG-

Abbildung 3.4: Aminosäure- und cDNA-Sequenz des humanen Angiogenins (Strydom et al. 1985, Kurachi et al. 1985)

Eingerahmt sind diejenigen drei Aminosäuren, die im aktiven Zentrum unmittelbar für die RNaseaktivität verantwortlich sind (His-13, Lys-40, His-114). Die drei Disulfidbrücken werden jeweils von Cys-26 mit Cys-81, von Cys-40 mit Cys-92 und von Cys-57 mit Cys-107 gebildet. Gln-1 kommt als Pyroglutamin vor.

oder zumindest in einem Beitrag zur Reparatur von beschädigten Blutgefäßen besteht. In diesen Zusammenhang wird auch das ständige Vorhandensein von Angiogenin im Blutstrom sowie das Hochregulieren seiner Konzentration im Entzündungsfall (Akutphasenprotein zweiter Klasse) eingeordnet (Verselis et al. 1999). Dennoch gibt die Tatsache, dass Angiogenin außer von Leberzellen auch von einer Vielzahl anderer Zellarten synthetisiert wird, Anlass zur Vermutung, dass Angiogenin noch eine ganz andere Rolle im Körper spielt (Moenner et al. 1994). Dies wird auch durch degranulationsinhibierende Eigenschaften, deren *in vivo*-Relevanz inzwischen nachgewiesen ist (Oberpichler 1999), unterstützt. Auch die Tatsache, dass die Angiogeninkonzentration im Blutplasma im Laufe des Lebens zunimmt, lässt eine über die Angiogenese hinausgehende Funktion vermuten (Malamitsi-Puchner et al. 1999).

3.2 Das LexA Yeast Two-Hybrid System

Das Yeast Two-Hybrid System ist ein seit elf Jahren bekanntes und oft mit Erfolg angewendetes Verfahren, um die Interaktion zweier Proteine zu bestätigen bzw. um zu einem bekannten Protein Bindungspartner zu finden. Das Besondere ist, daß die Interaktion zweier Proteine innerhalb einer Hefezelle untersucht wird. Die Hefezelle wird veranlasst, die beiden Proteine zu exprimieren. Interagieren diese Proteine dann miteinander, erlangt die Hefezelle zusätzliche Eigenschaften, wodurch die Interaktion detektiert werden kann (Bartel et al. 1993a, Clontech, User Manual PT3040-1).

Verwendet wird der Stamm EGY48 der Gattung *Saccharomyces cerevisiae*. Er kann die Aminosäuren Histidin, Tryptophan und Leucin nicht selbst herstellen. Außerdem braucht er Uracil. Die Fähigkeit diese Substanzen selbst synthetisieren zu können, erlangt er durch Aufnahme dreier Expressionsvektoren.

- p8oplacZ: Uracilsynthese
- pEG202: Histidinsynthese
- pB42AD: Tryptophansynthese
- Interaktion: Leucinsynthese

pEG202 ist der Expressionsvektor, in den man die cDNA des „Baits“, also die Angiogenin-cDNA, inkloniert. EGY48 exprimiert dann ein Hybrid aus LexA und Angiogenin. pB42AD enthält die cDNA des möglichen Angiogenin-Interaktors. Der Interakteur sitzt am C-Terminus eines Expressionaktivatorproteins (B42).

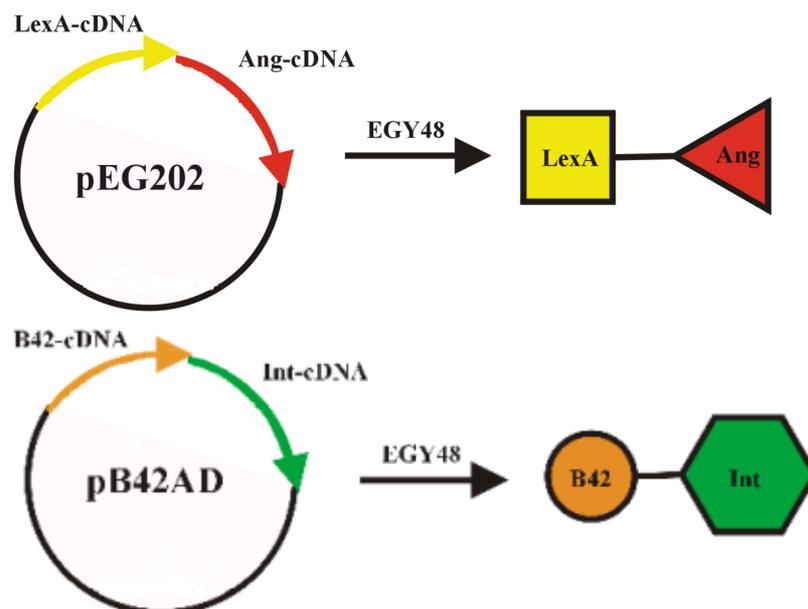


Abbildung 3.5: Die Vektoren pEG202 und pB42AD bewirken in EGY48 die Expression von LexA und B42 bzw. die Hybride LexA-Ang und B42-Int, wenn die entsprechenden cDNAs inkloniert sind.

Kommt es zur Interaktion, so wird im Hefegenom die Expression des LEU2-Gens aktiviert, so daß letztlich Leucin synthetisiert werden kann. Außerdem wird die Expression des lacZ Gens auf dem p8oplacZ-Vektors aktiviert. Die Hefe exprimiert daraufhin β -Galactosidase. In X-Gal-haltigem Medium wird durch Spaltung des X-Gals eine Blaufärbung erreicht.

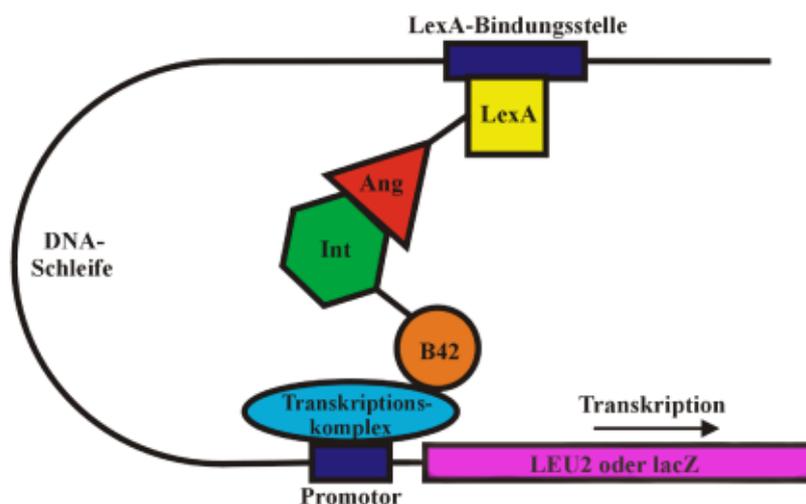


Abbildung 3.6: Darstellung des Prinzips des LexA Two-Hybrid Systems. Durch Bindung des Interaktors (Int) an Angiogenin wird B42 in räumliche Nähe zum Transkriptionskomplex gebracht. B42 induziert daraufhin die Transkription des LEU2- bzw. lacZ-Gens. Frei in Lösung ist weder B42 noch das B42-Hybrid in der Lage als Transkriptionsaktivator zu wirken.

Für die Expression des B42-Hybrids ist aufgrund der Verwendung des induzierbaren Gal1-Promotors Galactose als Kohlenstoffquelle erforderlich, Glucose reprimiert diesen Promotor.

3.2.1 Vor- und Nachteile des Two-hybrid Systems

Die Proteine, deren Wechselwirkung getestet wird, existieren während des Tests nur innerhalb einer Hefezelle. Es wird immer nur mit den cDNAs der Proteine gearbeitet, und es ist nicht erforderlich, sich mit den Schwierigkeiten des proteinchemischen Arbeitens auseinander zu setzen. Da es viel einfacher ist, cDNAs zu sequenzieren als Aminosäuresequenzen, ist auch die Identifizierung der Proteine vergleichsweise unproblematisch.

Probleme können allerdings entstehen, wenn die potenziellen Interaktionspartner extrazelluläre Proteine sind. Das Two-Hybrid System detektiert Proteininteraktionen im Cytosol einer Hefezelle. Das Cytosol ist ein reduzierendes Milieu, so dass dort keine stabilen Disulfidbrücken gebildet werden können. Außerdem werden cytosolische Proteine nicht glykosyliert. Da ex-

trazelluläre Proteine aber oft Disulfidbrücken haben und glykosyliert sind, werden sie im Cytosol der Hefe nicht korrekt gefaltet sein. Dadurch besteht die Gefahr, dass artifizielle Interaktionen beobachtet werden, die keinerlei biologische Relevanz haben. Dies wird offensichtlich, wenn die als interagierend beobachteten Proteine im Körper niemals im selben Kompartiment vorkommen (Fields et al. 1994). Aber ungeachtet dieses Umstandes ist das Yeast Two-hybrid System schon mit Erfolg mit extrazellulären Proteinen angewendet worden (Zhu et al. 1997, McQuibban et al. 1999).

Proteininteraktionen, die spezielle Co-Faktoren benötigen wird das Two-Hybrid System ebensowenig detektieren, wie Interaktionen, die posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren in einem Interaktionspartner voraussetzen. Ein grundsätzliches, allerdings unvermeidbares Problem liegt in der Beeinflussung der Proteininteraktion durch die LexA- bzw. B42-Domäne. Diese können die mit ihnen verknüpften Proteine so ungünstig abschirmen, dass es zu keiner Interaktion kommt, obwohl sie bei den freien Proteinen stattfinden würde (Fields et al. 1994).

Ein Aspekt des Two-Hybrid Systems, der allerdings sowohl als Vor- wie auch als Nachteil betrachtet werden kann, ist die hohe Detektionsempfindlichkeit. Das Detektionssignal wird in der Hefezelle über zwei Stufen verstärkt. Eine Proteininteraktion bewirkt zunächst die Transkription vieler Detektionsproteine (z.B. β -Galactosidase), die ihrerseits viele Substratmoleküle umsetzen. Die so erreichte hohe Empfindlichkeit begünstigt aber auch das Auftreten von „Fehlsignalen“ (falsch positive Klone).

3.2.2 Falsch positive Klone im Two-Hybrid System

Die Anwendung des Two-hybrid Systems ist besonders beim Durchsuchen einer cDNA-Bank problematisch, da oft sog. falsch positive Klone gefunden

werden. Solche Klone können zwar auf Leucinmangelmedium wachsen und zeigen sogar auf X-Gal-Medium Blaufärbung, dies ist aber keine Folge einer intrazellulären Proteininteraktion. Als Ursache für das Auftreten solcher falsch positiven Klone sind verschiedene Ursachen in der Diskussion (Bartel et al. 1993a + 1993b, Serebrijskij et al. 2000).

- Die cDNA im pB42AD kodiert für einen kompletten Transkriptionsaktivator. Denkbar ist auch, dass die cDNA für ein DNA-bindendes Protein codiert, so dass letztlich auch ein funktionsfähiger Transkriptionsaktivator entsteht. Solche falsch positiven Klone lassen sich leicht entdecken, da EGY48 auch dann auf Leucinmangelmedium wachsen kann, wenn er nur mit dem pB42AD transfiziert ist.
- In der Regel hat man es mit einem viel schwierigerem Fall zu tun: EGY48 muss zwar sowohl mit pEG202/Ang und zugleich pB42AD/y transfiziert sein, um auf Leucinmangelmedium wachsen zu können, dennoch liegt keine „reguläre“ Interaktion vor. Ein solcher Fall wird aber nur dann offenbar, wenn man EGY48 statt mit pEG202/Ang mit irgendeinem anderen pEG202/x transfiziert. Kommt es auch dann zu Wachstum auf Leucinmangelmedium, so wird der Interakteur als falsch positiv angesehen, da keine Spezifität für Angiogenin vorliegt. Eine einfache Erklärung dafür wäre, dass der Interakteur gar nicht mit Angiogenin wechselwirkt sondern direkt an die LexA-Domäne des Hybrids bindet. Denkbar wäre auch, dass das Transaktivatorhybrid ein schwaches Autoaktivierungspotential des LexA-Hybrids verstärkt (Serebrijskij et al. 2000). Es ist auch ein Einfluss der verwendeten Promotorsequenz vor der LEU2- bzw. lacZ-cDNA festgestellt worden. Falsch positive Interakteure treten danach nur in Verbindung mit jeweils einer ganz bestimmten Promotersequenz auf, während bei Verwendung

einer anderen Sequenz die falsch positive Interaktion nicht angezeigt wird. Die Erklärung für dieses Phänomen ist nicht sehr durchsichtig: Es wird davon ausgegangen, dass das vom pB42AD/y kodierte Interakteur-Aktivator-Hybrid direkt an den Promotor bindet (oder an dort gebundene Proteine), wobei für eine stabile Bindung allerdings die Anwesenheit des LexA-Hybrids erforderlich ist. Zur Vorbeugung gegen diese Art von falsch positiven Interaktionen werden im EGY48 zwei verschiedene Promotorsequenzen verwendet: Die LEU2-Expression wird vom LEU2-Promotor kontrolliert, während die lacZ-Expression durch den galactoseinduzierbaren Gal1-Promotor kontrolliert wird. Klone, die auf Leucinmangelmedium wachsen aber keine lacZ-Aktivität zeigen, müssen daher falsch positive Klone sein.

- Serebrijskii et al. (2000) beobachteten, dass einige falsch positive Interakteure bei Hefezellen eine erhöhte Zellmembranpermeabilität verursachten oder ihr Wachstumsverhalten änderten. Sie vermuten daher, dass ein Grund für das Auftreten von falsch positiven Klonen in einem schädlichem Eingreifen der Hybride in den Hefestoffwechsel bestehen könnte.
- Von falsch positiven Interakteuren wird auch dann gesprochen, wenn die beobachtete Interaktion zwar „regulär“ ist aber offensichtlich keine biologische Bedeutung haben kann, da sich die Proteine im Körper nie begegnen können (Fields et al. 1994). Als Ursache werden hier „klebrige“ Bereiche in den Proteinen vermutet (Serebrijskii et al. 2000). Solche Bereiche sind vor allem ausgedehnte hydrophobe Regionen, die zu unspezifischen Wechselwirkungen führen. Oder die Interaktion ist schlicht elektrostatischer Natur, einfach weil die Proteine stark entgegengesetzt geladen sind.

4 Zielsetzung

Angiogenin ist seit seiner Entdeckung vor sechzehn Jahren intensiv untersucht worden, dennoch gibt es hinsichtlich wichtiger Eigenschaften noch viele ungeklärte Fragen. Eine Beteiligung an angiogenetischen Prozessen scheint zwar zweifelsfrei, dennoch gibt es Anlass zur Vermutung, dass es noch eine gänzlich andere Aufgabe im Körper erfüllt, die mit Angiogenese nichts zu tun hat.

Angiogenin regt Endothelzellen, glatte Muskelzellen sowie PMNL zu unterschiedlichen Verhaltensweisen an. Eine Bindung an diese Zellen ist nachgewiesen worden, so dass man in allen Fällen einen Rezeptor vermutet, der die Wirkung des Angiogenins vermittelt (Hu et al. 1997a, Hatzi et al. 1999).

Im Falle von Endothelzellen konnte zunächst membranassoziiertes Actin als Interaktionspartner festgestellt werden, jedoch ist auch ein bislang nicht näher definiertes 170 kD Protein in der Diskussion. Auf glatten Muskelzellen wurden sogar sieben verschiedene Bindungspartner (45 bis zu 260 kD) lokalisiert aber nicht näher charakterisiert. Hinsichtlich der PMNL gibt es außer des Bindungsnachweises gar keine weiteren Informationen bezüglich eines Bindungsproteins.

In dieser Arbeit geht es darum, über ein Durchsuchen einer cDNA-Bank aus fetaler Leber wie aus Plazenta mit Hilfe des Yeast LexA Two-Hybrid Systems neue Interaktionspartner für Angiogenin zu finden. Damit ist natürlich die Hoffnung verbunden, einen bereits bekannten Rezeptor oder ein bislang unbekanntes Protein zu finden, aus deren Primärstruktur abgeleitet werden kann, dass es eine Rezeptorfunktion erfüllen könnte.

5 Materialien

5.1 Proteine, Enzyme, Nucleotide, ...

AP	Boehringer Mannheim
Ampli-Taq-Polymerase	Perkin Elmer
Ang	rekombinant aus <i>E.coli</i> , Universität Bielefeld
BSA	Biomol
Carrier-DNA (hering testis)	Clontech
Deep Vent Polymerase	New England Biolabs
dNTPs	GibcoBRL
HPRO	Boehringer
hPRI	Calbiochem
IGFBP1	Calbiochem
EGFR	Sigma
Fibronectin	Universität Bielefeld
Lysozym	Sigma
Master-Taq-Polymerase	Eppendorf
NHS-aktivierte Sepharose	Pharmacia
Pfu-Polymerase	Promega
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase A	Sigma
T4-Ligase	Promega
Zymolyase (80 U/mg)	ICN

5.2 cDNA-Banken

humane fetale Leber-cDNA-Bank in pB42AD Clontech
($2 \cdot 10^{10}$ Klone/ml, $3,5 \cdot 10^6$ unabhängige Klone)

humane Plazenta-cDNA-Bank in pB42AD Clontech
($4 \cdot 10^{10}$ Klone/ml, $3, 2 \cdot 10^6$ unabhängige Klone)

5.3 Antikörper

mouse Anti-LexA-mAb Clontech
rabbit Anti-human-IgG-pAb Universität Bielefeld
goat Anti-mouse-IgG-AP-Konjugat Sigma
Anti-human-IgG-HPRO-Konjugat Universität Bielefeld
Anti-human-IgG-Ang-Konjugat Universität Bielefeld

5.4 Standards

LMW-Marker Pharmacia
1kb-Leiter Gibco BRL

5.5 Vektoren

pEG202 Christoph Arkona, Universität Jena
pEG202/GelB Christoph Arkona, Universität Jena
pEG202/TIMP1 Bernd Stratmann, Universität Bielefeld
pEG202/TIMP4 Bernd Stratmann, Universität Bielefeld

5.6 Genotyp der Mikroorganismen

EGY48 $MAT\alpha$, his3, trp1, ura3, LexA_{op(x6)}-LEU2
KC8 hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463,
lac Δ X74, strA, galU, K

EGY48 und KC8 wurden von Clontech bezogen.

5.7 Chemikalien-Kits

Nucleo Spin Plasmid Purification Kit	Macherey/Nagel
Nucleo Spin Gel Extraction Kit	Macherey/Nagel
TA Cloning Kit	Invitrogen

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Kultivierung von *E. coli*-Zellen, Plasmidpräparationen (Alkalische Lyse), Restriktionen, Klonierungen von cDNAs, Transfection von *E. coli*-Zellen, Plasmidaufreinigungen (PEG-Fällung, CsCl-Dichtegradientenzentrifugation), Agarosegelelektrophorese usw. wurden mit allenfalls geringen Abwandlungen nach den Angaben im Buch „Molecular Cloning“ (1989) durchgeführt. Mutationen wurden wie bei C. Mülhardt (1999) beschrieben vorgenommen. Bei Klonierungen wurde gelegentlich auf das TOPO-Cloning Kit von Invitrogen zurückgegriffen. Plasmidpräparationen und Gelextraktionen wurden auch unter Benutzung des Nucleo Spin Kits von Macherey/Nagel durchgeführt.

6.1.1 Amplifizieren und Reinigung der cDNA-Banken

Die cDNA-Banken werden von Clontech in Form von *E. coli* Suspensionen geliefert. Das Lysieren der Bakterien in diesen Kulturen würde nur zu einer sehr geringen Menge an pB42AD-Plasmiden führen, die für die nachfolgende Transformation in *S. cerevisiae* Zellen nicht ausreichen würde. Deshalb ist es erforderlich, die *E. coli* cDNA-Bank zu amplifizieren. Dies bedeutet, daß man die Bakterien stark vermehrt. Mit der Suspension wird aber kein LB-Medium angeimpft, denn dies würde dazu führen, daß sich die *E. coli*-cDNA Bank ungleichmäßig amplifiziert: Um ungleichmäßiges Wachstum zu vermeiden, werden die Zellen auf LB-Ampicillin-Nährböden (Durchmesser 13,5 cm) ausplattiert. Pro Platte werden ca. 55000 Zellen verteilt. Damit die cDNA-Bank dabei ihre Repräsentativität behält, wird insgesamt die 2-3fache Menge an unabhängigen Klonen ausplattiert. Im Falle der fetalen Leber-cDNA-Bank

wurde auf 130 Platten ausplattiert (insgesamt ca. 7 Millionen Klone), im Falle der Plazentabank wurden 170 Platten benutzt (insgesamt 9 Millionen Klone).

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden die Klone abgeschabt und in LB-Medium zusammengegeben. Aus dieser Suspension werden die Plasmide durch Alkalische Lyse isoliert und durch PEG-Fällung oder CsCl-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt (s. 6.1).

6.2 Proteinchemische Arbeitsmethoden

SDS-PAGE, Western-Blotting, ELISA-Assays, Silber- bzw. Coomassiefärbung von Proteinen wurden wie in gängiger Literatur beschrieben durchgeführt (Kemmeny 1994, Lämmler 1970, Rehm 1997, Schägger et al. 1987).

6.2.1 Kopplung von Angiogenin an NHS-Sepharose

Benutzt wurden NHS-Sepharose der Firma Pharmacia. Die Kopplung von Angiogenin an die Sepharose wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Angiogenin (rekombinant aus E.coli) lag als eine Lösung von 10 mg/ml im Kopplungspuffer (200 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3) vor.

