

Matthias Wessely
Dr. med.

Etablierung eines neuen Verfahrens zur Identifizierung unbekannter Interaktionspartner der Transkriptionsfaktoren JunD und c-Jun

Geboren am 23.10.1974 in Darmstadt
Staatsexamen am 13.11.2002 in Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Voelkl

Die Proteine der Jun-Familie sind prototypische regulatorische Transkriptionsfaktoren. C-Jun spielt eine wichtige Rolle in der Steuerung der Zellproliferation, es ist aber auch an der Kontrolle von Apoptose und Differenzierung beteiligt. Einem anderen Mitglied der Jun-Familie, dem JunD, werden Funktionen zugeschrieben, die denen von c-Jun teilweise entgegengesetzt sind. Welche Faktoren für die Beteiligung von Jun-Proteinen an so unterschiedlichen Prozessen maßgeblich sind, ist nur teilweise bekannt. Dies macht es notwendig, die potentiellen Interaktionspartner der Jun-Proteine möglichst vollständig zu erfassen und zu identifizieren.

Wir haben uns für dieses Vorhaben einer neuen Methode, des „Tandem Affinity Purification“-Verfahren, kurz TAP, bedient. Dieses Verfahren ermöglicht es, Multiproteinkomplexe nahezu in vivo in einer Reinheit zu isolieren, die eine massenspektrometrische Proteinsequenzierung erlaubt.

Für diese Arbeit wurde das TAP-Verfahren zum ersten Mal zur Aufreinigung eines Multiproteinkomplexes in menschlichen Zellen eingesetzt. Wir klonierten TAP-fähige Konstrukte von c-jun und JunD, die in menschlichen Zellen exprimiert werden konnten und deren Genprodukte physiologisch im Zellkern lokalisiert wurden. Mit diesen Konstrukten etablierten wir ein standardisiertes Protokoll zur Proteingewinnung, welches ausreichend Protein für eine Aufreinigung erbrachte. In Kontrollversuchen, mit denen wir die TAP-Reinigung auf ihre Effizienz untersuchten, wurden wir zunächst mit zwei Hindernissen konfrontiert, die einer unmittelbaren Anwendung des für Hefezellen entwickelten TAP-Verfahrens im Wege standen.: i) die unspezifische Bindung von c-Jun und JunD auf Calmodulin-Affinitätssäulen; ii) eine Schnittstelle für die TEV-Protease in beiden Jun-Proteinen. Durch Modifikationen des Protokolls konnten wir diese Hindernisse umgehen.

Mit dem so optimierten TAP-Verfahren konnten wir schließlich verschiedene Proteine, die bisher nicht als Jun-Interaktionspartner bekannt waren, mit c-Jun kopräzipitieren und sie sequenzieren. Für eines dieser Proteine, die RNA-HelicaseII/GU konnte in unserem Labor die Interaktion mit c-Jun weiter gesichert werden, dieses Protein scheint eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Transkriptionsaktivierung durch c-Jun zu spielen.

Für JunD konnten wir mit einer weiteren Abwandlung des Verfahrens eine Interaktion mit der Kinase ERK nachweisen, deren Interaktion mit JunD bereits vermutet, jedoch noch nicht nachgewiesen worden war. Es gelang uns auch, mittels Kinaseassays eine Phosphorylierung von JunD durch ERK nachzuweisen. Somit konnten wir im Signalweg, der zur Phosphorylierung von JunD führt, einen wichtigen Schritt aufdecken. Diese Befunde verändern bisher vertretenen Ansicht über die Regulation von JunD durch JNK.

Unsere Ergebnisse tragen nicht nur unmittelbar zur Klärung der Regulation von JunD und c-Jun bei, sondern zeigen auch die großen Möglichkeiten auf, die das TAP-Verfahren für die Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen in humanen Zelllinien bietet.