

# 5. ARBEITSMETHODEN

## 5.1 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Methoden den Laborhandbüchern "Molecular cloning: a laboratory manual" von Sambrook et al. [208] und "Current Protocols in Molecular Biology" von Ausubel et al. [10] entnommen.

### 5.1.1 Bakterienkulturen

Alle verwendeten Plasmide enthalten ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in Bakterien. Plasmid-transformierte Bakterien (→ 5.1.3.8) wurden auf LB+Amp.-Platten über Nacht bei 37 °C selektioniert. Für Übernachtskulturen wurde eine Bakterienkolonie mit einer sterilen Impföse in LB+Amp.- oder TB+Amp.-Medium (2 ml) über Nacht bei 37 °C im Luftschüttler angezogen (Vorkultur). Die Kultur wurde dann benutzt, um Glyceroldauerkulturen anzulegen oder Plasmid-DNA im kleinen oder großen Maßstab zu präparieren (→ 5.1.4). Für die Lagerung der Bakterien wurden diese in glycerolhaltiges Medium überführt. Hierzu wurden 800 µl einer frischen Bakterienübernachtskultur und 200 µl Glycerol in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben, anschließend gut durchmischt und bei -80 °C eingefroren.

Zum Animpfen einer Übernachtskultur wurde der Glycerolstock von außen nur an der Oberfläche soweit angetaut, daß mit einer ausgeglühten Impföse etwas der Kultur aufgenommen und in LB-Amp.- oder TB-Amp.-Medium überführt werden konnte. Die Glyceroldauerkultur wurde dann sofort wieder bei -80 °C gelagert.

### 5.1.2 Herstellung ultrakompetenter Bakterien [114]

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5α verwendet. Diese Bakterien können durch Behandlung mit einem Calciumchlorid enthaltenden Puffer (TB-Puffer) kompetent gemacht werden, d.h. dazu gebracht werden, Plasmid-DNA aus dem umgebenden Medium aufzunehmen.

Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers oder einer Impföse wurden DH5α aus einem bei -80 °C gelagerten Glycerolstock auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 500 ml SOB-Medium in einem 2-l-Kolben wurden mit ca. 25 großen DH5α Kolonien angeimpft und bei 18 °C im Wasserbadschüttler bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde 10 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend 10 Minuten bei 1600 × g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 160 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Es folgte eine zehnmünütige Inkubationszeit auf Eis und danach ein erneuter zehnmünütiger Zentrifugationsschritt, wobei das Pellet diesmal in 40 ml TB-Puffer aufgenommen wurde. Unter leichtem Schwenken wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % (2,8 ml) zugegeben, um die Bakterien einfrieren zu können. Nach zehnmünütiger Inkubation der Zellsuspension auf Eis, wurde sie à 50 µl für Plasmid-Transformationen und à 200 µl für Ligations-Transformationen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die Kompetenz der Bakterien wird in Anzahl der transformierten Bakterien (= Klone) pro eingesetzter DNA (µg) angegeben und lag durchschnittlich bei 10<sup>8</sup> Klonen pro 1 µg verwendeter Plasmid-DNA.

## 5.1.3 Konstruktion von Expressionsplasmiden

### 5.1.3.1 Restriktionsverdau von DNA

Die verwendeten Typ II-Restriktionsendonukleasen prokaryotischer Herkunft spalten spezifische DNA-Sequenzen hydrolytisch, wobei entweder stumpfe (blunt-end) oder überhängende (sticky-end) Enden entstehen. Je nach Restriktionsenzym werden verschiedene Pufferbedingungen und optimale Temperaturen (üblicherweise 37 °C) benötigt, die der Hersteller im Beipackzettel angibt. Folgende Reaktionsansätze wurden standardmäßig verwendet:

- *analytischer Verdau (20 µl):*

|  |                            |
|--|----------------------------|
| 1-3 µl   | Plasmid-DNA (0,1-1 µg DNA) |
| 2 µl   | Reaktionspuffer            |
| 1 µl   | Restriktionsenzym          |
| mit Aqua bidest. auf 20 µl Gesamtvolumen auffüllen |                            |
  
- *präparativer Verdau (50 µl):*

|  |                          |
|--|--------------------------|
| 5-10 µl  | Plasmid-DNA (1-5 µg DNA) |
| 5 µl   | Reaktionspuffer          |
| 2 µl   | Restriktionsenzym        |
| mit Aqua bidest. auf 50 µl Gesamtvolumen auffüllen |                          |

Der Ansatz wurde für 1 h oder auch über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Vollständigkeit des Verdaues durch elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel kontrolliert (→ 5.1.3.2).