6.2.2 Konjugation von Angiogenin bzw. Angiogenin-Antikörpern mit HRPO oder AP

Die Konjugation von Angiogenin bzw. dem Angiogenin-Antikörper an AP wurde gemäß einer Vorschrift von D.M. Kemeny (1999), die Konjugation von Angiogenin-Antikörper an HRPO nach einer Vorschrift von Tijssen und Kurtak (1984) durchgeführt.

6.2.3 ELISA-Bindungstest

Die potenziellen Angiogenin-Interakteure werden in einige Gefäße einer 96-well Mikrotiterplatten (NUNC) aufgebracht („coating“). Nach Absättigen aller unspezifischen Bindungsstellen mit PBST/BSA (900 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 2% BSA, pH 7,3), wird Angiogenin zugegeben und nicht gebundenes Angiogenin durch Waschen entfernt (Beschichtungspuffer: 50 mM Natriumcarbonat, pH 9,6; Waschpuffer: PBST). Der Nachweis von eventuell gebundenem Angiogenin erfolgt durch ein Angiogenin-Antikörper-HRPO-Konjugat (s.6.2.2). Die Farbreaktion findet in Citratpuffer (16,7 mM Citronensäure, 22,5 mM Na₂HPO₄, 0,04% Tween 20, pH 4.2) mit ABTS und Wasserstoffperoxid statt.

6.2.4 Interaktionstest mit Ang-Sepharose

Der Interakteur (hPRI: 50 U, Ang-AK: 2,5 µg, IGFBP1: 400 ng, EGFR: 600 ng) wird in 125 µl PBS-Puffer (50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4) gelöst und ca. 30 µl Ang-Sepharose-Suspension (s. 6.2.1) in PBS-Puffer hinzugegeben. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht unter Schütteln wird die Sepharose abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Sepharose dreimal kurz mit 125 µl PBS-Puffer gewaschen. Zum Schluß wird die Sepharose 1-2 h mit 40 µl 3 M Ammoniumacetatlösung behandelt, um einen möglicherweise gebundenen Interakteur wiederabzulösen. Mittels SDS-PAGE (s. 6.2) wird versucht nachzuweisen, ob sich ein Interakteur von der Sepharose abgelöst hat und gleichzeitig, ob sich die Interakteurkonzentration im PBS-Puffer vermindert hat. Außerdem wird hier überprüft, ob sich in den PBS-Waschpuffern bereits Interakteur befindet. Die SDS-Gelelektrophorese wird unter nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt.

6.2.5 Interaktionstest mit Ang-AP- bzw. Ang-AK-AP-Konjugat

Die Interakteure (hPRI: 200 U, Ang-AK: 2,5 μ g, IGFBP1: 800 ng, EGFR: 600 ng) werden in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch ElektrobloTTing auf eine PVDF-Membran übertragen (s. 6.2). Die Membran wird in TBST-BSA-Puffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,1% Tween, 2% BSA, pH 7,5) blockiert und in TBST-BSA-Puffer, dem das Konjugat (s. 6.2.2) zugesetzt ist, inkubiert. Anschließend wird gebundenes Konjugat durch eine Farbreaktion mit BCIP/NBT in AP-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) nachgewiesen.

6.3 LexA Two-Hybrid-System

Alle im folgenden beschriebenen Verfahren sind abgewandelte Vorschriften aus Handbüchern von Clontech (Matchmaker LexA Two-Hybrid System (User Manual PT3040-1), Yeast Protocols Handbook (PT3024-1)).

6.3.1 Kultivierungsmedien

Alle im Two-Hybrid System verwendeten Kultivierungsmedien sind sehr ähnlich zusammengesetzt: Sie enthalten stets eine Aminosäuremischung, wobei Histidin (h), Tryptophan (trp) und Leucin (l) fehlen können, oft eine Kohlenstoffquelle, eine Vitamin-Mineralstoffmischung (YNB) und gelegentlich einige Zusätze. Sie werden in dieser Arbeit nach einem Schema benannt:

Kohlenstoffquelle Komponente₁⁻, Komponente₂⁻, ... Zusätze

Nach der Kohlenstoffquelle werden alle Komponenten genannt, die im Medium nicht vorhanden sind. Am Ende werden Zusätze aufgeführt (z.B. Antibiotika).

Alle Medien werden aus autoklavierten Stammlösungen hergestellt.

- $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}YNB^{-}$ (10x): 1% (m/v) AS-Pulver-Lösung, pH 7
- Glu (10x): 20% (m/v) Glucoselösung
- Gal/Raf (10x): 20% (m/v) Galactose, 20% (m/v) Raffinose
- YNB (20x): für 1000 ml: 2,5 g K_2HPO_4 , 17,6 g KH_2PO_4 , 10 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g NaCl, 2 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 99,7 g $(NH_4)_2SO_4$, 200 mg Vitamin-Mineralstoff-Mix, pH 5,3 (nicht einstellen)
- BU (10x): 500 mM Phosphatpuffer, pH 7
- His (200x): 0,4% (m/v) Histidin
- Trp (200x): 0,2% (m/v) Tryptophan
- Ura (100x): 0,2% (m/v) Uracil
- Leu (10x) : 0,1% (m/v) Leucin
- kan (350x): 2% (m/v) wässrige Kanamycinlösung
- amp (1000x) : 20% (m/v) Ampicillin in 70%igem Ethanol
- M9 (10x): 477 mM Na_2PO_4 , 221 mM KH_2PO_4 , 85 mM NaCl, 18,5 mM NH_4Cl , pH 7
- X-Gal (250x): 2% (m/v) X-Gal in DMF
- Thi (1000x): 1M Lösung vom Thiaminhydrochlorid in Wasser

Die Zahlen in Klammern hinter der Bezeichnung des Mediums geben an, wieviel mal konzentrierter diese Stammlösung im Vergleich zur Konzentration in der gebrauchsfertigen Lösung ist.

AS-Pulver: 2,5 g Adenin, 1 g L-Arginin, 1,8 g L-Isoleucin, 1,8 g L-Lysin, 1,8 g L-Methionin, 3 g L-Phenylalanin, 12 g L-Threonin, 1,8 g L-Tyrosin, 9 g L-Valin

Vitamin-Mineralstoff-Mischung:

- Vitamin-Komponenten: 20 mg Biotin, 4 g Calciumpantothenat, 20 mg Folsäure, 20 g Inositol, 4 g Niacin, 2 g p-Aminobuttersäure, 4 g Pyridoxin HCl, 2 g Riboflavin, 4 g Thiamin HCl
- Mineralstoffkomponenten: 5 g Borsäure, 400 mg Kupfersulfat, 1 g Kaliumjodid, 2 g Eisen(II)chlorid, 4 g Mangansulfat, 2 g Natriummolybdat, 4 g Zinksulfat

Sind statt flüssiger Medien Agarmedien erforderlich, so benutzt man beim Verdünnen der Stammmedien nicht Wasser, sondern eine warme Lösung von 2%igem (m/v) Agar.

6.3.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* (EGY48)

Die Anzucht des EGY48 erfolgt bei 28-30°C in Schüttelkolben oder auf Agarnährböden. Je nachdem mit welchen Plasmiden der Stamm transfiziert worden ist, benutzt man Medien (s. 6.3.1), in denen die entsprechenden Aminosäuren fehlen:

EGY48[p8opLacZ]	Glu u ⁻
EGY48[p8opLacZ, pEG202]	Glu u ⁻ h ⁻
EGY48[p9opLacZ, pEG202, pB42AD]	Glu u ⁻ h ⁻ trp ⁻
Interaktionstest	Gal/Raf u ⁻ h ⁻ l ⁻ trp ⁻ BU X-Gal

Die Medien werden auch zum Anlegen von EGY48-Tiefkühlkulturen verwendet. Dabei wird eine EGY48-Suspension mit der gleichen Menge 87%igem (v/v) Glycerin vermischt.

6.3.3 Proteinpräparation aus EGY48

25 ml einer EGY48-Kultur mit einer OD(578) von 0,2 wird angesetzt (s. 6.3.2). Diese wird bis zu einer OD(578) von 0,6 - 0,8 bei 30°C unter Schütteln anwachsen gelassen (ca. 4 h). Die OD der Kultur multipliziert mit ihrem Volumens in ml sind die OD-Einheiten der Kultur. Dieser Wert ist für spätere Dosierungen wichtig. Die gesamte Kultur wird zentrifugiert (500-600 g, 5 min, 4°C). Das Pellet wird mit eiskaltem Wasser gewaschen und die Suspension erneut zentrifugiert. Das Pellet wird in wenig eiskaltem Wasser aufgenommen und in ein 1,5 ml Zentrifugengefäß pipettiert. Es folgt 2 min Zentrifugation mit 13000 g. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei -70° eingefroren. Pro 7,5 OD-Einheiten werden 100 μ l Cracking-Puffer (s.u.) zum Pellet gegeben und das Pellet darin resuspendiert. Dann gibt man die Suspension in ein neues 1,5 ml Zentrifugengefäß, in dem bereits pro 7,5 OD-Einheiten 80 μ l Glasperlen vorgelegt sind. Der Ansatz wird auf Eis gekühlt. Schließlich folgt das Aufschließen der Zellen durch intensives einminütiges Homogenisieren („vortexen“) der Mischung, wobei nach 30 s auf Eis gekühlt wird (30 s) bevor mit dem Homogenisieren fortgefahren wird. Nachdem 2 μ l PMSF-Lösung dazupipettiert worden sind, wird die Prozedur wiederholt. Anschließend wird 5 min bei 4°C mit 13000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und bei -70°C aufbewahrt. Um das Aufbrechen der Zellen zu vervollkommen, setzt man zum Ansatz 100 μ l Cracking-Puffer dazu, mischt gründlich und erhitzt alles für 5 min auf 100°C. Danach wird die Suspension auf Eis gekühlt. Es schließt sich erneut die oben beschriebene Prozedur des Zellauf-

schlusses an. Nachdem 5 min bei 4°C mit 13000 g zentrifugiert worden ist, wird der Überstand mit dem ersten Überstand vereint. Das Ergebnis ist eine Lösung, die einen Gehalt von 3-5 µg/ml Hefe-Protein hat.

Cracking-Puffer: 1 ml Cracking-Stamm-Puffer, 10 µl β-Mercaptoethanol, 50 µl 166mM PMSF-Lösung (Isopropanol), 50 µl 166 mM Pevabloc-Lösung (Wasser), 70 µl Zusatzinhibitorenmischung

Cracking-Stamm-Puffer: 8 M Harnstoff, 5% (m/v) SDS, 40 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 6,8

Zusatzinhibitorenmischung: 10µl Pepstatin A (1 mg/ml DMSO), 2 µl 10,5 mM Leupeptin, 73µl 200 mM Benzamidin, 9µl Aprotinin (4 mg/ml), 7µl 0,5 M EDTA

Glasperlen: Durchmesser 0,5 bis 1 mm, die Perlen wurden 30 min in rauchender Salpetersäure gekocht, gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet.

6.3.4 Gesamt-DNA-Präparation aus EGY48

Eine EGY48-Über-Nacht-Kultur wird angelegt (s. 6.3.2). 1 ml der Kultur wird zentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7) resuspendiert. Dann wird Zymolyaselösung (TE-Puffer) dazupipettiert, so dass eine Gesamtaktivität von 50-80 U in der Lösung vorhanden ist. Der Ansatz wird unter gelegentlichem Schütteln 2-3 h bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Schließlich werden 20 µl 20%ige SDS-Lösung und ca. 50 µl Glasperlen (s. 6.3.3) zugegeben. Es wird intensiv eine Minute „gevortext“. Die Suspension wird bei -20°C eingefroren, wieder aufgetaut und nochmals eine Minute „gevortext“. Nach Zusatz von 400µl TE-Puffer wird mit 13000 g zentrifugiert und der Überstand durch Phenolextraktion aufgereinigt. Die DNA wird mit Ethanol gefällt, getrocknet

und in 30 μ l Wasser aufgenommen (s. 6.1).

6.3.5 Transformation von EGY48

25 ml Kulturmedium werden mit einer frischen EGY48-Kultur angeimpft (s. 6.3.2). Die OD(578) der neuen Kultur sollte ca. 0,2 betragen. Es wird so lange unter Schütteln bei 30°C inkubiert bis die OD(578) zwischen 0,5 und 0,7 liegt. Die Zellen werden dann mit 750 g 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml Transformationspuffer A (100 mM LiOAc, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7) resuspendiert. Erneut wird zentrifugiert. Nun werden die Pellets in bis zu 500 μ l Transformationspuffer A resuspendiert. In einem 1,5 ml Zentrifugengefäß wird 5 μ l Plasmidlösung vorgelegt. Dann pipettiert man 50-100 μ l der Zellsuspension und 5 μ l DMSO dazu. Zum Schluß gibt man 300 μ l Transformationspuffer B (100 mM LiOAc, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 40% (m/v) PEG, pH 7) zum Ansatz und vermischt durch vorsichtiges Umschwenken. Es wird bei 30°C stehen gelassen, dann folgt ein 15-minütiger Hitzeschock im 42°C Wasserbad. Nach dem Abkühlen auf Eis (2 min) wird mit 550 g 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 100 μ l Wasser resuspendiert. Nach Ausplattieren auf Mangelmedium (s. 6.3.1) wird 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

6.3.6 Transformation von EGY48 mit cDNA-Banken

Um die Repräsentativität der cDNA-Bank in der Hefe zu gewährleisten, müssen die Transformationsausbeuten sehr hoch sein. Man arbeitet mit denaturiertem Heringssperma-DNA als Carrier DNA (s. 5.1) und mit großen Zellmengen.

50 ml Glu u⁻h⁻ werden mit EGY48[p8oplacZ, pEG202/Ang] angeimpft (s. 6.3.2). Es wird über Nacht bei 30°C unter Schütteln inkubiert bis die

Kultur stark angewachsen ist. Dann impft man mit dieser Kultur 150 ml Glu u⁻ h⁻ bis zu einer OD(578) von 0,2-0,3 an. Nach ca. 4 h Inkubation bei 30°C beträgt die OD(578) 0,5-0,7. 125 ml der Kultur werden dann mit 550 g 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 50 ml Wasser gewaschen und zum Schluß in 800 µl Transformationspuffer A (100 mM LiOAc, 10 mM Tris, 1mM EDTA) resuspendiert. Anschließend pipettiert man 25 µg Plasmid-DNA (gelöst in ca. 10 µl), 100 µl (=1000 µg) Carrier-DNA dazu und mischt. Nachdem 800 µl Transformationspuffer B (100 mM LiOAc, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 40% (m/v) PEG) hinzugegeben wurde, wird durch vorsichtiges Umschwenken vermischt und 30 min bei 30°C unter gelegentlichem Umschwenken inkubiert. Es werden 700 µl DMSO dazugemischt und der ganze Ansatz 15 min in ein 42°C heißes Wasserbad gestellt. Danach wird sofort 5 min auf Eis gekühlt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 550 g wird das Pellet in 1000 µl Wasser resuspendiert. In Portionen von 150 - 200 µl wird die Suspension auf Glu u⁻ h⁻ trp⁻-Nährböden (Durchmesser: 13,5 cm) ausplattiert. Die Platten werden bei 30°C inkubiert, wobei sich nach zwei Tagen Kolonien gebildet haben. Diese werden mit jeweils 200 µl Wasser von den Nährplatten abgelöst, heruntergeschabt und in einer Suspension vereinigt. Diese Suspension wird mit der gleichen Menge an Glycerinlösung (65% (v/v) Glycerin, 100 mM MgSO₄) versetzt, aliquotiert und bei -70° gelagert.

Transfektion von KC8 mit EGY48-Gesamt-DNA

Das besondere Problem bei der KC8 Transfection ist, dass die EGY48-Gesamt-DNA eine Mischung aus genomischer DNA, p8oplacZ, pEG202/Ang und pB42AD ist aber nur letzteres Plasmid von Interesse ist.

Für die Transfektion werden gängige Methoden angewendet (s. 6.1), wobei aber sorgfältig auf hohe Transformationsausbeuten geachtet werden muss, da

die genomische DNA die Transformationswahrscheinlichkeit stark herabsetzt.

Die Selektion der Transformanden erfolgt auf Glu trp⁻ YNB⁻ Thi M9 kan amp Nährböden (s. 6.3.1). Das Ampicillin tötet alle Zellen, die kein Plasmid enthalten. Dennoch können auf diesen Böden nur KC8-Zellen wachsen, die das pB42AD-Plasmid aufgenommen haben. KC8 ist für Tryptophan heterotroph und die Fähigkeit, Tryptophan selbst herstellen zu können, erlangen die Zellen nur durch das pB42AD-Plasmid.

6.3.7 Selbstaktivierungstest

Dieser Test dient dazu, herauszufinden, ob EGY48 allein durch pEG202/x ohne Anwesenheit von pB42AD/y befähigt ist, auf Leucinmangelmedium zu wachsen. In diesem Fall wäre das LexA-x-Hybrid ein Autoaktivator und für das Two-Hybrid System nicht verwendbar.

Der Selbstaktivierungstest wird durchgeführt, indem man EGY48[p8oplacZ, pEG202/x]-Zellen auf Nährplatten vereinzelt, denen Leucin fehlt, die aber als Kohlenstoffquelle Galactose/Raffinose enthalten (Gal/Raf u⁻h⁻l⁻). Zum Vergleich vereinzelt man Hefezellen auf Platten, die Leucin enthalten (Gal/Raf u⁻h⁻). Die EGY48-Zellen sollten auf den Leucinmangelplatten auch nach längerer Inkubation (ca. vier Tage) bei 30°C kein Wachstum zeigen, während sie auf den Vergleichsplatten natürlich stark wachsen sollten.

6.3.8 X-Gal-Test

Mit dem X-Gal-Test wird nach Angiogenin-Interakteuren gesucht.

EGY48[p8opLacZ, pEg202/Ang, pB42AD]-Zellen werden auf Gal/Raf u⁻h⁻l⁻trp⁻ BU X-Gal-Nährboden ausplattiert. Auf einen Nährboden mit 13 cm Durchmesser werden dabei ca. drei Millionen Zellen gegeben. Einige

Tausend davon wachsen nach ca. fünf Tagen als blaue oder weiße Kolonie auf dem Medium an, enthalten also laut Theorie einen (potenziellen) Angiogenin-Interakteur.

Einige wenige blaue Klone werden ausgewählt, in Flüssigkultur vermehrt und auf Gal/Raf $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ BU X-Gal Nährböden vereinzelt. Jeweils ein vereinzelter Klon wird wiederum in Flüssigmedium angezogen. Dann wird der Klon als Tiefkühlkultur gesichert (s. 6.3.2).

Bevor aus solchen Zellen die Gesamt-DNA isoliert wird (s. 6.3.4), wird der Klon mit dem Gal/Raf-Glu-Test überprüft (s. 6.3.9).

Bei positivem Ausgang werden *E.coli*-Zellen vom Stamm KC8 mit der gewonnenen DNA transfiziert (s. 6.3.6). Aus diesen Zellen lässt sich das pB42AD-Plasmid isolieren (s. 6.1).

6.3.9 Gal/Raf-Glu-Test

Der Gal/Raf-Glu-Test eignet sich zum Eliminieren von falsch positiven Interakteuren. Er beruht auf dem Umstand, dass eine durch Proteininteraktion hervorgerufene Leucin- bzw. β -Galactosidase-Expression in EGY48 durch Glucose unterdrückt wird, weil die Expression des B42-Hybrids durch Galactose induziert werden muss.

Der zu testende EGY48[p8oplacZ, pEG202/Ang, pB42AD/x]-Klon wird in Glu $u^{-}h^{-}trp^{-}$ -Medium angezogen und anschließend zum einen auf Gal/Raf $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ - zum anderen auf Glu $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ -Agarmedium vereinzelt. Wachsen die Hefezellen auch auf dem glucosehaltigen Medium, so kann die Fähigkeit, Leucin herstellen zu können, keine Folge der Proteininteraktion sein, denn sonst müsste die Repression von Glucose wirken. Es liegt demnach eine falsch positive Inreraktion vor.

6.3.10 Verlusttest

Der Verlusttest ermöglicht zu testen, ob das alleinige Vorhandensein von pB42AD/Interakteur-cDNA ausreicht, auf Leucinmangelmedium zu wachsen. Dazu wird EGY48[p8oplacZ, pEG202/Ang, pB42AD/y], zunächst in Glu u⁻trp⁻ Medium angezogen. Weil das Medium Histidin enthält, fehlt der Selektionsdruck für das pEG202/Ang-Plasmid. Einige Zellen werden es also verlieren: Beim Wachstum über Nacht sind das ca. 10% der Zellen. Anschließend macht man mit der Zellsuspension einen Vereinzelausstrich auf Glu u⁻trp⁻ Nährplatten. Um herauszufinden, welche der sich zeigenden Klone das pEG202/Ang-Plasmid verloren haben, überträgt man einen Klon jeweils auf Glu u⁻trp⁻- und zugleich auf Glu u⁻h⁻trp⁻-Platten. Solche Klone, die auf letzterer Platte nicht wachsen, enthalten kein pEG202/Ang-Plasmid mehr. Sie werden wiederum auf Gal/Raf u⁻l⁻trp⁻-XGal-Platten übertragen, wo sie nicht anwachsen dürfen, sonst liegt Autoaktivierung durch das pB42AD/y-cDNA-Plasmid vor.

