

// EIN NEUER SCREENING-TEST AUF PROTEIN-DREIFACH-BINDUNGEN

Ref-Nr: TA-EKUT-13-0304 C.Grefen

HINTERGRUND

Viele biologische Prozesse basieren auf oligomeren Protein-Protein-Interaktionen (PPI für Protein-Protein Interaction). Herkömmliche Tests fokussieren allerdings auf die Analyse binärer Interaktionen (i.e. das Split-Ubiquitin System (SUS)¹). SUS lässt sich zwar prinzipiell auch für die Analyse dreifacher Interaktionen nutzen, bei dem drei Proteine aneinander docken, im so genannten SUS Bridge Assay (SUB)². Doch ist das Verfahren so arbeitsaufwändig, dass sich damit in der Praxis nicht alle potentiellen Bindungspartner in einer cDNA-library untersuchen lassen. Auch sind die Ergebnisse bislang nicht sehr zuverlässig.

PROBLEMSTELLUNG

Die Suche nach einem noch unbekanntem dritten Bindungspartner für zwei bekannte Proteine einer Dreifachinteraktion, trimeren Interaktion, in einer cDNA-library ist aktuell mit den vorhandenen Tools nicht praktikabel. Der so genannte SUS Bridge Assay (SUB) erfordert langwieriges Klonieren, bei dem jeder Klon der cDNA einzeln in Hefezellen mit einem SUB kombiniert werden muss. Das Eintransformieren der zahlreichen Plasmide Schritt für Schritt in verschiedenen Hefen, die zuvor bereits mit den Bait und Prey-Proteine des SUB beladen wurden, ist nur für wenige Proteine praktikabel, nicht für das Screening einer kompletten cDNA.

LÖSUNG

Wir kombinieren die Gene zweier bereits bekannter Proteine, diesmal quasi zwei "Bait"-Proteine in der Terminologie des SUB (Bait I and Bait II), in einem neuen 2in1-Vektorplasmid. Die anschließende Transformation eines Mat a-Hefestamms mit diesem Vektor erlaubt es, im nächsten Schritt einen Mat alpha-Stamm für die Aufnahme der cDNA vorrätig zu halten. Der Experimentator transformiert dabei die zu analysierende cDNA in einen Mat alpha-Stamm. "Mating" von Mat a und Mat alpha gibt bei Wahl geeigneter Mangelmутanten und Selektion auf entsprechenden Nährmedien nur dann positive Klone, wenn es tatsächlich zur Interaktion dreier Proteine kommt. Nachfolgend kann der neu gefundene dritte

EBERHARD KARLS
UNIVERSITÄT
TÜBINGEN

Eberhard Karls Universität
Tübingen

Dr. Rolf Hecker
+49 (0)7071-2972639
r.hecker@uni-tuebingen.de
www.technologietransfer.uni-
tuebingen.de

ENTWICKLUNGSSTAND

Prototyp

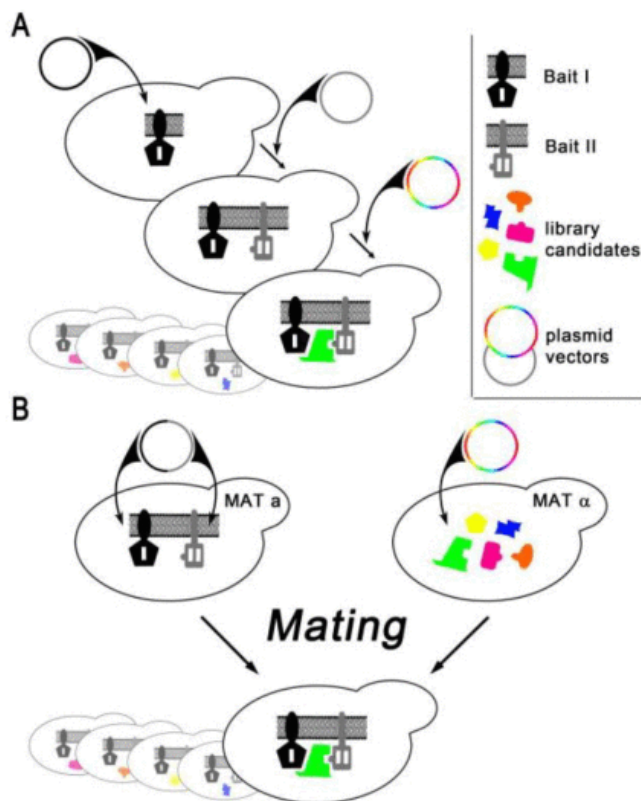
PATENTSITUATION

DE anhängig
PCT anhängig

CATEGORIES

//Life
Sciences //Chemie //Nahrungsmittel-
und
Naturstoffprodu-
ktion //Polymerchemie

Interaktionspartner isoliert und identifiziert werden. Ein Proof of Concept liegt vor.



VORTEILE

- Die systematische Suche und Identifikation in kompletten cDNA libraries auf die Anwesenheit von noch unbekanntem Protein-Interaktionspartnern in Dreifachbindungen von Proteinen wird erstmals praktikabel. Der neue Screening-Test macht dies zur Routineapplikation
- Das System ist zuverlässig, unser Proof of Concept belegt die Identifikation realer Interaktionspartner
- Effizienz: der Mating-basierte Ansatz garantiert 10 bis 100fach höhere Abdeckung primärer Interaktionen verglichen mit herkömmlich genutzten Verfahren.
- Kostengünstig: Libraries lassen sich wiederverwenden und in Hefen vorrätig halten, "ready to use"

ANWENDUNGSBEREICHE

- Der Screen kommt für cDNA libraries von allen Spezies in Betracht
- Das System ließe sich auch für die Identifikation von Proteinen in Vierfach-Interaktionen erweitern

SERVICE

Lizenz oder Verkauf zur gewerblichen Nutzung

Entwicklungskooperation

PUBLIKATIONEN & VERWEISE

1. C. Grefen, P. Obrdlik, K. Harter. The determination of protein-protein interactions by the mating-based split-ubiquitin system (mbSUS). (2009) *Methods Mol Biol.* 479:217-33
2. A. Honsbein, S. Sokolovski, C. Grefen, P. Campanoni, R. Pratelli, M. Paneque, Z. Chen, I. Johansson, M.R. Blatt. A Tripartite SNARE-K⁺ Channel Complex Mediates in Channel-Dependent K⁺ Nutrition in Arabidopsis. (2009) *In: Plant Cell* 21(9):2859-77