### 5.1.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese können linearisierte DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphatrückgrates wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld immer zur Anode. Dabei ist ihre Wanderungsgeschwindigkeit wegen des Widerstandes der Agarose-Gelmatrix umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Relaxierte DNA wandert langsamer als ihre ringförmige, superhelikale Form.

Je nach aufzutrennender DNA-Fragmentgröße wurden Agarosegele verwendet, die zwischen 0,8 und 2 % Agarose enthielten. Z.B. wurde für die Herstellung eines 1 %igen Geles 1 g Agarose zusammen mit 100 ml 0,5× TBE in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf ca. 50 °C abgekühlt war, wurde 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung pro 100 ml hinzugefügt. Ethidiumbromid ist als interkalierende Substanz in der Lage, sich sequenzspezifisch in die DNA-Doppelhelix einzulagern und die DNA im UV-Licht sichtbar werden zu lassen. Die Agaroselösung wurde in abgedichtete Gelschlitzen gegossen und ein Kamm blasenfrei eingesetzt. Nach erfolgter Polymerisierung bei Raumtemperatur konnte der Gelschlitten dann in eine Elektrophoresekammer eingelegt und mit 0,5× TBE überschichtet werden.

Die Taschen wurden mit den DNA-Proben (1-20 µl DNA + 1-5 µl DNA-Probenpuffer) beladen. In eine Tasche wurde ein standardisierter DNA-Längenmarker (1-kb Ladder) gegeben, mit dessen Hilfe die Fragmentgrößen der aufgetrennten DNA abgeschätzt werden konnten.

Das Gel lief bei konstanter Spannung von 100 V für 30-60 Minuten und wurde anschließend unter UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) photographiert.

### 5.1.3.3 Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Die durch Ethidiumbromid-Interkalierung unter UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden wurden auf einem UV-Lichtkasten ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die in den Gelstücken eingeschlossene DNA wurde dann mit Hilfe des QIAEX DNA-Gel-Extraktions-Kits dem Herstellerprotokoll folgend extrahiert. Die Extraktion und Reinigung der DNA-Fragmente basiert auf Lösung der Agarose und selektiver Absorption der Nukleinsäure an QIAEX Silica-gel-Partikel in Gegenwart einer hohen Salzkonzentration. Die Elution der DNA geschieht in einer Lösung mit niedriger Salzkonzentration wie Aqua bidest. oder  $1\times$  TE-Puffer (pH 8,5).

### 5.1.3.4 Herstellung von blunt-end DNA-Fragmenten

Durch den Verdau von DNA-Molekülen mit Restriktionsenzymen entstehen DNA-Fragmente, die entweder glatte Enden (blunt-end, z.B. durch EcoRV, SmaI), 5'-überhängende Enden (sticky-end, z.B. durch EcoRI, XbaI) oder 3'-überhängende Enden (sticky-end z.B. durch SacII, KpnI) besitzen. Für eine blunt-end-Ligation müssen daher DNA-Fragmente mit überhängenden Enden aufgefüllt oder abverdaut werden.

#### 5.1.3.4.1 Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden durch Klenow-Behandlung

Für das Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden wurde das Enzym DNA-Polymerase I Large Fragment (Klenow) verwendet. Zum Restriktionsansatz wurde  $1 \mu\text{l}$  einer  $10 \text{ mM}$  dNTP-Lösung und  $2 \mu\text{l}$  Klenow gegeben. Dann wurde er für  $1\frac{1}{2} \text{ h}$  bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kits aufgereinigt ( $\rightarrow$  5.1.3.6).

#### 5.1.3.4.2 Verdau von 3'-überhängenden DNA-Enden durch T4-Polymerase-Verdau

Das Enzym T4-DNA-Polymerase wurde für das Entfernen von 3'-überhängenden DNA-Enden verwendet. Zu dem in einen blunt-end umzuwandelnden Restriktionsansatz wurde  $1 \mu\text{l}$  einer  $10 \text{ mM}$  dNTP-Lösung und  $2 \mu\text{l}$  T4-Polymerase gegeben. Dann wurde er für  $1 \text{ h}$  bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification Kits aufgereinigt ( $\rightarrow$  5.1.3.6).

### 5.1.3.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit Calf Intestinal Phosphatase

Die Calf Intestinal Phosphatase (CIP) katalysiert die Entfernung der 5'-Phosphatgruppe von DNA, RNA, sowie Ribo- und Desoxyribonucleosidtriphosphaten, wodurch eine Religation von Vektor-DNA nach erfolgreichem Restriktionsverdau verhindert wird.