6.3.11 ONPG-Test

Der ONPG-Test erlaubt eine Quantifizierung der Interaktionsintensität, die im Two-Hybrid System beobachtet wird. Der Test beruht auf der Hydrolyse des ONPGs durch β -Galactosidase, wobei ein gelber Farbstoff entsteht (Clontech, Yeast Protocols Handbook PT3024-1) .

EGY48[p8opLacZ,pEG202/Ang, pB42AD/y]-Zellen werden in Gal/Raf u⁻h⁻l⁻trp⁻-Medium suspendiert, so dass sich eine OD(600) von 0,3 ergibt. Anschließend wird bei 30°C unter Schütteln inkubiert bis sich nach ca. 8-10 h eine OD(600) von 0,5 - 0,8 entwickelt hat, dann muss die exakte OD(600) bestimmt werden. Kulturen mit OD(600)-Werten von über 0,8 werden durch Verdünnen in den Bereich von 0,5 - 0,8 gebracht. Solche mit OD(600)-Werten

von über 1 werden für den Test nicht verwendet.

Zuerst setzt man eine Lösung von 4 mg/ml ONPG in Z-Puffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , pH 7,0) an. Das ONPG braucht ca. 30 min, um sich unter heftigem Vortexen zu lösen. Die Lösung muss frisch angesetzt werden, da sich ONPG in Lösung langsam zersetzt. Ein Milliliter einer Kultur (V_0) wird in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 13000 g 30 s zentrifugiert. 800 μl des Überstands werden verworfen. Nach Zugabe von 1000 μl eiskaltem Z-Puffer wird das Pellet resuspendiert. Es wird erneut zentrifugiert und danach soviel Überstand verworfen, dass ein Rest von $V_{\text{Rest}} = 400 - 500 \mu\text{l}$ im Gefäß verbleibt. Das vollständige Entfernen des Überstands wird vermieden, um einen Verlust an Zellpellet zu verhindern. Das Zellpellet wird im Restvolumen resuspendiert, welches exakt bestimmt werden muß. Dann wird ein frisches Zentrifugenröhrchen mit 100 μl der Suspension befüllt. Nun folgt das Aufbrechen der Hefezellen in flüssigem Stickstoff. Das Zentrifugengefäß wird insgesamt fünfmal für 30 s in flüssigen Stickstoff anschließend für 30 s in ein 37°C warmes Wasserbad getaucht. Danach gibt man 700 μl Z-Puffer, dem jetzt 0,27% (v/v) β -Mercaptoethanol zugesetzt sein muss, in das Gefäß. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 160 μl der ONPG-Lösung gestartet, wobei die Reaktionszeit gemessen werden muss. Das Zentrifugenröhrchen wird bei 30°C inkubiert. Es beginnt sich eine Gelbfärbung zu entwickeln, die zwischen 10 min und weit über 60 min mit dem Auge wahrgenommen werden kann. Die Reaktion wird durch Zugabe von 400 μl einer 1M Natriumcarbonatlösung abgestoppt, dabei kommt es zu einer Farbvertiefung. Die Lösung wird mit 13000 g 10 min zentrifugiert, um die Zellen abzutrennen. Schließlich werden 1000 μl des Überstandes in eine Küvette gefüllt und die OD bei 420 nm bestimmt. Liegt der Wert über 0,8, so wird die Messung wiederholt, da dies außerhalb des linearen Bereichs

des Verfahrens liegt.

Aus den gemessenen Werten lassen sich sog. β -Galactosidase-Einheiten (U) berechnen:

$$U = 1000 \cdot \frac{OD(420)}{OD(600)} \cdot \frac{V_{\text{Rest}}}{t \cdot 0,1\text{ml} \cdot V_0}$$

t ist die gemessene Reaktionszeit in min. 0,1 ml ist das EGY48-Suspensionsvolumen, in dem die Zellen aufgebrochen wurde.

Der Fehler bei dieser Messung ist erheblich. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass es schwierig ist, exakte Messwerte für OD(600), also das Maß für die Suspensionsdichte, zu erhalten. Der Fehler liegt hier bei 10 - 20 %. Letztlich sind die Werte von U mit einem Fehler bis zu 50 % behaftet.

7 Ergebnisse

7.1 Klonierungen

Für die Arbeit mit dem Two-Hybrid-System war es zunächst erforderlich, die Angiogenin-cDNA in den Vektor pEG202 einzuklonieren (s. 6.1). Dies geschah durch Amplifizierung der cDNA mit spezifischen Primern. Das Amplifikat und der Vektor wurden dann über die *EcoRI*-Schnittstelle und die *SalI*-Schnittstelle ligiert. Außerdem wurde die Angiogenin-cDNA aber auch unter Benutzung der *NotI*-Schnittstelle inkloniert. Dies hat beim exprimierten Hybrid einen veränderten Abstand von LexA und Angiogenin zur Folge. Während die beiden Proteine bei der *EcoRI/SalI*-Klonierung nur durch zwei Aminosäuren voneinander getrennt werden, sind dies bei der *NotI/NotI*-Klonierung dreizehn.

In nachfolgender Tabelle sind die verwendeten Primer aufgeführt:

<i>EcoRI/SalI</i> -Klonierung: pEG202/Ang(<i>Eco/Sal</i>)	
THS-Angfor	GAA TTC CAG GAT AAC TCC AGG TAC ACA
THS-Angrev	GTC GAC TTA CGG ACG ACG GAA AAT TGA CTG
<i>NotI/NotI</i> -Klonierung: pEG202/Ang (<i>Not/Not</i>)	
NotAngfor	AAA AAA GCG GCC GCG GAT CCA GGA TAA CTC CAG G
NotAngrev	AAA AAA GCG GCC GCT TAC GGA CGA CGG AAA ATT G

Tabelle 7.1: Klonierungsprimer

Darüberhinaus wurden in die Ang-cDNA Mutationen eingeführt. Zum einen wurde die Aminosäure Arginin 66 durch Alanin ausgetauscht (R66A), zum anderen wurde die Aminosäure Histidin 84 in Serin mutiert (H84S). Die verwendeten Mutationsprimer lauten:

R66Afor	GGA AAC CCT CAC GCA GAA AAC CTA AGA
R66Arev	TCT TAG GTT TTC TGC GTG AGG GTT TCC
H84Sfor	y CTT GCA AGC TAT CCG GAG GTT CCC
H84Srev	GGG AAC CTC CGG ATA GCT TGC AAG

Tabelle 7.2: Mutationsprimer

Die Amplifizierungsprimer waren bei beiden Mutanten die Primer pB42ADseqfor und pB42ADseqrev (s. 7.2). Als Template für die Mutations-PCR wurde das pEG202/Ang (*NotI/NotI*) Konstrukt verwendet.

Die Mutation R66A betrifft die Bindungsstelle des Angiogenins an Endothelzellen und führt zu einer Angiogeninmutante, die nicht mehr in der Lage ist, Angiogenese zu induzieren. Die H84S Mutation betrifft die Bindungsstelle an PMNL.

Die korrekte, mutationsfreie Einklonierung der Amplifikate in den pEG202 wurde durch Sequenzierung überprüft.

7.2 DNA-Sequenzierungen

Um die Sequenzen der in pEG202 bzw. pB42AB einklonierten cDNAs zu bestimmen, kamen folgende Primer zum Einsatz:

Name	Sequenz	Δ
pEG202seqfor	CGT TGA CCT TCG TCA GCA GAG C	51
pEG202seqrev	CAT AAA TCA TAA GAA ATT CGC CCG G	17
pB42ADseqfor	CCA GCC TCT TGC TGA GTG GAG ATG	38
pB42ADseqrev	GGC AAG GTA GAC AAG CCG ACA ACC	46

Tabelle 7.3: Sequenzierungsprimer, Δ ist der Abstand in Basen zwischen MCS und angelagertem Primer.

Die Sequenzierungen des pB42AD ergaben folgendes Bild: Die cDNA-Sequenzen sind in den pB42AD mit *EcoRI/XhoI* einkloniert worden. Am

5'-Ende befindet sich hinter der *EcoRI*-Schnittstelle noch die Sequenz GCG-GCCGCGTCGACC, welche eine *NotI*- und eine *SalI*-Schnittstelle beinhaltet. Erst danach folgt die erste Base der Interakteur-cDNA. Übersetzt man die cDNA-Sequenz in eine Aminosäuresequenz, so geht der ersten Aminosäure des Interakteurs immer die Sequenz EFAAAST voraus. Am 3'-Ende liegt vor der *XhoI*-Schnittstelle eine Sequenz aus achtzehn Adeninen.

Fast alle Sequenzen wurden lediglich bis zu einer Leseweite von ca. 600 Basenpaaren bestimmt.

7.3 Überprüfung der Konstrukte auf ihre Tauglichkeit im Two-Hybrid-System

Mit den Plasmiden pEG202/Ang wurden *S.cerevisiae* Zellen (EGY48) transfiziert (s. 6.3.5). Nun musste zum einen überprüft werden, ob das LexA-Angiogenin-Hybrid tatsächlich exprimiert wird, zum anderen, ob das Hybrid ein Autoaktivator ist. Ein Autoaktivator ist ein LexA-Hybrid, der die Hefezellen ohne Anwesenheit eines B42-Interakteur-Hybrids auf Leucinmangelmedium zum Wachstum anregen kann. Diese Tests wurden auch mit drei weiteren Konstrukten durchgeführt, die zu Testzwecken zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich um die Progelatinase B-cDNA, die TIMP1-cDNA sowie die TIMP4-cDNA einkloniert in pEG202 (s. 5.5).

7.3.1 Selbstaktivierungstest

Die LexA-Ang-, LexA-TIMP1- und LexA-TIMP4-Hybride zeigten keinerlei Selbstaktivierung (s. 6.3.7), während das LexA-GelB-Hybrid ein ganz schwacher Autoaktivator zu sein scheint. Die entsprechenden EGY48-Zellen zeigten auf Glu u⁻h⁻l⁻-Nährboden leichtes Wachstum nach vier Tagen Inkubation.

7.3.2 Expressionstest

Der Nachweis des Hybrid wurde mittels Western-Blotting (s. 6.2) durchgeführt, wobei ein muriner, monoklonaler Antikörper zum Einsatz kam, der gegen ein Epitop des LexA gerichtet ist (s. 5.3). Die Hefezellen wurden aufgeschlossen (s. 6.3.3), der erhaltene Zellextrakt mit SDS-PAGE aufgetrennt und mittels „Blotting“ auf eine PVDF-Membran übergeführt (s. 6.2). Schließlich wurde mit dem monoklonalen Anti-LexA-Antikörper sowie einem Konjugat aus einem Anti-Maus-IgG-Antikörper und alkalischer Phosphatase angefärbt. Als Referenz wurden Hefezellen eingesetzt, die nur mit pEG202 transfiziert wurden und somit nur LexA exprimieren konnten. Das exprimierte LexA hat eine Größe von 22 kD. Die Ergebnisse sind in folgenden Abbildungen dargestellt.

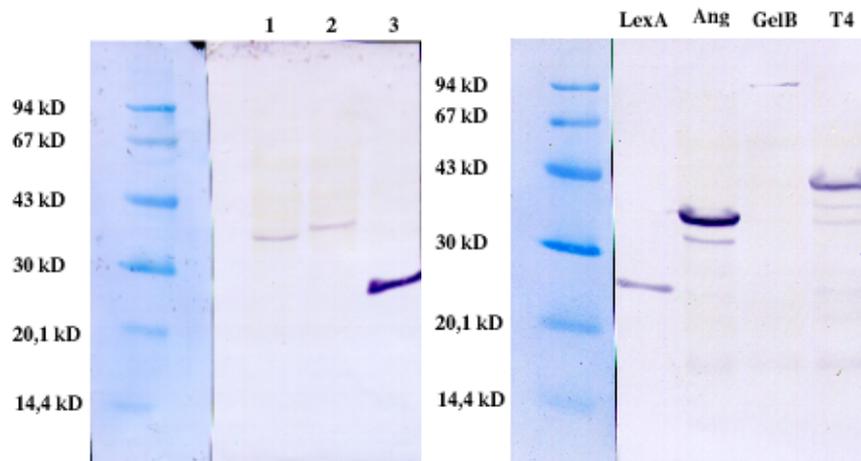


Abbildung 7.1: Western-Blots von LexA-haltigen Proteinextrakten. Aufgetragen sind jeweils 80µg Gesamtprotein. Die Markerbahn wurde mit Coomassie-Blue gefärbt.

Linkes Bild: 1: LexA-Ang-Hybrid aus pEG202/Ang (Eco/Sal) transfizierten Zellen, 2: LexA-Ang-Hybrid aus pEG202/Ang (Not/Not) transfizierten Zellen, 3: LexA-Referenz.

Rechtes Bild: LexA: Referenz, Ang: LexA-Ang-Hybrid aus pEG202/Ang (Not/Not) transfizierten Zellen, GelB: LexA-GelB-Hybrid aus pEG202/GelB transfizierten Zellen, T4: LexA-TIMP4-Hybrid aus pEG202/TIMP4 transfizierten Zellen

7.4 Herstellung der cDNA-Banken in EGY48

Nach der Amplifizierung der fetalen Leber-cDNA-Bank und der Plazentabank sowie pB42AD-Isolierung aus den dabei erhaltenen *E. coli*-Suspensionen, wur-

den die Plasmide gereinigt (s. 6.1.1). Die gesamte Leber-cDNA-Bank wurde mit der Polyethylenglykol-Fällungsmethode gereinigt. Bei der Plazenta-cDNA-Bank wurde die Hälfte der Lösung mit der PEG-Fällungsmethode gereinigt, die andere Hälfte über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation (s. 6.1). Beide Methoden erwiesen sich als gleichwertig, es gab keine Reinheits- oder Mengenunterschiede (siehe Tabelle 7.4). Schließlich mussten die Plasmide in EGY48, der bereits mit pEG202/Ang transfiziert war, eingeführt werden, um das Two-Hybrid-Screening durchführen zu können (s. 6.3.6).

Insgesamt wurden zehn Transformationen mit den pB42AD-Lösungen durchgeführt, fünf Leber-cDNA-Bank Transformationen und fünf Plazenta-cDNA-Bank Transformationen. Die verschiedenen Transformationen wurden durchgeführt, um sicherzustellen, dass immer mit frisch transformierten Zellen gearbeitet wurde.

Die Transformationswahrscheinlichkeiten waren sehr unterschiedlich, aber in jedem Fall wurde mindestens eine Menge von einer Mio. transformierter Klone erzeugt. Dabei erwies es sich als günstig, mit kleinen Volumina beim Transfizieren zu arbeiten (höchstens 3 ml). Hier konnten Transformationswahrscheinlichkeiten im Bereich von 100000 Klonen bis 250000 Klonen pro Mikrogramm DNA erreicht werden. Bei großen Volumina (größer als 10 ml)

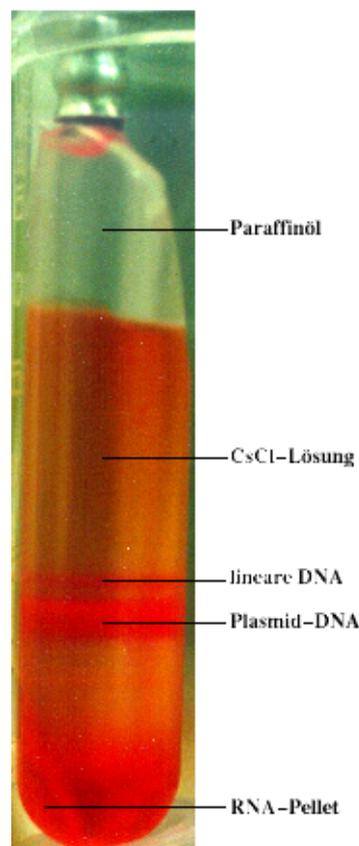


Abbildung 7.2:
Ergebnis der CsCl-Dichtegradientenzentrifugation:
Ultrazentrifugengefäß nach
Zentrifugation mit 320000 g (18h)

konnten nur 5000 bis 10000 Klone pro Mikrogramm DNA erhalten werden.

Am Ende lagen EGY48[p8oplacZ, pEG202/Ang, pB42AD/x]-Suspensionen vor, die zwischen 10^8 und 10^9 Hefezellen pro Milliliter enthielten.

	Lsg.1	Lsg.2	Lsg.3
OD(260)	0,70	0,53	0,35
OD(280)	0,37	0,27	0,17
260/280	1,9	2,1	2
Konz. (mg/ml)	1,75	2,6	2,0

Tabelle 7.4: Bestimmung der Konzentration an DNA in den Lösungen mit den gereinigten pB42AD-Plasmiden. Lsg.1: Leber-cDNA-Bank, optische Dichten in 1:50 facher Verdünnung bestimmt; Lsg.2: Plazenta-cDNA-Bank aus PEG-Fällungsreinigung, Verdünnung 1:100; Lsg.3: Plazenta-cDNA-Bank aus Dichtegradientenzentrifugation, Verdünnung 1:100

7.5 Genbankscreening

Mit dem X-Gal-Test (s. 6.3.8) wurden die cDNA-Banken nach Angiogenin-Interakteuren durchsucht. Es standen zwei verschiedene pEG202/Ang Konstrukte zur Verfügung, eines, in das die Angiogenin-cDNA *NotI/NotI* inkloniert und eines wo dafür die *EcoRI* und die *SalI* benutzt worden war (s. 7.1). Die beiden Konstrukte verhielten sich beim cDNA-Bank-Screening nicht gleich. Dies sei anhand der folgenden beiden Abbildungen demonstriert (S.46). Gezeigt sind Petrischalen, in denen sich entweder Gal/Raf $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ -X-Gal-Nährböden oder Glu $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ -X-Gal-Nährböden befinden. Auf diesen Nährböden sind jeweils ca. 800000 EGY48-Zellen ausplattiert, die mit verschiedenen Konstrukten transfiziert sind. Mit welchen, geht aus der Beschriftung hervor.

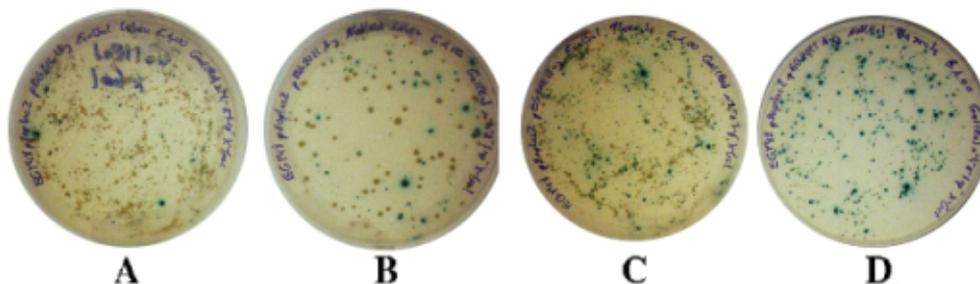


Abbildung 7.3: A-D: Gal/Raf $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ BU X-Gal-Nährböden

A: pEG202/Ang (Eco/Sal), Leber cDNA-Bank, **B:** pEG202/Ang (Not/Not), Leber cDNA-Bank, **C:** pEG202/Ang (Eco/Sal), Plazenta-cDNA-Bank, **D:** pEG202/Ang (Not/Not), Plazenta-cDNA-Bank

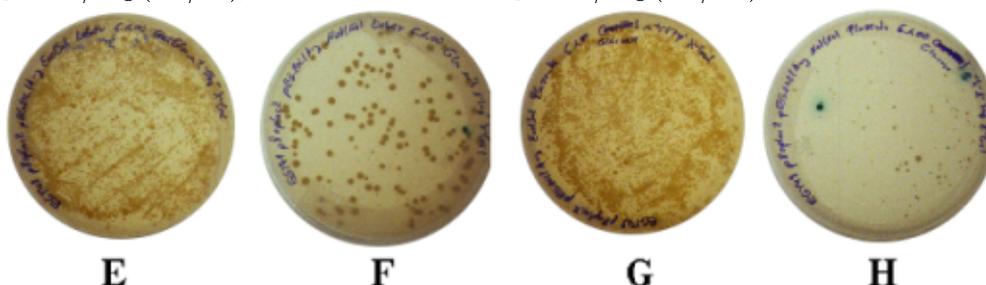


Abbildung 7.4: E-H: Glu $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ BU X-Gal Nährböden

E: pEG202/Ang (Eco/Sal), Leber-cDNA-Bank, **F:** pEG202/Ang (Not/Not), Leber-cDNA-Bank, **G:** pEG202/Ang (Eco/Sal), Plazenta-cDNA-Bank, **H:** pEG202/Ang (Not/Not), Plazenta-cDNA-Bank

Die Unterschiede bestehen im Verhältnis zu blauen (positiven) und weißen (falsch positiven) Klonen und im Wachstumsverhalten auf Glucoseplatten. Zellen, die mit pEG202/Ang (Not/Not) transfiziert sind, ergeben besonders im Fall der Plazenta-cDNA-Bank wesentlich mehr blaue Klone im Vergleich zu weißen Klonen. Dies bedeutet, dass Zellen, die pEG202/Ang (Eco/Sal) enthalten, erheblich häufiger falsch positiv sind.

Auf den Glucoseplatten sollten im Idealfall gar keine Klone wachsen. Bei pEG202/Ang (Not/Not)-Zellen gibt es auch tatsächlich nur sehr wenige Zellen auf solchen Platten. Anders bei pEG202/Ang (Eco/Sal)-Zellen: Hier wachsen sehr viele Zellen: Das Wachstum ist sogar intensiver als auf Gal/Raf-Platten.

Insgesamt ist deutlich sichtbar, dass die Plazenta-cDNA-Bank ein wesentlich besseres Verhältnis von positiven zu falsch positiven Klonen liefert als die fetale Leberbank.

Wie im Methodenteil näher ausgeführt, wurden einige blaue Klone von den Gal/Raf $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ BU X-Gal Platten heruntergenommen, in Flüssigkultur vermehrt, vereinzelt und erneut in Flüssigkultur vermehrt (s. 6.3.8). Dann wurde der Gal/Raf-Glu-Test ausgeführt (s. 6.3.9).

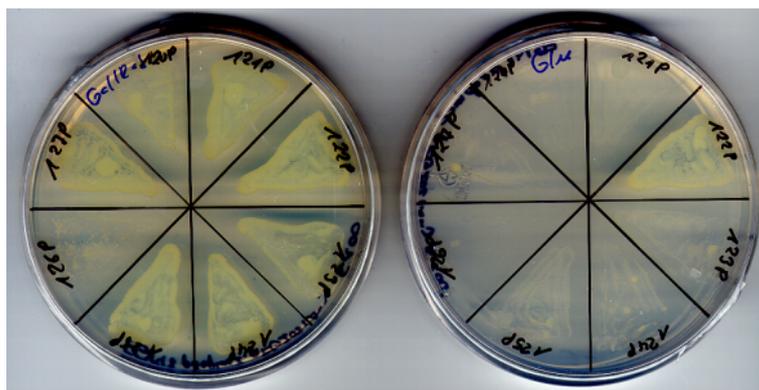


Abbildung 7.5: Gal/Raf-Glu-Test mit acht EGY48-Klonen. Die linke Petrischale enthält Gal/Raf $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ -Medium, die rechte Glu $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$. Deutlich ist zu sehen, dass Klon 122P auch auf dem glucoschaltigen Nährboden wächst und somit falsch positiv ist. (Klon 126P wächst nicht einmal auf der Galactoseplatte.)

Nur wenn der Gal/Raf-Glu-Test positiv ausfiel, wurde aus dem entsprechenden Klon die Gesamt-DNA präpariert (positiv heisst, das Wachstum wird durch Glucose unterdrückt.). Daraus wurde das pB42AD-Plasmid mit Hilfe des KC8-Stammes (*E. coli*) gewonnen (s. 6.3.3 und 6.3.4). Die cDNA des potenziellen Interakteurs wurde anschließend mit *XhoI/EcoRI* herausgeschnitten. Beispielhaft seien zwei Agarosegelbilder beigefügt, auf denen das Ergebnis einiger *XhoI/EcoRI*-Restriktionen dargestellt ist.

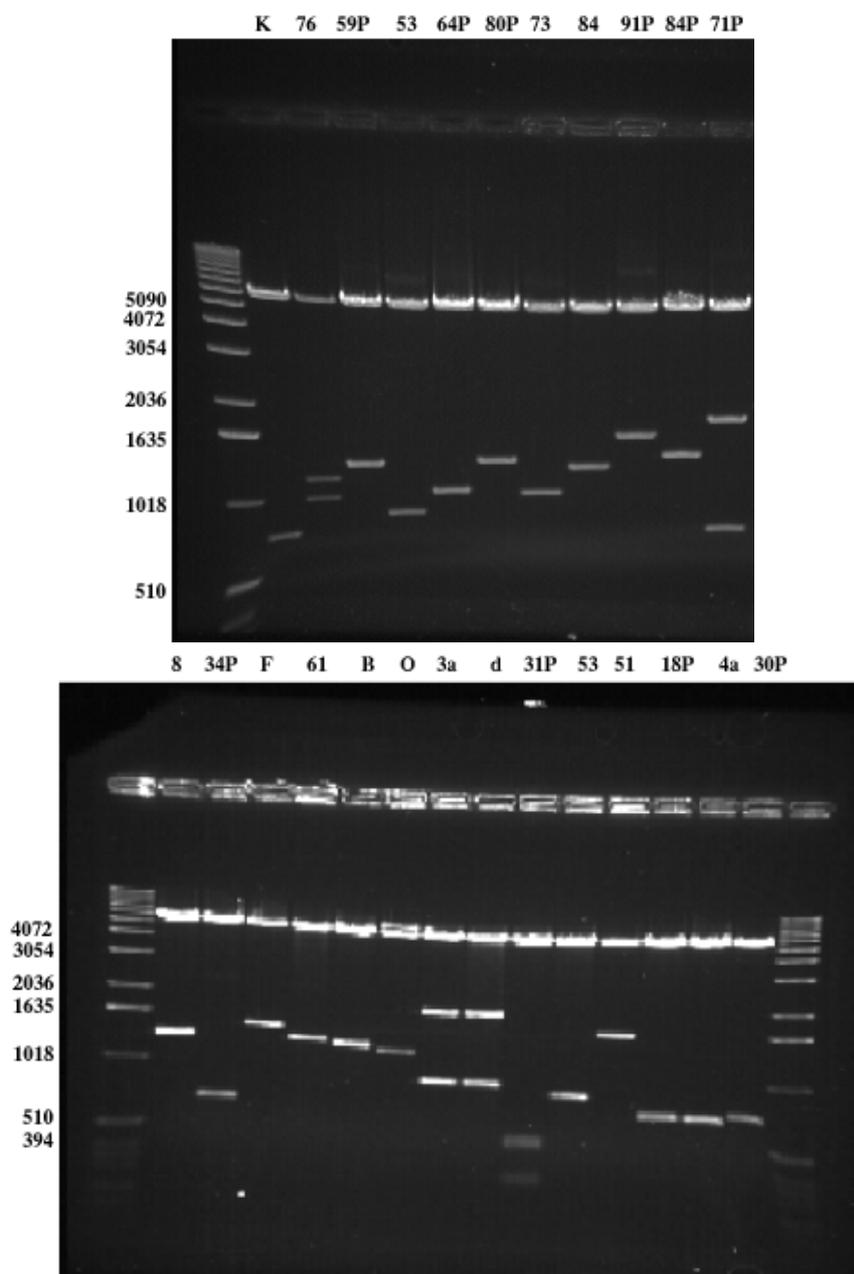


Abbildung 7.6: Zwei Bilder von ethidiumbromidgefärbten Agarosegelen mit *EcoRI/XhoRI*-Restriktionen einiger pB42AD-Plasmide. Die Beschriftung der Bahnen entspricht den Namen der gezeigten Klone.

Schließlich wurde EGY48[p8oplacZ, pEG202/Ang] mit den derart untersuchten pB42AD-Plasmide zu Testzwecken wieder transfiziert (s. 6.3.5). Auf Gal/Raf $u^{-}h^{-}l^{-}trp^{-}$ BU X-Gal sollten solche Klone wachsen und Blaufärbung zeigen (Interaktionsbestätigung) (s. 6.3.2). Ebenso wurde mit

EGY48 [p8oplacZ,pEG202/Gelb] oder in einigen Fällen auch mit EGY48 [p8oplacZ, pEG202/TIMP4] verfahren, wobei sich nun natürlich keine Blaufärbung ergeben sollte, ansonsten sind Zweifel an der Spezifität der Bindung an Angiogenin angebracht.

Zum Progelatinase B-Interaktionstest ist zu sagen, dass hier in allen Fällen die Klone Wachstum zeigten, wenn auch nicht so stark wie das Wachstum bei den Angiogenintests. Dies wird aber darauf zurückzuführen sein, dass solche Klone eine schwache Autoaktivierung zeigen. Gleichzeitige Blaufärbung war aber nur selten zu beobachten, und nur in solchen Fällen wurde die Interaktion dann auch als falsch positiv in Bezug auf Angiogenin bewertet.

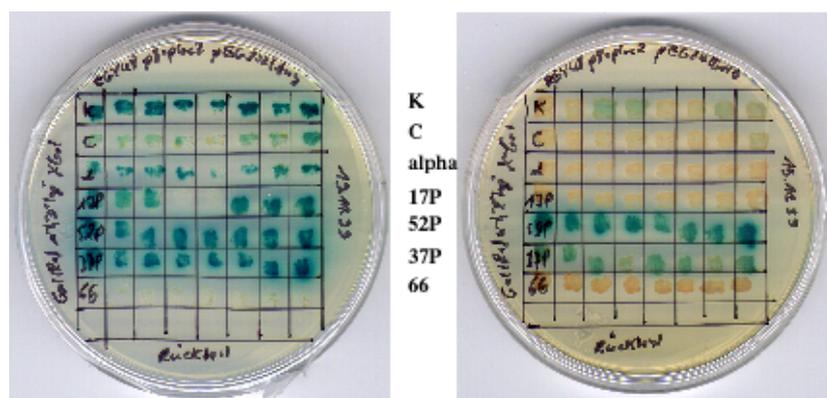


Abbildung 7.7: Interaktionstest auf Gal/Raf $u^{-}h^{-}1^{-}trp^{-}$ BU X-Gal Platten. Es sind jeweils acht Klone für jedes zu testende pB42AD/x-Plasmid aufgetragen. Zu sehen sind die Klone K, C, α , 17P, 52P, 38P und 66 (von oben nach unten). Die Klone auf der linken Platte tragen das pEG202/Ang-Plasmid (Angiogenin-Interaktion), die Klone auf der rechten Platte das pEG202/GelB-Plasmid (Progelatinase B-Interaktion). Deutlich ist zu erkennen, dass die Klone 52P und 37P nicht nur mit Angiogenin sondern auch mit Progelatinase B wechselwirken. Sie sind also als falsch positiv anzusehen. Auch K zeigt gegenüber Progelatinase schwache Blaufärbung, allerdings unerwarteterweise nur in vier von acht Fällen.

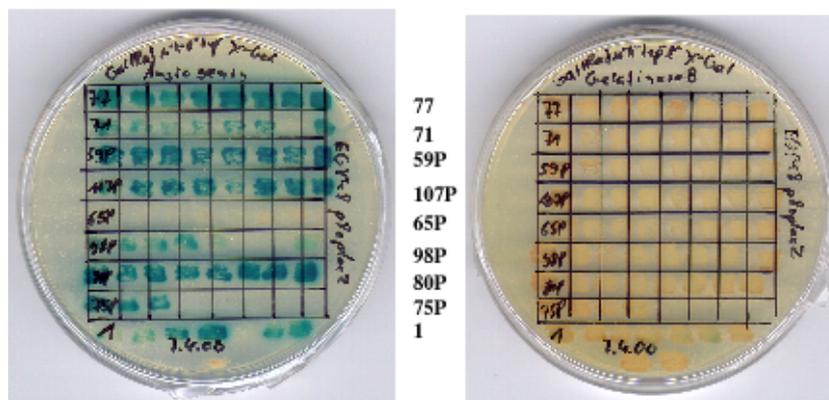


Abbildung 7.8: Ein weiteres Beispiel für Interaktionstests auf Gal/Raf $u^{-}h^{-}trp^{-}$ BU X-Gal Platten. Die Klone auf der linken Platte sind alle mit pEG202/Ang transfigiert, die auf der rechten mit pEG202/GelB. Dargestellt sind die Klone 77, 71, 59P, 107P, 65P, 98P, 80P, 71P und 1 (von oben nach unten). Hier kommt es in keinem Fall zu unerwarteten Wechselwirkungen mit Progelatinase B. Interakteur 65P zeigt gegenüber Angiogenin keinerlei Interaktion, wächst allerdings an, wenn mit Progelatinase B getestet wird. Dies zeigt, dass das Wachstum der Gelb-Klone nichts mit einer Interaktion zu tun hat und man sich nur auf Blaufärbung verlassen kann.

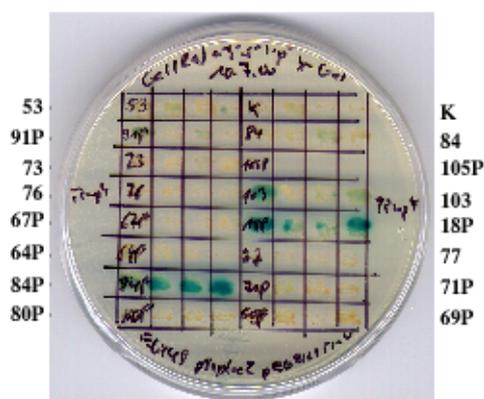


Abbildung 7.9: Interaktionstest auf Gal/Raf $u^{-}h^{-}trp^{-}$ BU X-Gal Platten. Hier sind alle Klone mit pEG202/TIMP4 transfigiert. Aufgetragen sind jeweils vier Klone von 53, 91P, 73, 76, 67P, 64P, 94P, 80P, K, 84, 105P, 103, 18P, 77, 71P und 69P. Deutliche Interaktion ist bei den Klonen 84P und 18P zu sehen. 53 interagiert sehr schwach. Ein seltsames Ergebnis gibt es bei 103. Einer von vier Klonen reagiert sehr stark, während die anderen äußerst schwach sind. Fast alle Klone zeigen wie bei Progelatinase B auch hier Wachstum ohne gleichzeitig Blaufärbung aufzuweisen.

Manche Angiogenin-Interakteure wurden auch gegen TIMP1 getestet. Aber in diesen Fällen war niemals eine Interaktion zu beobachten weder in Form von Wachstum oder Blaufärbung.

Insgesamt wurden auf diese Weise 156 EGY48-Klone untersucht (73 aus Leber-cDNA-, 83 aus Plazenta-cDNA-Bank). Die Ergebnisse sind ausführlich in Tabellenform im nächsten Abschnitt dargestellt.

7.6 Ergebnisse des cDNA-Bank-Screenings

Die Ergebnisse des cDNA-Bank-Screenings sind in zwei Tabellen (S. Tabelle 7.5 und 7.6) aufgelistet, deren Aufbau kurz erläutert werden muss. Gezeigt ist der Name eines Klonen, der in einer Nummer besteht. Daneben ist das Ergebnis des Gal/Raf-Glu-Testes (G/R) abzulesen, gefolgt von der ungefähren Größe der cDNA in Basenpaaren. Die Angabe 1800,2 bedeutet beispielsweise, dass das Insert aus ca. 1800 Basenpaaren besteht, wobei es allerdings bei der vorgenommenen *EcoRI/XhoI*-Restriktion in zwei Fragmente zerfiel.

Die mit „Ang“, „GelB“ und „TIMP4“ überschriebenen Spalten enthalten die Ergebnisse des Interaktionstests von gefundenen Angiogenin-Interaktoren mit Angiogenin, Gelatinase B bzw. TIMP4. Wurde dabei Blaufärbung beobachtet, so wurde der Test als positiv bewertet.

Wurde ein Test nicht durchgeführt, so ist dies mit einem Strich (-) vermerkt. Neben der Einteilung in pos. und neg. wurde in manchen Fällen eine grob qualitative Intensitätsbewertung vorgenommen (mittel, schwach, schwach(↓)), die sich auf die Blaufärbung eines Klons bezieht. Manche Klone zeigten zwar die Blaufärbung aber deutlich weniger intensiv als die Mehrzahl der anderen Klone. In der Ang-Spalte findet man außerdem die Bewertung pos.(?), was auf eine gewisse Zweideutigkeit hindeutet. Alle Tests wurden nämlich nicht nur mit einem Klon sondern meistens mit acht gleichzeitig gemacht. Dabei wurde erwartet, dass alle Klone das gleiche Ergebnis bringen. Dies war mit den pos.(?)-Klonen aber nicht der Fall, einige wurden blau andere aber nicht. In der Bemerkungsspalte ist das näher aufgeschlüsselt. Dort findet man in diesen Fällen ein in Klammern stehendes Zahlenpaar. Die letzte Zahl gibt die Anzahl von Klonen an, mit denen der Ang-Test gleichzeitig ausgeführt wurde, während die erste Zahl die Anzahl der Klone angibt, die dabei eine Blaufärbung zeigten.

Wurden Klone sequenziert, so ist dies durch den Vermerk „seq.“ zu sehen. „rev“ bedeutet, dass die Interakteur-cDNA auch vom 3'-Ende her sequenziert wurde, sich also der C-Terminus des Proteins angesehen wurde. Der Vermerk „ES“ in der Bemerkungsspalte bedeutet, dass dieser EGY48-Klon mit dem pEG202/Ang (Eco/Sal)-Plasmid transfiziert war.

7.6.1 Fetale Leber-DNA-Bank

Nr.	G/R	Größe	Ang	GelB	TIMP4	Bemerkung
1	pos.	1300	pos.	pos.	-	ES
3	pos.	2300	pos.(?)*	neg.	schwach(↓)	ES, (3/4)
3a	pos.	5000	pos.	-	-	ES*
4a	pos.	700	pos.(?)	neg.	pos.	ES, (3/4)*
5a	pos.	700	pos.	schwach	neg.	ES
8	pos.	1200	pos.(?)	neg.	schwach(↓)	ES, seq., (3/4)
11a	pos.	800	pos.	mittel	neg.	ES
50	pos.	700	-	-	-	ES
51	pos.	1400	pos.(?)	neg.	-	ES (4/8)
52	pos.	<400	-	-	-	ES
53	pos.	800	pos.(?)	schwach(↓)	neg.	ES (6/8)
54	pos.	-	-	-	-	ES
55	neg.	-	-	-	-	ES, weißer Klon
56	neg.	-	-	-	-	ES, weißer Klon
57	pos.	-	-	-	-	ES, weißer Klon
58	pos.	600	-	-	-	ES
59	pos.	1800,2	pos.	neg.	-	ES, seq., TIMP1*
60	neg.	-	-	-	-	ES, weißer Klon
61	pos.	1200	pos.(?)	schwach(↓)	neg.	ES, (5/8)
66	pos.	900	neg.	neg.	neg.	ES
67	pos.	600	pos.	-	-	ES
70	pos.	700	-	-	-	
71	pos.	1500	pos.	pos.	-	
72	pos.	900	pos.	neg.	-	

Nr.	G/R	Größe	Ang	GelB	TIMP4	Bemerkung
73	pos.	1000	pos.	schwach(↓)	schwach(↓)	
74	pos.	1300	pos.	schwach	schwach	TIMP1
75	pos.	1200	pos.	-	-	
76	pos.	2200,2	pos.	mittel	neg.	seq., rev., TIMP1
77	pos.	1200	pos.	pos.	-	
78	pos.	700	pos.	neg.	neg.	
79	pos.	1200	pos.(?)	neg.	-	(6/8)
80	pos.	1100	-	-	-	
81	pos.	1000	-	-	-	
83	pos.	1000	pos.	schwach(↓)	schwach	TIMP1
84	pos.	1200	pos.	schwach(↓)	neg.	seq., TIMP1
85	pos.	1000	pos.(?)	neg.	neg.	(3/5)
86	pos.	-	-	-	-	
87	pos.	1600	pos.	schwach	neg.	
88	pos.	1100	-	-	-	
90	pos.	3400,3	schwach	neg.	neg.	
100	pos.	5000	-	-	-	
101	pos.	1600,2	pos.	neg.	neg.	
103	pos.	2900,3	schwach	schwach(↓)	schwach	seq., TIMP1
104	pos.	1800,2	pos.(?)	schwach	-	(7/8)
106	pos.	550	-	-	-	
107	pos.	1400	pos.(?)	neg.	-	(4/8)
108	pos.	1600	pos.(?)	neg.	-	(7/8)
109	pos.	1400	pos.(?)	neg.	-	(2/6)
110	pos.	700	-	-	-	
111	pos.	1100	schwach	schwach(↓)	-	
112	pos.	<400	-	-	-	
113	pos.	800	-	-	-	
114	pos.	1200	-	-	-	
115	pos.	750	-	-	-	
116	pos.	1300	pos.	schwach(↓)	-	
117	pos.	1100	-	-	-	

Nr.	G/R	Größe	Ang	GelB	TIMP4	Bemerkung
120	pos.	1500,2	-	-	-	ES
121	pos.	1400	neg.	-	-	ES
122	pos.	<400	-	-	-	ES
123	pos.	1000	-	-	-	ES
124	pos.	1000	-	-	-	ES
α	pos.	1500	pos.	neg.	neg.	ES, seq.
β	pos.	700	pos.	schwach	schwach(↓)	ES
γ	pos.	5000	pos.(?)	-	-	ES, (3/8)
δ	pos.	5000	pos.(?)	neg.	-	ES, (6/8), wsl.=3a
A	neg.	600	-	-	-	ES
B	pos.	1100	pos.	neg.	schwach(↓)	ES
C	pos.	1500,2	schwach	neg.	schwach	ES
E	pos.	400	schwach	schwach(↓)	-	ES, TIMP1
F	pos.	1400	pos.(?)	-	-	ES, (2/4)
H	pos.	400	pos.	-	-	ES
K	pos.	700	pos.	schwach	neg.	ES, seq., TIMP1
O	pos.	1100	pos.	sehr schwach	-	ES, seq.
P	pos.	550	pos.	-	-	ES

Tabelle 7.5: Liste mit untersuchten Interakteuren aus der Leber cDNA-Bank

ES: Hefeklon war mit pEG202/Ang (*EcoRI/SalI*) transfiziert.

pos(?): positives Ergebnis eines Tests nicht hundertprozentig eindeutig

(3/4): Interaktionstest mit LexA-Angiogenin-Hybrid wurde mit vier Klonen durchgeführt, von denen aber nur drei eine Blaufärbung auf X-Gal-Medium zeigten.

TIMP1: Hier wurde zusätzlich auch die Wechselwirkung von Interakteur mit TIMP1 überprüft (EGY48-[p8oplacZ, pEG202/TIMP1])

weißer Klon: Der untersuchte Hefeklon war von Anfang an nicht in der Lage, auf X-Gal-Medium Blaufärbung hervorzurufen.