Direkt im Anschluß an den Restriktionsverdau ( $\rightarrow$  5.1.3.1) wurden  $10\text{-}20 \mu\text{l}$  Aqua bidest.,  $5 \mu\text{l}$   $10\times$  CIP-Puffer und  $1 \mu\text{l}$  CIP ( $10 \text{ U}$ ) hinzugefügt und für  $\frac{1}{2} \text{ h}$  im Heizblock inkubiert.

Die Temperatur wurde dabei wie folgt bestimmt:

$37 \text{ }^\circ\text{C}$  für dsDNA mit 5'-Überhang

$56 \text{ }^\circ\text{C}$  für blunt-end dsDNA und dsDNA mit 3'-Überhang

Danach wurde die Reaktion durch eine Inkubation für  $10 \text{ min}$  bei  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  gestoppt. Anschließend wurde die Vektor-DNA nach elektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe des QIAEX DNA-Geleextraktions-Kits ( $\rightarrow$  5.1.3.3) oder direkt mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification-Kits aufgereinigt ( $\rightarrow$  5.1.3.6).

### 5.1.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aufzureinigende DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick PCR-Purification-Kits dem Herstellerprotokoll folgend über Säulen aufgereinigt und mit 30 µl sterilem Aqua bidest. (pH 8,5) aus der Säulenmatrix eluiert.

### 5.1.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase ist in der Lage, freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden von doppelsträngiger DNA zu verknüpfen, indem sie die Bildung einer Phosphodiesterbindung katalysiert. T4-DNA-Ligase kann sowohl kohäsive (sticky) Enden als auch glatte (blunt) Enden miteinander ligieren.

Klonierungsvektor und Insert wurden vor der Ligation mit den entsprechenden Enzymen geschnitten (→ 5.1.3.1) und gereinigt (→ 5.1.3.3/5.1.3.6). Der Vektor wurde vor der Reinigung dephosphoryliert (→ 5.1.3.5)

- **Ligation von sticky-end:**

|       |  |
|-------|--|
| 2 µl  | 10× Ligationspuffer  |
| 4 µl  | 50 % PEG 4000  |
| 1 µl  | T4-Ligase (2 U/µl)   |
| 13 µl | DNA + Aqua bidest., wobei das Verhältnis Insert/Vektor 3:1 betragen soll |
  
- **Ligation von blunt-end:**

|       |  |
|-------|--|
| 2 µl  | 10× Ligationspuffer  |
| 4 µl  | 50 % PEG 4000  |
| 2 µl  | T4-Ligase (2 U/µl)   |
| 12 µl | DNA + Aqua bidest., wobei das Verhältnis Insert/Vektor 6:1 betragen soll |

Die Reaktion erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur und wurde dann in ultrakompetente DH5α transformiert.

### 5.1.3.8 Transformation kompetenter DH5α

Als Transformation bezeichnet man in diesem Zusammenhang die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien. Dabei können die transformierten Bakterien mittels eines auf dem verwendeten Plasmid vorhandenen Resistenzgens (z.B. Ampicillin) von den nichttransformierten Zellen selektiert werden.

25-50 µl Aliquots der ultrakompetenten DH5α (→ 5.1.2 oder Gibco) wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 2 µl Plasmid-DNA/Ligationsansatz vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 30-45 Sekunden einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und erneut 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Flüssigmedium wurden die Zellsuspensionen für 1 h bei 37 °C in einem Luftschüttler geschüttelt, um sicherzustellen, daß sich die Plasmide etablieren und z.B. eine Ampicillinresistenz phänotypisch ausprägen können. Dann wurden sie à 200 µl auf LB+Amp.-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

## 5.1.4 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

### 5.1.4.1 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* (kleiner Maßstab)

Diese Plasmid-Isolationsmethode fand dann Anwendung, wenn der Klonierungserfolg im Restriktionsverdau überprüft werden sollte oder wenn nur kleine Mengen an Plasmid-DNA für die weitere Arbeit benötigt wurden.