7.6.2 Plazenta-DNA-Bank

Nr.	G/R	Größe	Ang	GelB	TIMP4	Bemerkung
1P	pos.(?)	600	pos.(?)	schwach	-	ES*, (7/8)*, TIMP1*
2P	pos.(?)*	600	pos.(?)	mittel	-	ES, (7/8), TIMP1
3P	pos.(?)	700	pos.(?)	mittel	-	ES, (5/8)
9P	pos.(?)	500	-	-	-	ES
14P	pos.(?)	600	-	-	-	ES

Nr.	G/R	Größe	Ang	GelB	TIMP4	Bemerkung
15P	pos.(?)	700	-	-	-	ES
16P	pos.(?)	700	-	-	-	ES
17P	pos.(?)	1500	pos.(?)	neg.	schwach(↓)	ES, (6/8)
18P	pos.(?)	600	pos.	mittel	mittel	ES, seq., TIMP1
20P	neg.	-	-	-	-	ES
21P	pos.	700,2	pos.(?)	schwach(↓)	-	ES, (3/6)
22P	pos.(?)	-	-	-	-	ES
24P	pos.(?)	-	-	-	-	ES
25P	pos.	1200,2	pos.	pos.	-	ES, TIMP1
29P	pos.	800	pos.(?)	-	-	ES, (2/8)
30P	pos.	750	pos.(?)	mittel	schwach	ES, (2/4), wsl.=4a
31P	pos.	500	pos.(?)	neg.	mittel	ES, (4/8)
32P	pos.(?)	-	-	-	-	ES
34P	pos.	650	pos.(?)	-	schwach(↓)	ES, (2/4)
37P	pos.	700	pos.	mittel	schwach	ES
38P	pos.	800	pos.(?)	schwach	-	ES, seq., (6/8), TIMP1
40P	pos.	600	-	-	-	ES
43P	pos.	850	pos.	pos.	-	ES
50P	pos.	700	-	-	-	ES
51P	pos.	800	pos.	mittel	-	ES, seq., TIMP1
52P	pos.	1200,2	pos.	pos.	neg.	ES
53P	neg.	-	-	-	-	ES
55P	neg.	-	-	-	-	ES
55P	neg.	-	-	-	-	ES
56P	pos.	1150	pos.	pos.	-	ES
57P	neg.	-	-	-	-	ES
58P	pos.	-	-	-	-	
59P	pos.	1400	pos.	neg.	neg.	seq., rev., TIMP1
60P	pos.	1250	neg.	-	neg.	
61P	pos.	1200	pos.	-	-	wsl.=56P
62P	pos.	1200	pos.(?)	neg.	neg.	(7/8), TIMP1
63P	pos.	800	-	-	-	

Nr.	G/R	Größe	Ang	GelB	TIMP4	Bemerkung
64P	pos.	1050	pos.	neg.	neg.	seq., TIMP1
65P	pos.	1500	neg.	neg.	-	weißer Klon
66P	pos.	1300	pos.(?)	schwach	neg.	seq., (6/8), TIMP1
67P	pos.	2200	pos.	neg.	neg.	seq., TIMP1
68P	pos.	700	-	-	-	
69P	pos.	1200	pos.(?)	neg.	-	(6/8)
70P	pos.	1200	pos.(?)	neg.	-	
71P	pos.	2700,2	pos.	neg.	neg.	seq., rev., TIMP1
72P	pos.	1000	pos.(?)	neg.	neg.	(3/4), TIMP1
73P	pos.	600	-	-	-	
74P	pos.	800	-	-	-	
75P	pos.	1000	pos.	neg.(?)	-	
76P	pos.	1300	pos.	-	-	
78P	pos.	1400	pos.	-	-	
79P	pos.(?)	800	-	-	-	
80P	pos.	1800	pos.	mittel	neg.	seq., TIMP1
81P	pos.	1400	pos.	neg.	-	
82P	pos.(?)	1000	-	-	-	wsl.=75P
83P	pos.(?)	800	-	-	-	
84P	pos.	1400	pos.	neg.	pos.	seq., TIMP1, wsl.=93P
85P	pos.	<400	-	-	-	
86P	pos.	1400,2	pos.	neg.	-	
89P	neg.	-	-	-	-	
90P	pos.	500	-	-	-	
91P	pos.	1500	pos.	neg.	schwach(↓)	seq., TIMP1
92P	pos.	1000	pos.(?)	neg.	-	(2/6), wsl.=64P
93P	pos.	1400	neg.	-	-	
94P	pos.	<400	-	-	-	
95P	neg.	1900	pos.	-	-	
96P	pos.	700	-	-	-	
98P	pos.	2200	pos.	pos.(?)	-	
99P	neg.	-	-	-	-	

Nr.	G/R	Größe	Ang	GelB	TIMP4	Bemerkung
100P	pos.	700	-	-	-	
101P	pos.	650	-	-	-	
103P	pos.	800	-	-	-	
104P	pos.	1400	pos.	neg.	-	
105P	pos.	1800	pos.	neg.	-	seq.
107P	pos.	1800	pos.	pos.	-	
120P	pos.	<400	-	-	-	ES
121P	pos.	950	pos.	pos.	-	ES
122P	neg.	-	-	-	-	ES
123P	pos.	<400	-	-	-	ES
124P	pos.	800	-	-	-	ES
125P	pos.	<400	-	-	-	ES
127P	pos.	1000	pos.	neg.	-	ES
128P	pos.	700	-	-	-	ES
130P	neg.	-	-	-	-	ES, weißer Klon*

Tabelle 7.6: Liste mit untersuchten Interakteuren aus Plazenta cDNA-Bank

ES: Hefeklon war mit pEG202/Ang (*EcoRI/SalI*) transfiziert.

pos(?): positives Ergebnis eines Tests nicht hundertprozentig eindeutig

(7/8): Interaktionstest mit LexA-Angiogenin-Hybrid wurde mit acht Klonen durchgeführt, von denen aber nur sieben eine Blaufärbung auf X-Gal-Medium zeigten.

TIMP1: Hier wurde zusätzlich auch die Wechselwirkung von Interakteur mit TIMP1 überprüft (EGY48-[p8oplacZ, pEG202/TIMP1])

weißer Klon: Der untersuchte Hefeklon war von Anfang an nicht in der Lage, auf X-Gal-Medium Blaufärbung hervorzurufen.

7.7 Sequenzierte Interakteure

Bei einigen wenigen Klonen wurde die Interakteursequenz bestimmt. In der Regel wurde dabei der Sequenzierprimer pB42ABseqfor verwendet, der letztlich zu einer Sequenz des N-Terminus des Interakteurproteins führt. Lediglich in drei Fällen wurde zur Sequenzierung auch der Primer pB42ABseqrev verwendet, der eine Überprüfung des C-Terminus des Interakteurs erlaubt (s. 7.2).

Mit den Sequenzen wurde mit Hilfe des Programmes Blast (NCBI) eine

Datenbankrecherche durchgeführt. Das heisst, die Sequenzen wurden mit bekannten Sequenzen verglichen, um letztlich sagen zu können, welche Proteine mit dem Angiogenin interagiert haben. In allen 23 Fällen war es möglich, ein Protein zuzuordnen. Die Ergebnisse zeigt nachfolgende Tabelle.

Nr.	Name	NCBI-Zugriffs-Nr.
8	Insulin-like-growth-factor-binding-Protein 1 (IGFBP1)	CAA68770
53	Hämopexin	
59	δ -Aminolävulinatsynthase	XP_010219
73	VAV Onkogen	NP_005419
76	DEAD-Box-Potein p62	NP_004387
84	Vitronectin	P04004
87	Ubiquitinbindendes Tyrosinphosphoprotein p62	NP_003891
103	Inter- α -Trypsininhibitor	A39967
α	δ -Aminolävulinatsynthase	XP_010219
K	Cyclin G1 bindendes Protein 1	AAF03558
O	DNA mismatch repair protein MLH3	BAA92353
18P	Fibulin 1C	XP_010046
38P	Kernprotein E3-3 orf1	AAH02873
51P	Fibulin 1C	XP_010046
59P	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)	P00533
64P	Fibronectin-Precursor	P02751
67P	E1B-55kD assoziiertes Protein	NP_008971
71P	Pregnancy associated plasma Protein A (PAPP A)	NP_002572
72P	Fibronectin-Precursor	P02751
80P	Insulin-like-growth-factor-binding-Protein 1 (IGFBP1)	CAA68770
84P	Meltrin S (ADAM 12-S)	AAC08703
91P	GAP assoziiertes Tyrosinphosphoprotein p62	NP_006550
105P	α -Actinin 4	NP_004915

Tabelle 7.7: Zuordnung der Klone zu Proteinen

Hämopexin ist in der NCBI-Datenbank nicht vorhanden. Die Sequenz ist in der Swiss-Prot Datenbank (<http://www.expasy.ch/sprot>) unter der Zugriffsnummer P02790 veröffentlicht.

Die nächste Tabelle gibt genauere Informationen bezüglich der sequenzierten Interakteure.

Name	bp	I	II	III	Übereinstimmung
8	1200	400	259	237	W-[23-241]-
53	800	260	462	219	[242-444]-
59	1800	600	587	493	[95-274]-
73	1000	330	845	241	[605-786]
76	2200	730	614	617	IDA-[1-177]-
84	1200	400	478	362	[117-296]-
87	1600	530	440	447	[84-240]-
103	2900	970	911	888	[23-170]
α	1500	500	587	467	[121-329]-
K	700	230	154	150	[5-141]-
O	1100	360	1453	289	[1130-1155]-(35)-[1291-1408]-
18P	600	200	683	187	[497-683-STOP]-
38P	800	260	184	192	DFAARWSA-[1-184-STOP]-
51P	800	260	683	195	[489-660]-
59P	1400	430	1210	776	66-[501-614]-
64P	1050	350	2386	145	[2242-2386-STOP]-
67P	2200	730	856	883	27-[1-153]-
71P	2700	900	1627	216	[1412-1591]-
72P	1000	330	2386	167	[2211-2284]-(RE-STOP)-
80P	1200	400	259	235	[25-204]-
84P	1400	470	738	187	[552-731]-(ASLTLT-STOP)-
91P	1500	500	443	118	[282-317]-(45)-[363-443-STOP]-
105P	1800	600	884	802	[83-262]-

Tabelle 7.8:

Spalte „Name“: Nummer des Klons

Spalte „bp“: Länge der cDNA in Basenpaare

Spalte I: Anzahl an Aminosäuren, die von der cDNA kodiert werden könnten

Spalte II: Anzahl an Aminosäuren, aus denen das Protein besteht, welches dem Klon nach Tabelle 7.7 zugeordnet ist

Spalte III: Anzahl an Aminosäuren, aus denen das von der cDNA kodierte Protein wahrscheinlich tatsächlich besteht, wenn man die N-terminale Verkürzung berücksichtigt und annimmt, der C-Terminus ist identisch mit dem C-Terminus des zugeordneten Proteins.

Spalte „Übereinstimmung“: siehe Text unten

Die „Übereinstimmungsspalte“ schlüsselt die Aminosäuresequenz detaillierter auf. In eckigen Klammern sind dabei die Aminosäurebereiche aufgeführt, die zwischen der Sequenz des gefundenen Proteins und der entsprechenden Sequenz in der NCBI-Datenbank übereinstimmen. Dabei liegt die dort verwendete Nummerierung zu Grunde. Ohne Klammern steht die Anzahl an Aminosäuren (oder manchmal auch die Aminosäuren selber), die in der Interakteursequenz gefunden wurden aber in der Proteindatenbank nicht vorhanden sind. In runden Klammern ist die Anzahl an Aminosäuren, die in der Sequenz nicht vorhanden sind, obwohl sie Bestandteil des Proteins sein sollten.

Meistens ist die Länge der Aminosäuresequenz, die sich aus der gefundenen cDNA ableiten ließe (Spalte I), länger als die Länge der Aminosäuresequenz, wie sie aus der Proteindatenbank zu erwarten wäre (Spalte III). Ursache werden untranslatierte Regionen am 3'-Ende der cDNA sein. Bei den Interakteuren 18P, 38P, 64P und 91P lässt sich dies gut sehen. Die Sequenzierung ermöglichte die Identifizierung eines STOP-Signals, trotzdem geht die Basensequenz noch viele Basenpaare weiter. Bei 71P ist der Unterschied sogar extrem: 900 Aminosäuren wären möglich, kodiert werden aber nur 216.

Umgekehrt stellt sich dieser Sachverhalt bei 59P, 67P und 105P dar: Hier sind die cDNAs zu kurz, um das ihnen zugeordnete Protein kodieren zu können. Entweder ist also die Zuordnung falsch oder bei den betrachteten Interakteuren handelt es sich um C-terminal verkürzte Varianten.

Die Sequenzen, die bei zwei Interakteuren nicht dem zugeordneten Protein entsprechen und immer am N-Terminus stehen, sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Name	Länge	Sequenz
59P	66	TTTLSFQSRASGKPSLCPPPSGVASMSVSPK- -VMEHRAPPGKVPSPAPRVPALSLTAVTHSVSAE
67P	27	PPDRKGLRGTEPWEAGPGSGATPGARA

Tabelle 7.9:

Über eine Suche mit den entsprechenden Nucleotidsequenzen war es auch hier schließlich möglich, eine Zuordnung zu finden. Die 66 N-terminalen Aminosäuren beim EGFR (59P) lassen sich einem alternativen Spleissprodukt des EGFR zuordnen (s. 7.8). Die 27 Aminosäuren des 67P gehören tatsächlich auch zum E1B-55kDa bindenden Protein. Unter der NCBI-Zugriffsnummer XM_008913 ist eine mRNA veröffentlicht, die ein Protein kodiert, welches allerdings am N-Terminus mehr als 27 Aminosäuren (nämlich 57) länger ist als in der veröffentlichten Proteinsequenz NP_008971. Zusammenfassend kann bis hierhin festgestellt werden, dass von fast allen Interakteuren N-terminal verkürzte Fragmente gefunden wurden. Ausnahmen bildet hier das DEAD-Box-Protein p62. Auch IGFBP1 und der Inter- α -Trypsininhibitor sind am N-Terminus vollständig, da die fehlenden Aminosäuren das Signalpeptid bilden, welches abgespalten wird.

7.8 Ergebnisse der C-terminalen Ansequenzierung

Bei den Klonen 73, 71P und 59P wurden die cDNAs auch in 3'-5'-Richtung 600 bp weit ansequenziert, was es ermöglicht, auch den C-Terminus der entsprechenden Proteine anzusehen. Nur im Falle von Klon 73 gelang die Identifizierung des C-Terminus des ihm zugeordneten vav-Onkogens. Auch hier folgt dem STOP-Codon eine Region von untranslatierten Nucleotiden.

71P konnte in der NCBI-Datenbank kein Protein und keine Nucleotidse-

quenz zugeordnet werden. Die cDNA von 71P wird somit wie schon vermutet am 3'-Ende aus einer langen Sequenz bestehen, die nicht translatiert wird.

Am interessantesten stellt sich die Sequenzierung von 59P dar. Auch hier konnte der C-Terminus des EGFR zunächst nicht gefunden werden. Wurde aber mit der Nucleotidsequenz gesucht, so ergab sich eine Übereinstimmung einer dem EGFR zugeordneten Sequenz allerdings innerhalb eines untranslatierten Bereichs. Die gefundene Nucleotidsequenz (NCBI-Zugriff: U48729, Übereinstimmung der Basensequenz zwischen Basenpaar 348 und 870) kodiert nur für 53 Aminosäuren, obwohl sie 904 bp lang ist. Alle 53 Aminosäuren sind allerdings Bestandteil des EGFR. Legt man den EGFR-Precursor (NCBI-Zugriff P00533) zu Grunde, so handelt es sich um die Aminosäuren 575 bis 627. Dann folgt aber ein STOP-Codon, obwohl die Sequenz noch 583 weitere Aminosäuren aufweist. Betrachtet man die Ergebnisse der N-terminalen Sequenzierung zusammen mit der C-terminalen, so ergibt sich folgendes Bild: Klon 59P kodiert die Aminosäuren 501 bis 627 (=127 Aminosäuren) des EGFR zuzüglich 66 N-terminaler Aminosäuren, die zu einer alternativen Form des EGFR gehören. Insgesamt werden also nicht 776 Aminosäuren (Tabelle 7.8) sondern nur 193 kodiert.

7.9 Bemerkungen zu einigen Sequenzen

Die Sequenzen vom EGFR, Fibronectin, Vitronectin, GAP assoziiertem Tyrosinphosphoprotein p62 und Meltrin S können genauer untersucht werden, da zu diesen Proteinen Informationen zur Domänenstruktur vorliegen.

Eine Analyse des aus 28 Exons bestehenden EGFR-Gens (NCBI-Zugriff: AF288738) ergab, dass es sich bei 59P um ein Protein kodiert von drei Exons handelt: Exon 13 kodiert die Aminosäuren 501-544, Exon 14 die Aminosäuren 545-574 und Exon 15 die Aminosäuren 575-627. Die 66 zusätzlichen Ami-

nosäuren werden bemerkenswerterweise nicht von einem Exon sondern einer Intronsequenz kodiert, die direkt vor Exon 13 liegt. Die gefundene Form des EGFR ist nicht membranständig, sondern wird sekretiert. Die letzte Aminosäure ist 627, die Transmembranregion würde aber erst ab Position 646 beginnen. Das ebenfalls identifizierte Meltrin S ist auch eine nicht membranständige Form von Meltrin α . Wie auch beim EGFR handelt es sich beim gefundenen MeltrinS-Fragment um eine cysteinreiche Domäne.

Die Sequenz des Fibronectinfragments umfasst die letzten drei fibrinbindenden und stark cysteinhaltigen Domänen (Klon 72P). Bei Klon 64P sind lediglich die letzten zwei fibrinbindenden Domänen vollständig vorhanden.

Die Sequenz des Vitronectins enthält die beiden hämopexinähnlichen Domänen und die heparinbindende Domäne. Die RGD-Sequenz (Aminosäuren 64-66: Zellbindungssequenz) ist aber nicht Bestandteil des Vitronectinfragments.

Das GAP assoziierte Tyrosinphosphoprotein p62 besteht N-Terminal aus einer DNA bindenden Domäne, die aber im gefundenen Fragment fehlt. Dagegen sind die prolinreiche Domäne (282-317) und die tyrosinreiche Domäne aber vorhanden.

7.10 Beschreibung der gefundenen Proteine

- IGFBP1 (Brinkmann et al. 1998): IGFBP1 ist ein vermutlich glykosyliertes Plasmaprotein von 25-30 kD und wird von fetaler Leber sowie von der Plazenta synthetisiert. Es bindet im Plasma den Wachstumsfaktor IGF und moduliert vermutlich die Bindung an den IGF-Rezeptor. IGFBP1 kann phosphoryliert werden, wobei im phosphorylierten Zustand die Affinität zu IGF steigt (Jones et al. 1993).
- vav-Onkogen (Denkinger et al. 2000, Katzav et al. 1989): Das Protein wird nur in hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen exprimiert. Nachdem zunächst vermutet wurde, es könnte sich um einen Transkriptionsaktivator handeln, weiss man heute, dass es ein Guaninnucleotid austauschfaktor ist. Eine Rolle in der T-Zell-Signaltransduktion ist nachgewiesen. Vav-defiziente Mäuse weisen im Blut unvollständig gereifte T-Zellen auf. Es spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Signaltransduktion in B-Zellen.
- Vitronectin (Suzuki et al. 1985): Vitronectin ist ein 75 kD Protein, welches trotz struktureller Verschiedenheit vermutlich ähnliche Aufgaben wie das Fibronectin (s.u.) hat. Es kann an Zellen über Integrine und ECM-Bestandteile (Proteoglykane) binden und ist daher ein Adhäsionsprotein.
- Ubiquitin-bindendes Protein p62 (Joung et al. 1996): Das 62 kD Protein ist in Signaltransduktionsprozesse in T-Zellen involviert. Es bindet an die SH2-Domäne von p56^{lck} – einer T-Zell-spezifische Tyrosin Kinase – erstaunlicherweise ohne phosphoryliert zu sein.
- Fibulin 1C (Argraves et al. 1990): Das glykosylierte cysteinreiche Pro-

tein kommt in der extrazellulären Matrix sowie im Plasma vor (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Es bindet Calcium, seine Funktion ist nicht bekannt. Die Bedeutung der beobachteten Bindung von Fibulin an die cytoplasmatische Domäne der β 1-Untereinheit von Integrinen ist ungewiss.

- Kernprotein E3-3 orf1: Außer der Sequenz ist zu diesem Protein noch nichts veröffentlicht.
- Inter- α -Trypsininhibitor (Enghild et al. 1989): Es handelt sich mit 225 kD um ein sehr großes Protein, welches im Plasma zirkuliert. Der Inhibitor besteht aus drei Polypeptidketten, die außergewöhnlich fest zusammenhalten (SDS reicht für eine Dissoziation nicht aus). Die leichte Kette von 30 kD ist Bikunin, von ihr geht die inhibierende Wirkung aus. Die Funktion der beiden schweren Ketten (H1: 96 kD, H2: 86 kD) wird nicht verstanden.
- Cyclin G1 bindendes Protein 5: Es liegen keine Veröffentlichungen bezüglich dieses Proteins vor. Cycline selbst sind Proteine, die an Zellteilungsvorgängen beteiligt sind. Ihre Konzentration schwankt periodisch im Cytosol. Cycline binden an cyclinabhängige Proteinkinasen, wobei sich ein MPF-Protein (maturation promoting factor) bildet. Dieser bewirkt, dass eine Zelle in die Mitose eintritt.
- DNA mismatch repair protein MLH3 (Lipkin et al. 2000): MLH3 ist ein 160 kD Zellkernprotein, welches zu einer Gruppe von bislang sieben bekannten DNA-Reparaturproteinen gehört. Die Proteine beseitigen Basenfehlpaarungen und tragen somit zur Minderung der Mutationsrate bei. Mäuse, denen eines dieser Reparaturproteine fehlt, sind stark für Darmkrebs anfällig. MLH3 wird in sehr vielen Zellen exprimiert, besonders reichlich kommt es aber im Epithelium des Darms vor.

- E1B-55kD-assoziiertes Protein (Gabler et al. 1998): Das 120 kD Protein gehört zur hnRNP-Familie, die an RNA bindet und eine Funktion beim Transport von RNA aus dem Zellkern hat. Das E1B-55KD-Protein selber ist ebenfalls am RNA-Transport beteiligt. Bekannt ist, dass es in mit Adenoviren befallenen Zellen einen Komplex mit dem viralen Protein E4orf6 bildet. Dieser Komplex manipuliert den RNA-Transport in der Weise, dass nur noch virale RNA-Transkripte den Zellkern verlassen, während andere RNA-Transkripte im Zellkern zurückgehalten werden. Wird in solchen Zellen E1B-55KD-assoziiertes-Protein überexprimiert, so wird diese Blockade aufgehoben.
- Meltrin S (Gilpin et al. 1998): Meltrin S ist die verkürzte Form des membranständigen Melrin α oder auch ADAM 12 genannt. Durch alternatives Splicing fehlen die cytoplasmatische und Transmembrandomäne des ADAM 12, so dass Meltrin S sekretiert wird. Expression ist im Falle von Plazenta und Muskelzellen nachgewiesen, und es wird angenommen, daß Meltrin S an der Myogenese beteiligt ist.
- PAPP A (Kristensen et al. 1994): PAPP A ist mit 800 kD ein ungewöhnlich großes Plasmaprotein. Es kommt als Heterotetramer vor bestehend aus zwei Molekülen PAPP A und zwei Molekülen MBP (eosinophil myelin basic protein). Es ist stark glykosyliert, bindet Zink und Heparin und ist nur bei schwangeren Frauen 4-6 Wochen nach Schwangerschaftsbeginn vorhanden (50 mg/l) . Gebildet wird es in der Plazenta, ist aber im Fetus nicht vorhanden. Seine Funktion ist unbekannt. Primärstrukturvergleiche mit Matrixmetalloproteasen lassen die Vermutung zu, dass es proteolytische Funktion haben könnte.
- DEAD/Box Protein p62: Das 67 kD Kernprotein wird nur in sich teilen-

den Zellen gefunden, ist also für Zellteilung oder Zellwachstum wichtig. Es bestehen Strukturähnlichkeiten zum Translationsfaktor eIF4A sowie zum SV40 large T Antigen. Das Protein wirkt als ATP-abhängige RNA-Helicase.

- α -Actinin 4 (Honda et al. 1998): Es handelt sich um ein cytoplasmatisches, actinbindendes Protein von 116 kD. Das Protein ist vermutlich an den Cytoskelettveränderungen in wandernden Zellen beteiligt.
- EGFR (Carpenter et al. 1987, Reiter et al. 1996): EGFR ist ein 170 kD Rezeptor für EGF und TGF β . Er wird auf allen Zellen exprimiert bis auf hämatopoetischen Stammzellen. Die cytoplasmatische Domäne entwickelt Tyrosin-Kinase-Aktivität, wenn ein Ligand gebunden ist und der Rezeptor danach dimerisiert. Der Rezeptor löst dann eine Signaltransduktionskaskade aus, die letztlich eine Zellproliferation bewirkt. In dieser Arbeit wurde allerdings eine sekretierte Form des EGFR entdeckt. Es sind noch weitere sekretierte Formen des EGFR beschrieben, auch für andere Wachstumsfaktoren ist so etwas bekannt. Die Bedeutung ist unsicher, es wird angenommen, dass sie die Funktion von membranständigen Rezeptoren modulieren.
- GAP-assoziiertes Protein p62 (Wong et al. 1992): Das 62 kD Protein bindet an das 120 kD GTPase aktivierende Protein p120-GAP. p120-GAP erhöht drastisch die GTPase Aktivität von RAS-Proteinen, wodurch diese inaktiviert werden. Welche Wirkung das gefundene GAP-p62 auf p120-GAP hat, ist unbekannt. Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass am N-Terminus eine Region liegt, die der hnRNP-Familie ähnelt, während C-terminal Tyrosinreste liegen, die phosphoryliert werden könnten. Das Protein kann RNA und DNA binden.

- Fibronectin (Sharma et al. 1999): Fibronectin ist ein sehr großes Protein, welches aus zwei 250 kD Polypeptidketten besteht, die jeweils am C-Terminus durch zwei Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Es kommt im Blutplasma und in der ECM vor. Plasmafibronectin wird von Leberzellen sezerniert, es ist an der Blutgerinnung beteiligt (Bindung an Fibrin). Fibronectin in der ECM wird von Fibroblasten ausgeschieden. Durch die Fähigkeit an Integrine in Zellmembranen sowie an Bestandteile der ECM (Kollagen, Proteoglykane) zu binden wirkt Fibronectin als Adhäsionsprotein. Es ist entscheidend an Zellmigrationsprozessen und an der Formgebung von Geweben beteiligt.

7.11 Verlusttest

Der Test wurde mit allen sequenzierten Interaktoren durchgeführt (s. 6.3.10). In keinem Fall konnte Autoaktivierung festgestellt werden.

7.12 Umklonierungstest

Beim Umklonierungstest wurden einige sequenzierte Inserts aus dem pB42AB mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* ausgeschnitten und in den pEG202 inkloniert. Auf Inserts, die bei der Restriktion in mehr als ein Fragment zerschnitten wurden, wurde verzichtet, weil man in diesem Fall andere Schnittstellen zum Einklonieren verwenden müsste, die aber erst durch PCR mit entsprechenden Primern zu erzeugen wären.

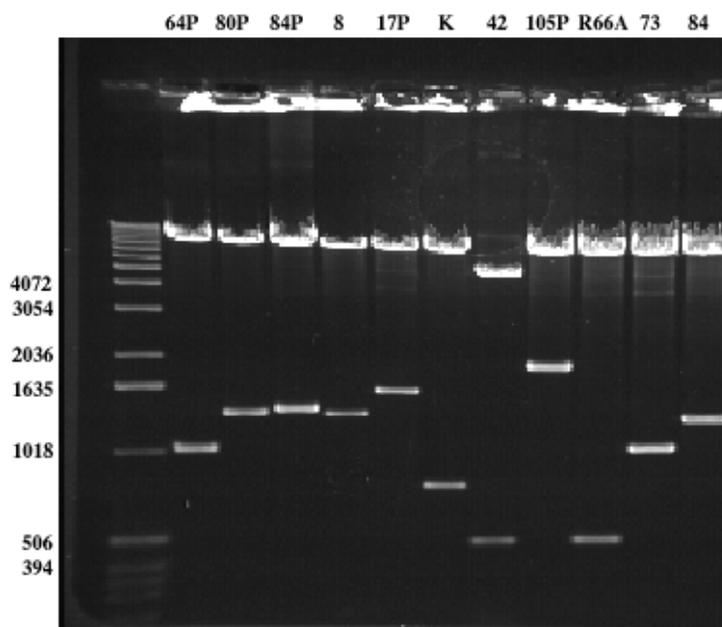


Abbildung 7.10: Nachweis der erfolgreichen Einklonierung einiger Interakteur-cDNAs in den Vektor pEG202 (10000 bp). Die cDNAs wurden mit *Xho*I und *Eco*RI herausgeschnitten. Bei Nr. 42 ist der Vektor nicht pEG202 sondern pB42AD (6500 bp). Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

Auf der anderen Seite wurde die Angiogenin-cDNA *Eco*RI/*Xho*I in den pB42AD einkloniert. Nun kann man testen, ob die beobachteten Interaktionen sich auch dann nachweisen lassen, wenn Angiogenin am Transkriptionsaktivator und die Interakteure am LexA sitzen.

Getestet wurde zunächst, ob die entsprechenden LexA-Interakteur-Hybride auch exprimiert werden. Dies geschah durch Aufbrechen von mit pEG202/-Interakteur-cDNA transfizierter Hefe (EGY48) (s. 6.3.3), SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine im Zellextrakt und anschließendes Blotting auf eine PVDF-Membran (s. 6.2). Mit einem monoklonalen Antikörper gegen LexA wurden die Hybride dann nachgewiesen. Zur Größenabschätzung wurde außerdem ein Proteinextrakt verwendet, in dem sich nur die LexA-Bindungsdomäne (22 kD) befindet.

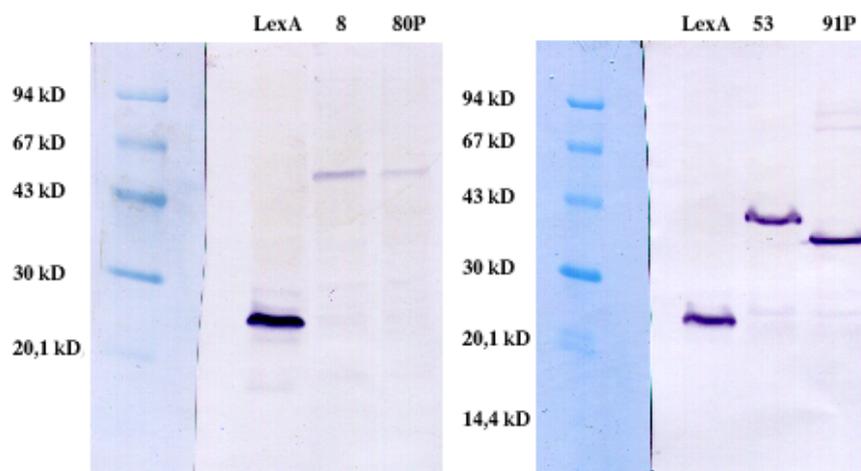


Abbildung 7.11: Western-Blots, die zeigen, dass in den Proteinextrakten aus EGY48 LexA bzw. die LexA-Hybride vorhanden sind. Die Markerbahn wurde mit Coomassie-Blue gefärbt.

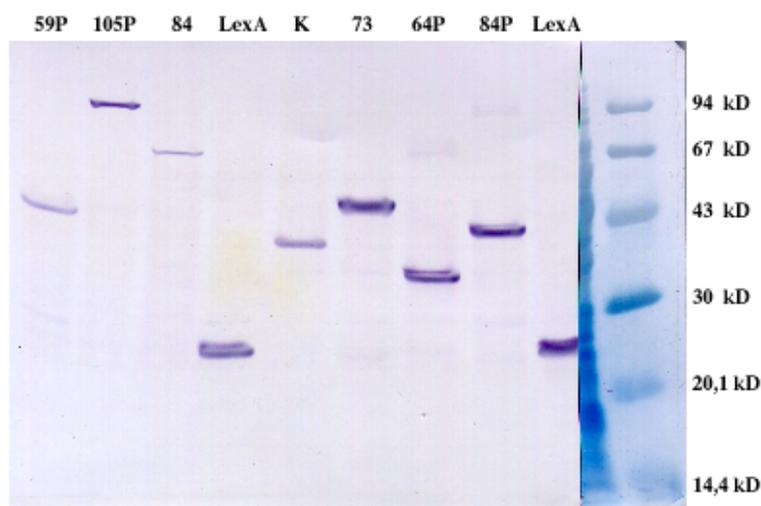


Abbildung 7.12: Erfolgreiche Nachweise der Expression von LexA-Hybriden mittels Western-Blot

Name	53	73	84	87	K	18P	59P	64P	80P	84P	91P	105P
kD-Blot	18	21	43	63	18	23	21	11	28	18	13	72
kD-ber.	24,3	28,0	41,5	37,4	17,0	20,6	21,0	15,5	24,3	17,8	13,1	92,5

Tabelle 7.9: Größe der gefundenen Angiogenin-Interakteure in kD, grob abgeschätzt aus den Western-Blots (kD-Blot) und über der Aminosäuresequenz mit dem Programm „ProtParam“ (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) berechnet (kD-ber.). Bei den kD-Blot-Werten wurde die LexA-Größe von 22 kD abgezogen. Bei der Berechnung der kD-Werte wurde davon ausgegangen, dass die Proteine am C-Terminus vollständig sind, also dort genauso aussehen wie es die Sequenzen aus der NCBI-Datenbank zeigen.

Bei sechs Proteinen stimmen beobachtete und berechnete Molekularmasse gut überein (84, K, 18P, 59P, 84P, 91P). Hier kann also davon ausgegangen

werden, dass der jeweilige C-Terminus genauso aussieht wie der C-Terminus des zugeordneten Proteins aus der NCBI-Datenbank. Bei den Interakteuren 53, 73, 64P und 105P ist der gemessene kD-Wert geringer als der berechnete, was besonders bei 105P extrem ist. Besonders beim letzten Protein fehlen daher zum C-terminalen Ende hin Aminosäuren. Bei 87 ist der gemessene kD-Wert deutlich größer als der berechnete. Hier scheint der C-Terminus deutlich vom erwarteten C-Terminus abzuweichen.

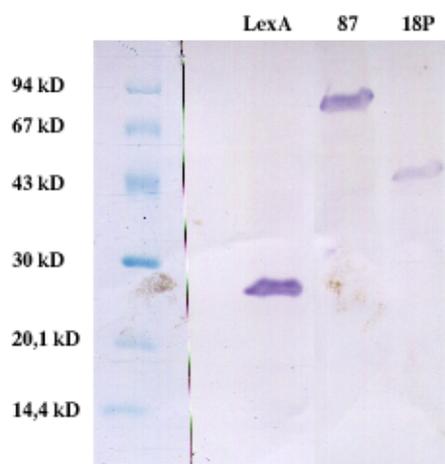


Abbildung 7.13: Expressionsnachweis der LexA-87- und LexA-18P-Hybride.

Zusätzlich wurde eine mögliche Selbstaktivierung überprüft (s. 6.3.7). Dabei konnte überraschend festgestellt werden, dass viele der Hybride ein Wachstum der Hefe auf Leucinmangelmedium induzieren können, ohne dass ein Angiogenin-LexA-Hybrid vorhanden sein muss.

Nr.	Selbst?	Interaktion?
8	ja	-
53	nein	schwach(↓)(weiß)
73	schwach	schwach
84	nein	nein
87	ja	-
K	nein	ja(weiß)
18P	nein	schwach(↓)
59P	ja	-
64P	ja	-
80P	ja	-
84P	nein	schwach(↓)
91P	ja	-
105P	nein	ja(weiß)

Tabelle 7.10: Ergebnisse des Selbstaktivierungs- und Interaktionstests.

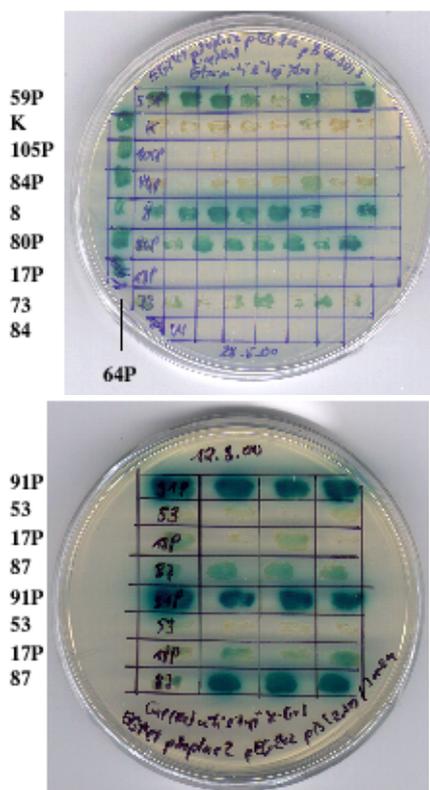


Abbildung 7.14: Gal/Raf^{u⁻h⁻1⁻trp⁻} BU X-Gal Nährböden mit den in nebenstehender Tabelle getesteten Klonen. Platte oben: 59P, K, 105P, 84P, 8, 80P, 17P, 73, 84, 64P jeweils 8 Klone, Platte unten: 91P, 53, 18P, 87 jeweils 8 Klone
Die Autoaktivatoren geben sehr intensive Blaufärbung, während alle anderen Klone praktisch gar keine Galactosidaseaktivität zeigen. Selbst das Wachstum ist eher verhalten.

Von 14 untersuchten Klonen zeigten 7 deutliche und einer schwache Selbstaktivierung. Von den nicht zur Selbstaktivierung neigenden Klonen zeigt keiner deutliche Interaktion mit dem Ang-B42AD-Hybrid. Die lacZ-Aktivität von 73, 18P und 84P ist sehr schwach, bei den Klonen 53, K und 105P trotz Wachstums auf den Leucinmangelmedien überhaupt nicht vorhanden.

7.13 Angiogeninmutanten R66A und H84S

Die Aminosäure Arg-66 liegt in der Bindungsstelle des Angiogenins, wo Angiogenin an Endothelzellen bindet und somit letztlich Angiogenese induziert. Die Mutation zu Alanin führt zum Verlust der angiogenetischen Aktivitäten. His-84 ist Teil der LHG-Sequenz, die vermutlich hauptsächlich für die degranulationshemmenden Eigenschaften des Angiogenins verantwortlich ist. Eine Mutation zu Serin bringt eine polare aber nicht mehr basische Aminosäure an diese Stelle. Damit wird diese Stelle derart abgeändert, dass die degranulationsinhibierenden Eigenschaften verschwinden sollten.

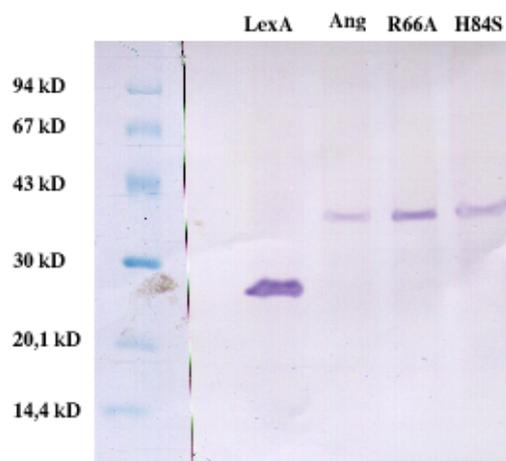


Abbildung 7.15: Expressionsnachweis der LexA-Angiogenin-, LexA-R66A- bzw. LexA-H84S-Hybride.

Um herauszufinden, ob diese Mutationen zum Verschwinden der beobachteten Interaktionen führen, werden Hefezellen, die bereits mit pEG202/R66A bzw. pEG202/H84S transfiziert worden sind, mit einigen der sequenzierten pB42AD-Konstrukten transfiziert (s. 6.3.5). Auf Gal/Raf⁻h⁻l⁻trp⁻-X-Gal Nährböden werden solche Klone jedoch alle intensiv blau (s. Abbildung 7.16). Im Vergleich zur Blaufärbung von EGY48[pEG202/Ang]-Wildtypklonen lassen sich keine Intensitätsunterschiede in der Blaufärbung erkennen. Dies bedeutet, dass sich die Mutationen auf jeden Fall nur wenig auf die Interaktion

auswirken. Feststellbar ist hier nur, dass die Interakteure 76, 18P und 87 eine geringere Blaufärbung als die übrigen Interakteure verursachen, wobei aber keine sichtbaren Auswirkungen der Mutationen beobachtbar sind.



Abbildung 7.16: EGY48 auf Gal/Raf $u^{-}h^{-}1^{-}trp^{-}$ BU X-Gal. Die Klone auf der linken Platte sind mit pEG202/Ang transfiziert, die auf der rechten Platte mit pEG202/R66A. Getestet wurde die Interaktion mit 64P, 18P, 93, 84, 84P, 73, 76, 103, K, 91P, 67P, 87, 105P, 59P, 71P und 80P. Zwischen der Blaufärbung der Klone auf der linken Platte und der Blaufärbung auf der rechten Platte gibt es keine Unterschiede: Die Mutation R66A scheint für die Interaktion ohne Bedeutung zu sein. Ähnliches gilt auf im Falle H84S, was aber nicht gezeigt ist.

Um festzustellen, ob sich mögliche Abschwächungen eventuell quantitativ erfassen lassen, wird mit allen Klonen ein sog. ONPG-Assay durchgeführt (s. 6.3.11). Mit diesem Test wird die Aktivität der von einer Interaktion hervorgerufenen β -Galactosidase in Form von sog. β -Galactosidaseeinheiten gemessen. Diese sind in nachfolgender Tabelle für jeden Interakteur aufgelistet und sind letztlich ein Maß für die Interaktionsstärke.

Nr.	Name	Ang	H84S	R66A	%(H84S)	%(R66A)
53	Hämopexin	124	74	97	59%	78%
73	VAV Onkogen	139	72	141	52%	101%
76	DEAD-BOX-Protein p62	3	15	14	490%	450%
84	Vitronectin	56	28	67	50%	120%
87	Tyrosinphosphoprotein p62	9	7	9	78%	100%
103	Inter- α -Trypsininhibitor	111	67	78	60%	71%
K	Cyclin G1 bind. Protein	68	79	113	117%	166%

18P	Fibulin 1C	126	96	25	76%	20%
59P	EGFR	129	102	96	79%	75%
64P	Fibronectin	98	72	150	73%	153%
67P	E1B 55kD ass. Protein	80	77	89	96%	111%
71P	PAPP A	181	119	136	66%	75%
80P	IGFBP1	154	107	167	70%	108%
84P	Meltrin S	119	74	153	62%	129%
91P	GAP ass. Tyr.phosphoprotein	131	58	98	44%	75%
105P	α -Actinin 4	154	154	201	100	130

Tabelle 7.11: Tabelle mit den für den Angiogeninwildtyp und die H84S bzw. R66A-Mutanten gemessenen Galactosidaseeinheiten (s. 6.3.11). Die beiden letzten Spalten enthalten Prozentzahlen, aus denen sich die Auswirkungen der Mutation ablesen lassen. Für den Ang-Wildtyp ist immer 100% gesetzt.

Da es in dieser Messung darum geht, Auswirkungen von Mutationen festzustellen, wurden die drei Angiogeninvarianten bezüglich eines Interakteurs immer gleichzeitig vermessen, damit sich „Fremdfaktoren“, vor allem Unterschiede in der Konzentration der ONPG-Stammlösung und Temperaturschwankungen im Inkubator, in allen drei Fällen gleichermaßen auf die Galactosidaseaktivität auswirken und die Vergleichbarkeit somit verbessert wird. Trotzdem sind die mittleren Fehler ziemlich hoch (bis zu 50%). Dies hängt auch damit zusammen, dass Klonvariabilitäten hinsichtlich der Galactosidaseaktivität beobachtet wurden, was besonders bei den Klonen 59P, K und 71P extrem war.

Aus obiger Tabelle lassen sich zwar mutationsbedingte Intensitätsabnahmen und auch -zunahmen ablesen, wegen der großen Meßungenauigkeit lässt es sich aber nicht sagen, ob diese wirklich bedeutungsvoll sind. Einzig beim Fibulin 1C bewirkt die R66A-Mutation ein signifikantes Absinken der β -Galactosidaseaktivität. Sonst aber haben die Mutationen keine messbaren Auswirkungen auf die Interaktionsstärke. Das Ergebnis der qua-

litativen Beobachtung wird also im Wesentlichen nur bestätigt: Die Mutationen führen zu keinen nennenswerten Abschwächungen der Angiogenin-Interakteur-Wechselwirkung. Im Gegenteil, bei Klon 76, dem einzigen Fall einer deutlichen Intensitätsveränderung, liegt sogar eine Intensitätszunahme vor.

7.14 Direkte Interaktionstest auf Proteinebene

Die mit dem Two-hybrid-System gefundenen Interakteure IGFBP1, Fibronectin, EGFR sowie als Positivkontrolle hPRI und der Angiogenin-Antikörper (Ang-AK) standen als Proteine zur Verfügung. Es wurde getestet, ob sich die Interaktion mit Angiogenin auch ohne Two-Hybrid-System nachweisen lässt. Dazu wurden mehrere Wege beschritten.

Zunächst wurde versucht, die Interaktion mit einem ELISA-Verfahren nachzuweisen (s. 6.2.3). Es war jedoch in keinem Fall möglich, eine Bindung von Angiogenin an eines der genannten Proteine zu belegen. Die Bindung von Angiogenin an den Angiogenin-

Antikörper war zwar beobachtbar aber nicht die Bindung von Angiogenin an hPRI, einem lange bekannten und sehr starken Interakteur des Angiogenins.

Schließlich wurde Angiogenin und ebenso der Angiogenin-Antikörper mit Alkalischer Phosphatase konjugiert (s. 6.2.2, 6.2.5). Die Interakteure wurden nach SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde dann in einer Lösung des Konjugats inkubiert. In Fall der Ang-AK-AP-Konjugats muss die Membran vorher in einer angiogeninhaltigen Lösung in-

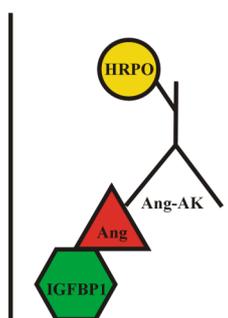


Abbildung 7.17: Schematische Darstellung des ELISA-Bindungstests: Gezeigt ist ein „well“ einer Mikrotiterplatte, die mit IGFBP1 beschichtet ist. Angiogenin bindet an IGFBP1 (was aber nicht gezeigt werden konnte.) und der Komplex wird mit einem Konjugat aus HPRO und Ang-AK nachgewiesen.

kubiert werden.

Wenn sich Konjugat an die Banden des Interakteurs bindet, so ist die Bindung von Angiogenin an den Interakteur bewiesen. Positive Ergebnisse wurden nur beim Angiogenin-AP-Konjugat erhalten.

Dieses band an Ang-AK, hPRI und EGFR aber nicht an IFGBP1 und Fibronectin. Die Bindung an hPRI und EGFR ist allerdings nur schwach. Wurde der Nachweis mit dem Ang-Ak-AP-Konjugat geführt, so war außer der Bindung an die Ang-AK-Bande keinerlei Bindung zu sehen.

Abbildung 7.19 zeigt den Versuch eines Nachweises, dass Angiogenin an seinen Antikörper, an hPRI und an EGFR bindet. Die geblotteten Proteine wurden mit einem Ang-AP-Konjugat nachgewiesen. Im Falle des Angiogenin-AKs ist eine Interaktion deutlich, in den anderen beiden Fällen sehr schwach. Zumindest die Bindung an hPRI müsste stark sein, da es sich um einen bekanntermaßen hochaffinen

Angiogenin-Inhibitor handelt. Dass sich dies nicht zeigen lässt, liegt vermutlich daran, dass die Eigenschaften des Angiogenins im Konjugat mit AP zu

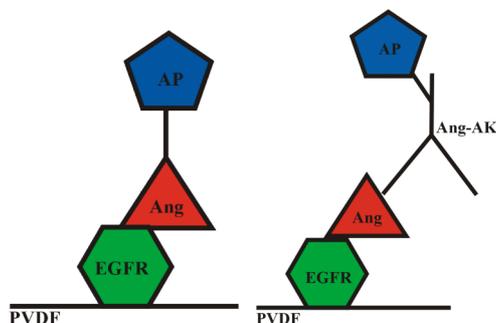


Abbildung 7.18: Schematische Darstellung eines Bindungsnachweises von Angiogenin an EGFR: Zuerst wird EGFR auf eine PVDF-Membran übertragen (Elektroblotting). Linkes Bild: Direkter Nachweis der Bindung durch Konjugat aus Angiogenin und AP. Rechtes Bild: Nachweis durch Konjugat aus Ang-AK und AP. Dazu muss die Membran vorher mit Angiogeninlösung behandelt werden, um einen EGFR-Ang-Komplex zu erzeugen.

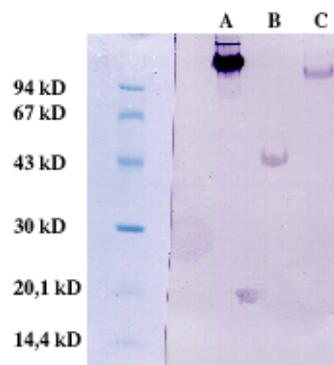


Abbildung 7.19: Nachweis von Ang-Interaktionen mit Hilfe eines Ang-AP-Konjugats. A: Ang-AK, B: hPRI, C: EGFR

stark verändert sind. Alternativ wurde versucht eine Angiogeninbindung mit nicht fixiertem Interakteur, also mit frei in Lösung befindlichem EGFR, Fibronectin bzw. IGFBP1 zu zeigen (s. 6.2.4). Das Angiogenin wurde dazu an Sepharose gekoppelt (s. 6.2.1). Aber mit diesem der Immunpräzipitation ähnlichem Verfahren gelang es in keinem Fall eine Wechselwirkung mit Angiogenin nachzuweisen.

8 Diskussion

Angiogenin ist ein Protein, welches an Endothelzellen, glatte Muskelzellen und PMNL bindet. PMNL werden durch Angiogenin in ihrer Degranulation gehemmt (Tschesche et al. 1994), bei glatten Muskelzellen führt Angiogenin zu einer Inhibierung der Proliferation (Hatzi et al. 1999), Endothelzellen steigern hingegen unter Angiogenineinfluss ihre Proliferation vorausgesetzt sie sind noch nicht konfluent (Hu et al. 1994a). Zudem wird Angiogenin sowohl von Endothel- wie von glatten Muskelzellen internalisiert und zum Zellkern transportiert. All dies legt das Vorhandensein eines membranständigen Rezeptors nahe.

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des LexA Yeast Two-Hybrid Systems (Clontech) nach potenziellen Angiogenin-Bindungspartnern gesucht, in der Hoffnung einen Rezeptor zu finden. Dazu wurde eine fetale Leber-cDNA-Bank sowie eine Plazenta-cDNA-Bank durchsucht.

8.1 Vorgehensweise

Angiogenin wurde in den Expressionsvektor pEG202 inkloniert. Nach Transfektion von EGY48[p8oplacZ] (*S. cerevisiae*) mit dem Konstrukt wurde die Expression des Hybrids aus LexA und Angiogenin nachgewiesen. Das Hybrid ist zudem nicht in der Lage, Expressionsinduktion des LEU2- bzw. lacZ-Gens hervorzurufen. Die Mindestvoraussetzungen für die Benutzung des Two-Hybrid Systems lagen also vor. Die mit pEG202/Ang transfizierten Zellen wurden dann mit der cDNA-Bank transfiziert, wobei die cDNAs im Expressionsvektor pB42AD enthalten waren. Dieser veranlasst EGY48 zur Expression eines Hybrids aus einem Protein gemäß der inklonierten cDNA (pot. Interakteur) und einem Transkriptionsaktivatorprotein. Letzteres

bewirkt nur dann eine Expressionsinduktion des LEU2- und des lacZ-Gens, wenn das Angiogenin mit dem pot. Interakteur wechselwirkt. EGY48 kann dann auf Leucinmangelmedium wachsen. Die β -Galactosidase (lacZ) katalysiert zudem die Umwandlung von zugesetztem X-Gal zu einem blauen Farbstoff. Es wurden viele Klone gefunden, die auf Leucinmangelmedium blaue Kolonien bildeten. Aus diesen wurde der pB42AD isoliert und in einigen Fällen die cDNA sequenziert. Mit Hilfe des Programmes „Blast“ (NCBI) gelang es schließlich durch Vergleich der gefundenen Sequenzen mit bekannten Sequenzen in einer Proteindatenbank eine Reihe von Proteinen zu identifizieren.

Das Durchsuchen der cDNA-Banken wurde mit zwei verschiedenen LexA-Ang-Hybriden durchgeführt. In einem Hybrid sind LexA und Angiogenin durch zwei Aminosäuren getrennt, in dem anderen beträgt die Länge des „Spacers“ dreizehn Aminosäuren. Letzteres Hybrid ergab wesentlich bessere Ergebnisse: Es bewirkte weniger falsch positive Klone und die durchschnittliche Länge der cDNAs war wesentlich länger. Diese Effekte werden auf Abschirmeffekte zurückzuführen sein. Das größere LexA (22 kD) wird das kleinere Angiogenin (14,4 kD) im Hybrid teilweise verdecken. Werden die beiden Proteine durch einen längeren Abstand voneinander getrennt, so wird die Zugänglichkeit des Angiogenins verbessert.

8.2 Identifizierte Angiogenin-Interakteure

Unter den entdeckten potenziellen Interaktionspartnern des Angiogenins waren sowohl extrazelluläre Proteine (IGFBP1, PAPP A, Fibronectin, Vitronectin, Inter- α -Trypsininhibitor, Fibulin 1C, Meltrin S, Fragment des EGFR, Hämopexin) als auch viele intrazelluläre Proteine. Einige sind an Signaltransduktionprozessen beteiligt (GAP-assoziiertes Tyrosinphosphopro-

tein p62, Ubiquitin-bindendes Tyrosinphosphoprotein p62, VAV1-Onkogen) einige Proteine befinden sich im Zellkern (DEAD-Box-Protein p62, E1B-55kDa-bindendes Protein, E3-3orf1, DNA mismatch repair protein MLH3, Cyclin G1 bindendes Protein 1). Mit der δ -Aminolävulinatsynthase gab es auch ein mitochondriales Protein. Allerdings wurden von den meisten Proteinen N-terminal mehr oder weniger stark verkürzte Varianten gefunden. N-terminal vollständig konnten das DEAD-Box-Protein p62, das IGFBP1 und der Inter- α -Trypsininhibitor gewonnen werden, beim Cyclin G1 bindendem Protein fehlten N-terminal nur 4 Aminosäuren. Zum DNA mismatch repair protein wurde eine Variante gefunden, die am N-Terminus um sogar acht Aminosäuren länger war als bisher bekannt. Beim α -Actinin 4 und beim E1B-55kD assoziiertem Protein sind die gefundenen cDNA-Fragmente zu kurz, um alle Aminosäuren kodieren zu können, aus denen das entsprechende Protein nach heutigem Kenntnisstand besteht. α -Actinin 4 ist aus 884 Aminosäuren zusammengesetzt, das cDNA-Fragment kann aber nur für 600 Aminosäuren kodieren. Die cDNA des E1B 55kD assoziiertem Protein kann 730 Aminosäuren kodieren, obwohl das gesamte Protein aus 856 Aminosäuren besteht. Entweder liegen hier Varianten dieser Proteine vor, die am C-Terminus stark verkürzt sind oder aber es handelt sich um neue, bislang unbekannte Varianten, die durch alternatives Spleißen entstanden sein könnten. Die letzte Vermutung wird durch das Kernprotein E3-3 orf1 und das GAP assoziierte Tyrosinphosphoprotein p62 untermauert. In diesen beiden Fällen konnten Fragmente gefunden werden, denen innerhalb der Sequenz 35 bzw. 45 Aminosäuren fehlen in Bezug auf die bei NCBI veröffentlichte Sequenz. Die Aminosäuren könnten von einem entsprechendem Exon kodiert werden, welches durch alternatives Spleißen entfernt wurde.

In Form des EGFR scheint sogar ein Rezeptor unter den Interakteuren zu

sein, wobei es sich allerdings nur um ein 193 Aminosäuren langes alternativ gespleißtes Fragment handelt, welches keine Transmembrandomäne geschweige denn eine cytosolische Domäne hat. Es liegt also keine Membranständigkeit vor, was die Hypothese, es könnte sich hier um einen Rezeptor handeln, entkräftet. Ähnliches gilt für Meltrin α , wo auch nur das verkürzte, nicht membranständige Meltrin S gefunden werden konnte.

Da der epidermale Wachstumsfaktor, der Ligand des EGFR, in seine Zielzellen EGFR-vermittelt eindringt, ist schon früher daran gedacht worden, dass EGFR Angiogenin binden könnte (Hu et al. 2000). Die Autoren schließen so etwas aber deshalb aus, da die Internalisation des EGF wesentlich länger dauert (ca. 4 h) als die des Angiogenins (ca. 5 min).

8.3 Ergebnisse der Expression von LexA-Interakteur-Hybriden

Die cDNA-Fragmente der Interakteure wurden in den pEG202 einkloniert, wodurch in EGY48 LexA-Interakteur-Hybride erfolgreich exprimiert werden konnten.

8.3.1 Hybridaustausch

Die Ang-cDNA wurde mit pB42AD ligiert, so dass der Two-Hybrid Test unter „ungekehrten Vorzeichen“ durchgeführt werden konnte: Ist eine Interaktion auch dann noch nachweisbar, wenn Angiogenin als Hybrid mit B42 und die Interakteure als Hybrid mit LexA vorliegen? Leider war es nicht möglich, die Gültigkeit der beobachteten Interaktionen in dieser Weise zu unterstreichen. Viele Hybride aus LexA und potenziellen Angiogeninterakteuren erwiesen sich als Autoaktivatoren und waren für das Two-Hybrid System nicht geeignet. Die übrigen getesteten Proteine-Hybride konnten EGY48 zu keiner bzw.

nur zu äußerst schwacher lacZ-Expression anregen. Man könnte das Ausbleiben der lacZ-Induktion als Anzeichen dafür nehmen, dass alle Interaktionen falsch positiv sind. Dagegen spricht aber, dass alle bekannten Möglichkeiten, die zum Auftreten falsch positiver Klone führen, während des Screenings ausgeschlossen worden sind. Die ergriffenen Maßnahmen seien noch einmal kurz aufgeführt: Es wurden nur solche Klone analysiert, die sowohl LEU2-Expression wie auch lacZ-Expression zeigten. Ein unspezifisches Binden der B42-Interakteur-Hybride an bestimmte Promotorregionen anstelle an das LexA-Ang-Hybrid ist daher vermieden worden. In keinem Fall konnte von einem B42-Interakteur-Hybrid LEU2-Induktion hervorgerufen werden ohne dass das LexA-Ang-Hybrid zugegen war. Kein B42AD-Hybrid wirkte demnach als Autoaktivator. Wurde die Expression der B42AD-Hybride durch Glucose unterdrückt, so konnte keine Leu2-Expression beobachtet werden. Dies beweist, dass das LexA-Ang-Hybrid in den Zellkern der Hefe gelangen muss. Alle sequenzierten Interakteure wurden hinsichtlich einer Bindung an LexA-Progelatinase B und LexA-TIMP4 sowie LexA-TIMP1 getestet. Lediglich Meltrin S und Fibulin 1C zeigte mit TIMP4 eine Wechselwirkung ansonsten waren alle Interaktionen spezifisch gegenüber Angiogenin.

Möglicherweise ist der Grund für die fehlende lacZ-Aktivierung, dass das B42-Ang-Hybrid für das Two-Hybrid System ungeeignet ist. In diesem Hybrid werden mit B42 ein sehr saures Protein (pI 4,58) und mit Angiogenin ein sehr basisches Protein (pI 9,4) zusammengebracht. Vielleicht treten zwischen dem N-Terminus und C-Terminus so starke Wechselwirkungen auf, dass die am Hybrid beteiligten Proteine sich nicht mehr separat falten können und der modulare Aufbau verloren geht. Es entsteht vielmehr eine Tertiärstruktur, die weder die Eigenschaften des Angiogenins noch die des B42 aufweist. Das B42-Protein könnte also seine Transkriptionsaktivatoreigenschaften verloren

haben.

Der Grund für die Autoaktivatoreigenschaften einiger Proteine könnte im Zusammenhang mit ihren niedrigen pI-Werten stehen wie folgende Tabelle nahe legt.

Nr.	Name	pI	Selbst?
80P	IGFBP1	5,09	ja
105P	α -Actinin 4	5,24	nein
87	Tyrosinphosphoprotein p62	5,29	ja
O	E3-3 orf1	5,30	
91P	GAP- ass. Tyrosinphosphoprotein p62	5,37	ja
64P	Fibronectin	5,74	ja
71P	PAPP A	5,97	
103	Inter- α -Trypsininhibitor	6,31	
59P	EGFR	6,46	ja
53	Hämopexin	6,64	nein
67P	E1-55kD-ass. Protein 5	6,72	
84	Vitronectin	7,22	nein
73	VAV-Onkogen	7,85	schwach
84P	Meltrin S	7,98	nein
18P	Fibulin 1C	8,30	nein
38P	DNA mismatch repair protein	8,51	
76	DEAD-Box-Protein p62	9,01	
K	Cyclin G1 bindendes Protein	9,58	nein

Tabelle 8.2: Interakteure mit berechneten pI-Werten (Programm „ProtParam“, <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Aus der „Selbst?“-Spalte lässt sich entnehmen, ob es sich bei dem Interakteur um einen Autoaktivator handelt.

Mit Ausnahme von 105P und 59P haben nämlich alle Autoaktivatoren einen pI kleiner als sechs. Es ist ein Charakteristikum von Transaktivatorproteinen

einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren zu haben oder zumindest einen Bereich aufzuweisen, wo saure Aminosäuren gehäuft liegen. Letzteres trifft auf 59P zu: Im Bereich zwischen Aminosäure 543 und 554 liegen immerhin fünf Glutamat.

8.3.2 Molekularmassenbestimmung der Ang-Interakteure

Die Expression von LexA-Interakteur-Hybriden in EGY48 erlaubte mittels Western Blot die Bestimmung der Molekularmassen einiger Angiogenin-Interakteure. Dies war über die cDNA-Sequenzen nicht möglich, da diese nur 600 Basenpaare weit ansequenziert worden waren. Die gemessenen Werte wurden mit Molekularmassen verglichen, die aus Sequenzen aus der NCBI-Datenbank berechnet wurden. Stimmen berechnete und beobachtete Molekularmasse gut überein, so ist das Proteinfragment C-terminal vollständig. Bei großen Abweichungen ist entweder der C-terminus verkürzt oder es liegt eine andere Variante des Proteins vor als bislang bekannt (alternativ gespleißte Proteine).

Name	MW gem.	MW ber.
EGFR	21 kD	21 kD
Meltrin S	18 kD	18 kD
GAP ass. Tyr.phosphoprotein p62	13 kD	13 kD
Cyclin G1 bindendes Protein	18 kD	17 kD
Vitronectin	43 kD	42 kD
IGFBP1	28 kD	24 kD
Fibronectin	11 kD	16 kD
VAV Onkogen	21 kD	28 kD
Hämopexin	18	24 kD

Tabelle 8.2: Molekularmassen (MW) aller vermessenen Interakteure, bei denen zwischen gemessener Molekularmasse (MW gem.) und berechneter (MW ber.) keine oder nur geringe Unterschiede bestehen (s. Tabelle 7.9).

Ob die Abweichungen im Falle des VAV Onkogens oder des Hämopepxins tatsächlich auf verkürzte Varianten der Proteine schließen lassen, ist hier schwer zu sagen, da die Bestimmung von Molekularmassen aus Western Blots ungenau ist. Zweifelsfrei große Abweichungen gab es beim α -Actinin 4 Fragment, was schon aus der Analyse der cDNA zu erwarten war. Würde das Proteinfragment identisch mit α -Actinin sein, so wäre eine Masse von 92 kD zu erwarten, tatsächlich wurden aber nur 72 kD gemessen. Auch das gefundene Ubiquitin-bindende Tyrosinphosphoprotein p62 sieht höchstwahrscheinlich anders aus als die bislang veröffentlichte Variante. Für dieses Protein konnte eine Größe von 63 kD ermittelt werden. Tatsächlich wäre aber unter Berücksichtigung der N-terminalen Verkürzung lediglich eine Größe von 37 kD zu erwarten. Dies kann nur so erklärt werden, dass der C-Terminus deutlich anders aussieht als erwartet. Hier könnten also Proteine aufgespürt worden sein, die bislang unbekannt sind.

8.4 Bewertung der Interaktionen

Angiogenin ist ein sekretiertes Protein, es kommt im Plasma vor und wird von Endothelzellen und glatten Muskelzellen aufgenommen und dort in den Zellkern transportiert. Da unter den entdeckten Interakteuren viele extrazelluläre Proteine und Kernproteine sind, muss eine Relevanz der Wechselwirkung mit Angiogenin als zumindest möglich angesehen werden. Dies trifft auch für die gefundenen cytosolischen Proteine zu, da wenigstens in Bezug auf glatte Muskelzellen das Vorhandensein von Angiogenin im Cytosol beschrieben ist. Eine Ausnahme bildet wohl allerdings die δ -Aminolävulinatsynthase, welche ein mitochondriales Protein zur Hämsynthese ist. Hier wird ein Interaktionsartefakt vorliegen, da Angiogenin in Mitochondrien nicht vorkommt.

Angiogenin induziert Angiogenese, ein Prozess, der die Proliferation, Mi-

gration und Invasion von Endothelzellen in die ECM erfordert. Eine Beteiligung des Angiogenins ist in all diesen Prozessen nachgewiesen. Es ist nun interessant, dass unter den gefundenen Angiogenin-Interakteuren Proteine sind, die an Proliferations und Migrationsereignissen beteiligt sind. IGFBP1 bindet an den Insulin-like-growth-Faktor, der Zellteilung anregt. α -Actinin 4 ist ein actinbindendes Protein, welches eine Rolle bei den Veränderungen des Cytoskeletts in wandernden Zellen zugeschrieben wird. Das DEAD-Box-Protein p62 ist eine RNA-Helicase, d.h. es muss bei der Transkription beteiligt sein, die in sich teilenden Zellen natürlich verstärkt ablaufen muss. Das E1B-55kD-bindende Protein spielt eine bislang unverstandene Rolle beim Transport von mRNA aus dem Zellkern. Auch die Bindung von Angiogenin an Fibronectin, Vitronectin oder Fibulin 1C wäre nicht abwegig, da Angiogenese mit lokalen Umstrukturierungen der ECM verbunden ist und zumindest für Fibronectin eine entscheidende Rolle in diesem Zusammenhang bekannt ist.

Da von den meisten Proteinen die Funktionen kaum verstanden werden, ist es praktisch nicht möglich, die Bedeutung einer Wechselwirkung mit Angiogenin konkret zu bewerten oder gar einen Wirkmechanismus zu postulieren.

Dies trifft noch stärker auf die degranulationshemmende Wirkung des Angiogenins auf PMNL zu. Der Prozess der Degranulation ist zwar vergleichsweise gut untersucht und die Beteiligung einer Reihe von Proteinen von Signaltransduktionskaskaden nachgewiesen. Das Angiogenin kommt aber innerhalb von Neutrophilen nicht vor, so dass die in dieser Arbeit identifizierten intrazellulären Proteine keinen Ansatz für die Wirkung des Angiogenins auf Neutrophile geben. Auch die Bindung von Angiogenin an die extrazellulären Proteine lässt keinen Grund einer Degranulationshemmung erkennen

zumal der erhoffte Rezeptor nicht gefunden werden konnte.

Vor dem Hintergrund, dass Angiogenin in den Zellkern transportiert wird, sind besonders die gefundenen Kernproteine vielversprechend auch weil dieser Aspekt des Angiogenins am wenigsten erforscht ist. Letztlich werden eindeutige und klarere Antworten bezüglich der physiologischen Bedeutung der beobachteten Wechselwirkungen mit Angiogenin aber erst gegeben werden können, wenn die Funktion der Interaktionspartner detaillierter aufgeklärt ist.

8.5 Ergebnisse der Interaktionstests ohne Two-Hybrid System

Um eine mit dem Two-Hybrid System gefundene Proteininteraktion als gesichert ansehen zu können, sollte die Interaktion mit einem unabhängigen Verfahren überprüft werden. Es gelang aber leider nicht eine Bindung von Angiogenin an Fibronectin, IGFBP1 und EGFR mit biochemischen Methoden zu beweisen. Beim EGFR könnte der Grund darin liegen, dass im Grunde genommen nur ein Fragment des EGFR aus 193 Aminosäuren gefunden wurde, von denen nur 127 Aminosäuren mit dem käuflich erworbenen EGFR übereinstimmen. Vielleicht sind für die Angiogeninbindung gerade die 66 anderen Aminosäuren verantwortlich.

Natürlich ist auch denkbar, dass dies an der vollständigen Glykosylierung und den korrekt geknüpften Disulfidbrücken liegt, die die aus natürlichen Quellen isolierten Proteine besitzen nicht aber die im Cytosol einer Hefezelle im Two-Hybrid System exprimierten. Mit extrazellulären Proteinen konnten jedoch schon einige Wissenschaftler das Two-Hybrid System erfolgreich anwenden (Zhu et al. 1997, Pförtner-Taliana et al. 2000).

Auch die klassischen Interaktionstest sind nicht unproblematisch: Bei den

in dieser Arbeit verwendeten Verfahren war immer ein Interaktionspartner fixiert: Entweder lagen die Angiogenin-Interakteure an Oberflächen adsorbiert vor (PVDF-Membran beim Western Blotting) oder das Angiogenin war an Sepharose gekoppelt. Dies kann dazu führen, dass die für eine Proteininteraktion notwendigen Bereiche eines Proteins abgeschirmt vorliegen und nicht mehr gut zugänglich sind.

Möglicherweise waren die ausgewählten biochemischen Interaktionstests einfach nicht empfindlich genug, die mit dem Two-Hybrid System gefundenen Interaktionen detektieren zu können. Das Two-Hybrid System zählt immerhin zu den sensitivsten Methoden. Vielleicht ist hier nur ein hochempfindliches, modernes Verfahren wie das Plasmonresonanzverfahren (Biacor) geeignet.

8.6 Ergebnisse mit R66A und H84S

Für die R66A-Variante des Angiogenins wären Abschwächungen der Interaktionen zu erwarten, da für R66A ein Verlust der angiogenetischen Eigenschaften nachgewiesen ist. Dies wurde aber nur im Fall des Fibulin 1C gemessen, sonst gaben die Mutationsexperimente keinen Hinweis darauf, ob die beobachteten Interaktionen etwas mit der physiologischen Rolle des Angiogenins zu tun haben. Ähnlich verhält es sich mit der H84S-Variante. Die Aminosäuren 83-95 werden für die Degranulationshemmung gegenüber PMNL verantwortlich gemacht. Fehlen die ersten drei Aminosäuren (LHG), so ist das restliche Fragment nicht mehr in der Lage, degranulationshemmend zu wirken. Die Mutation H84S betrifft das Histidin in dieser LHG-Sequenz, wodurch hier eine geladene, polare Aminosäure durch das ungeladene aber polare Serin ersetzt wird. Dadurch ist zumindest ein drastisch verändertes degranulationsinhibierendes Verhalten des Angiogenins zu erwarten. Leider

hat aber auch die H84S-Mutation keine Auswirkungen auf die gefundenen Wechselwirkungen.

Das alles ist aber kein Beweis für den falsch positiven Charakter der Interaktionen, da vorstellbar ist, dass ein physiologisch inaktives Angiogenin dennoch weiterhin an seine Bindungspartner bindet, weil die Bindung eben nur eine von mehreren Voraussetzung für die biologische Aktivität sein könnte.

Literatur

Acharya, K.R., Shapiro, R., Allen, S.C., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1994) Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 2915-2919

Argaves, W.S., Dickerson, K., Burgess, W.H., Ruoslathi, E. (1990) Fibulin is an extracellular matrix and plasma glycoprotein with repeated domain structure. *J. Biol. Chem.* **111**, 3155-3164

Badet, J., Soncin, F., Guitton, J.-D., Lamare, O., Cartwright, T., Barritault, D. (1989) Specific binding of angiogenin to calf pulmonary artery endothelial cells *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 8427-8431

Bartel, P.L., Chien, C.-T., Sternglanz, R., Fields, S. (1993a) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions in *Cellular Interactions in Development, A Practical Approach*, ed. Hartley, D.A. (IRL Press at Oxford University Press), 153-179

Bartel, P., Chien, C., Sternglanz, R., Fields, S. (1993b) Elimination of False Positives That Arise in Using the Two-Hybrid System. *BioTechniques* **14**, 920-924

Bicknell, R., Vallee, B.L. (1988) Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5961-5965

Bicknell, R., Vallee, B.L. (1989) Angiogenin simulates endothelial cell prostacyclin secretion by activation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 1573-1577

Bläser, J., Triebel, S., Kopp, C., Tschesche, H. (1993) A Highly Sensitive Immunoenzymometric Assay for the Determination of Angiogenin. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **31**, 513-516,

Brinkman, A., Groffen, C., Kortleve, D.J., Geurts van Kessel, A., Drop, S.L. (1998) Isolation and characterisation of a cDNA encoding for low molecular weight insulin-like growth factor binding protein (IBP-1). *EMBO* **7**,2417-2423

Brockhaven Databank, Datei 1ANG.pdb, <http://www.rcsb.org/pdb>

Bussolino F., Mantovani, A., Persico, G. (1997) Molecular mechanisms of blood vessel formation *TIBS* **22**, 251-256

Carmeliet, P., Collen, D. (1997) Molecular analysis of blood vessel formation and disease. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **42**, H2091-H2104

Carpenter, G. (1987) Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 881-914

Clontech, *Matchmaker LexA Two-Hybrid System, User Manual (PT3040-1*

Denkinger, D.J., Borges, C.R., Bulter, C.L., Cushman, A.M., Kawahara, R.S.

(2000) Genomic organization and regulation of vav proto-oncogene. *Biochem. Biophys. Acta* **1491**, 253-262

Enghild, J.J., Thogersen, I.B., Pizzo, S.V., Salvesen, G. (1989) Analysis of inter-alpha-trypsin inhibitor and a novel trypsin inhibitor, pre-alpha-trypsin inhibitor, from human plasma. Polypeptide chain stoichiometry and assembly by glycan. *J. Biol. Chem.*, **264**, 15975-15981

Fett, J.W., Strydom, D.J., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Rioridan, J.F., Vallee, B.L. (1985) Isolation and Characterization of Angiogenin, an Angiogenic Protein from Human Carcinoma Cells. *Biochemistry* **24**, 5480-5486

Fields, S., Sternglanz, R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions *Trends in Genetics (TIG)* **10**, 286-292

Gabler, S., Schutt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T., Dobner, T. (1998) E1B-55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* **72**, 7960-7971

Gilpin, B.J., Loechel, F., Mattei, M.G., Engvall, E., Albrechtsen, R., Wewer, U.M. (1998) A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 157-166

Hallahan, T.W., Shapiro, R., Vallee, B.L. (1991) Dual site model for the or-

ganogenic activity of angiogenin *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**, 2222-2226

Hatzi, E., Badet, J. (1999) Expression of receptors for human angiogenin in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Biochem.* **260**, 825-832

Hatzi, E., Bassaglia, Y., Badet, J. (2000) Internalisation and Processing of Human Angiogenin by Cultured Aortic Smooth Muscle Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 719-725

Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H., Hirohashi, S. (1998), Actinin-4, a novel actin binding protein associated with cell motility and cancer invasion. *J. Cell. Biol.* **140**, 1383-1393

Hu, G., Strydom, D.J., Fett, J.W., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1993a) Actin is a binding protein for angiogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **??**, 1217-1221

Hu, G., Riordan, J.F. (1993b) Angiogenin Enhances Actin Acceleration Of Plasminogen Activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 682-687

Hu, G., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1994) Angiogenin promotes invasiveness of cultures endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**, 12096-12100

Hu, G., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1997a) A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*

94, 2204-2209

Hu, G. (1997b) Limited Proteolysis of Angiogenin by Elastase is Regulated by Plasminogen. *J. Prot. Chem.* **16**, 669-679

Hu, G., Xu, C., Riordan, J.F. (2000) Human Angiogenin Is Rapidly Translocated to the Nucleus of Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Binds DNA. *J. Cell. Biochem.* **76**, 452-462

Jones, J.I., Busby, W.H. Jr., Wright, G., Smith, C.E., Kimack, N.M., Clemmons, D.R. (1993) Identification of the sites of phosphorylation in insulin-like growth factor binding protein-1. Regulation of its affinity by phosphorylation of serine 101. *J. Biol. Chem.* **268**, 1125-1131

Joung, I., Strominger, J.L., Shin, J. (1996) Molecular cloning of a phosphotyrosine-independent ligand of the p56lck SH2 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5991-5995

Katzav, S., Martin-Zanca, D., Barbacid, M. (1989) vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J.* **8**, 2283-2290

Kemeny, D.M. ELISA, Anwendung des Enzyme Linkes Immunosorbent Assay im biologisch/medizinischem Labor, Gustav Fischer Verlag, 1994

Kopp, C. (1998) Untersuchungen zur Regulation der Degranulation bei Neu-

trophilen durch Plasma-Proteine und Komponenten der Signaltransduktionskaskaden. *Dissertation*, Universität Bielefeld

Kristensen, T., Oxvig, C., Sand, O., Moller, N.P., Sottrup-Jensen (1994) Amino acid sequence of human pregnancy-associated plasma protein derived from cloned cDNA. *Biochemistry* **33**, 1592-1598

Kurachi, K, Davie, E.W., Strydom, D.J., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1985) Sequence of the cDNA and Gene for Angiogenin, a Human Angiogenesis Factor *Biochemistry* **24**, 5494-5499

Lämmler, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

Lee, F.S., Vallee, B.L. (1989) Characterization of Ribonucleolytic Activity of Angiogenin towards tRNA *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 121-126

Li, R., Riordan, J.F., Hu, G. (1997) Nuclear Translocation of Human Angiogenin in Cultured Human Umbilical Artery Endothelial Cells Is Microtubule and Lysosome Independent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 305-312

Lipkin, S.M., Wang, V., Jacoby, R., Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A.D., Lynch, H.T., Elliott, R.M., Collins, F.S. (2000) MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nature Genetics* **24**, 27-35

Luban, J., Goff, S.P. (1995) The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 59-64

Malamitsi-Puchner, A., Tziotis, J., Tsonou, A., Sarandakou, A., Bartsocas, C.S., Creatsas, G. (1999) Serum Angiogenin Levels in the Female from Birth to Postmenopause. *Growth Factors* **17**, 75-79

McQuibban, G.A., Gong, J.H., Tam, E.M., McCulloch, C.A.G., Clark-Lewis, I., Overall, C.M. (2000) Inflammation Dampened by Gelatinase A Cleavage of Monocyte Chemoattractant Protein-3. *Science* **289**, 1202-1206

Moenner, M., Gusse, M., Hatzi, E., Badet, J. (1994) The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. *Eur. J. Biochem.*, **226**, 483-490

Moroianu, J.M., Riordan, J.F. (1994) Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 1677-1681

Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie*, Gustav Fischer Verlag, 1999

NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Oberpichler, A. (1999) Klonierung, Expression und Charakterisierung verschiedener Varianten der Kollagenase-3 und Untersuchungen des Einflusses

der Hämodialyse auf Plasmaproteine. *Dissertation*, Universität Bielefeld

Olsen, K.A., Verselis, S.J., Fett, J.W. (1998) Angiogenin is Regulated in Vivo as an Acute Phase Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 480-483

Pförtner-Taliana, A., Russell, M., Froning, K.J., Budworth, P.R., Comisky, J.D., Hoeffler, J.P. (2000) In vivo selection of single-chain antibodies using a yeast two-hybrid system *J. Immunol. Methods* **238**, 161-172

Rehm, H., *Der Experimentator: Proteinchemie*, Gustav Fischer Verlag, 1997

Reiter, J.L., Maihle, N.J. (1996) A 1.8 kb alternative transcript from human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4050-4056

Riordan, J.F. (1997) Structure and Function of Angiogenin in *Ribonucleases, Structures and Functions*, ed. G.D'Alessio, J.F. Riordan, (Academic Press), 445-489

Rybak, S.M., Fett, J.W., Yao Q.-Z., Vallee, B.L. (1987) Angiogenin mRNA in Human and Normal Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**, 1240-1248

Russo, N., Nobile, V., Di Donato, A., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1996) C-terminal region of human angiogenin has a dual role in enzymatic activity *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3243-3247

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Labo-*

ratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schägger, H., Jagow, G. (1987) Tricine-sodium-docecylsulfat polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379

Serebrijskii, I., Estojak, J., Berman, M., Golemis, E.A. (2000) Approaches to Detecting False Positives in Yeast Two-Hybrid Systems. *BioTechniques* **28**, 328-336

Shapiro, R., Riordan, J.F., Vallee, B.L. (1986) Characteristic Ribonucleolytic Activity of Human Angiogenin. *Biochemistry* **25**, 3527-3532

Shapiro, R., Strydom, D.J., Olsen, K.A., Vallee, B.L. (1987) Isolation of Angiogenin from Normal Human Plasma. *Biochemistry* **26**, 5141-5146

Shapiro, R., Vallee, B.L. (1989) Site-Directed Mutagenesis of Histidine-13 and Histidine-114 of Human Angiogenin Alanine Derivates Inhibit Angiogenin-Induced Angiogenesis *Biochemistry* **28**, 7401-7408

Shapiro, R. (1998) Structural Features That Determine the Enzymatic Potency and Specificity of Human Angiogenin: Threonin-80 and Residues 58-70 and 116-123 *Biochemistry* **37**, 6847-6856

Sharma, A., Askari, J.A., Humphries, M.J., Jones, E.Y., Stuart, D.I. (1999) Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fi-

bronectin. *EMBO* **18**, 1468-1479

Soncin, F. (1992) Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 2232-2236

Strydom, D.J., Fett J.W., Lobb, R.R., Alderman, E.M., Bethune, J.L., Riordan J.F., Vallee, B.L. (1985) Amnio Acid Sequence of Human Derived Angiogenin *Biochemistry* **24**, 5486-5494

Suzuki, S., Oldberg, A., Hayman, E.G., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E. (1985) Complete amnio acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin. *EMBO J.* **4**, 2519-2524

Tijssen, P., Kurtak, E. (1984) Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.* **136**, 451-457

Tschesche, H., Kopp, C., Hörl, W.H., Hempelmann, U. (1994) Inhibition of Degranulation of Polymorphonuclear Leukocytes by Angiogenin and Its Tryptic Fragment. *J. Biol. Chem.* **48**, 30274-30280

Vallee, B.L., Riordan, J.F. (1997) Organogenesis and angiogenin. *CMLS, Cell. mol. life. sci.* **53**, 803-815

Verselis, S.J., Olsen, K.A., Fett, J.W. (1999) Regulation of Angiogenin Ex-

pression in Human HepG2 Hepatoma Cells by Mediators of the Acute-Phase Response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 178-184

Wong, G., Muller, O., Clark, R., Conroy, L., Moran, M.F., Polakis, P., McCormick, F. (1992) Molecular cloning and nucleic acids binding properties of the GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62. *Cell* **69**, 551-558

Zhu, J., Kahn, C.R. (1997) Analysis of a peptide hormone-receptor interaction in the yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 13063-13068

Lebenslauf

Name Carsten Schmidt

Geburtsdatum 7. November 1971

Geburtsort Dinslaken, Kreis Wesel (NRW)

Familienstand ledig

Eltern Axel Schmidt, Bankkaufmann
Brigitte Schmidt, geb. Kloppenburg, Apothekenhelferin
Karola Schmidt, geb. Möck (1985 verstorben)

Ausbildung September 1978 bis Juni 1982
Grundschule Schweicheln-Bermbeck
September 1982 bis Juni 1991
Friedrichs-Gymnasium Herford
Oktober 1991 bis September 1997
Chemiestudium an der Universität Bielefeld
Abschluss September 1997 als Diplom Chemiker
(Diplomarbeitsthema: „Klonierung und
Expression von Angiogenin in *Pichia pastoris*“)
Oktober 1997 bis April 2001
Dissertation bei Prof. Dr. H. Tschesche an der
Universität Bielefeld
Promotionsprüfung: 28. Mai 2001

Berufliche
Tätigkeiten Oktober 1997 bis März 1998
wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Bielefeld
April 1998 bis September 2000
wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Bielefeld
im Arbeitskreis Prof. Tschesche / Biochemie I

Bielefeld, 28.05.01