1,5 ml einer 2 ml Übernachtskultur transformierter Bakterien in TB+Amp.-Flüssigmedium wurden in ein Eppendorf-Gefäß überführt. In der Tischzentrifuge wurden die Bakterien bei  $12.000 \times g$  für 30 Sekunden pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100  $\mu$ l Lösung A resuspendiert. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung B wurde das Eppendorf-Gefäß mehrmals vorsichtig gewendet, bevor 150  $\mu$ l Lösung C zugegeben wurde. Nach dem erneuten Durchmischen folgte eine 5 minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation bei  $12.000 \times g$ . Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und die DNA durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol gefällt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei  $12.000 \times g$ , wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und für 10 Minuten getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 50  $\mu$ l  $1 \times$  TE resuspendiert.

### 5.1.4.2 Alkalische Lyse zur Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* (großer Maßstab)

Diese Methode diente der Gewinnung von Plasmid-DNA, die anschließend für Hefe-Transformationen ( $\rightarrow$  5.5.2.1) verwendet werden sollte.

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien wurde eine 100 ml TB+Amp. Übernachtskultur in einem 250 ml Kolben angesetzt und bei 37 °C im Luftschüttler kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf 50 ml Greiner-Röhrchen verteilt. Die Bakterien wurden bei  $2300 \times g$  (4 °C) pelletiert, das Pellet in 5 ml Lösung A resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml Lösung B gut gemischt und dann für maximal 5 Minuten auf Eis inkubiert, um anschließend mit 5 ml Lösung C versetzt zu werden. Nach erneutem Mischen folgte eine 20 minütige Inkubation auf Eis und eine 5 minütige Zentrifugation bei  $3600 \times g$  (4 °C). Der Überstand wurde durch 4 bis 5 Lagen Mullbinde zur Filtration in ein neues Greiner-Röhrchen dekantiert und mit dem gleichen Volumen 2-Propanol gemischt, 10 Minuten auf Eis stehen gelassen und dann erneut 5 Minuten bei  $3600 \times g$  (4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet 10 Minuten abtropfen und trocknen gelassen, anschließend in 2 ml  $1 \times$  TE gelöst und in 15 ml Greiner-Röhrchen überführt. Falls mehrere identische Proben vorlagen, wurden gleiche vereinigt. Es folgte die Zugabe des gleichen Volumens Phenol-Chloroform-Isoamylalkohols, kräftiges Durchmischen und 5 Minuten Zentrifugation bei  $3600 \times g$  (4 °C). Die obere Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform vermischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde abermals die obere Phase abpipettiert. Es wurde 1/20 Volumen 8 M LiCl und 1 Volumen 2-Propanol zugegeben, gemischt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und die ausfallende DNA durch Zentrifugation für 10 Minuten bei  $3600 \times g$  (4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde  $1 \times$  mit 70 % Ethanol gewaschen, dann 15 Minuten trocknen gelassen und je nach Größe in 300-500  $\mu$ l  $1 \times$  TE gelöst. Die DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### 5.1.4.3 Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli* für Zellkultur-Transfektionsexperimente

Um Plasmid-DNA, die in Bakterien amplifiziert wurde, für Zellkultur-Experimente verwenden zu können, muß sie extrem rein gewonnen werden. Daher wurde die Präparation solcher Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits isoliert. Dabei wurde die Anleitung des Herstellers befolgt.

### 5.1.4.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (entspricht dem Absorptionsmaximum) und 280 nm. Der Quotient aus diesen beiden Meßdaten ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) erlaubt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA. Er sollte zwischen 1,8 und 2,4 liegen.

Die Konzentration der DNA wurde folgendermaßen berechnet:

$$C = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 20$$

C: Konzentration in mg/ml

OD: Optische Dichte

### 5.1.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR

Mit Hilfe der PCR (polymerase chain reaction) können selektiv DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. Diese Technik basiert darauf, daß sich DNA-Dopplestränge bei Erhitzen trennen und durch eine hitzestabile DNA-Polymerase in der Gegenwart komplementärer Primer verdoppelt werden können. Wird dieser Prozeß mehrfach wiederholt, steigt die Anzahl der Kopien exponentiell an. Auf diese Weise kann eine bestimmte Zielsequenz in nur wenigen Zyklen stark amplifiziert werden. Die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase wurde aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*, das in heißen Quellen lebt, isoliert.

Für jeden Strang der Doppelhelix werden Primer benötigt, die die Zielsequenz einrahmen. Zusätzliche Schnittstellen, um z.B. ein DNA-Fragment in einen anderen Vektor umklonieren zu können, können durch weitere, der Ziel-DNA nicht homologe Basenpaare an den Primerenden geschaffen werden.

Für die Reaktion wurden pro Ansatz 2,5 µl 10× Reaktionspuffer der Polymerase, 1,5 µl  $MgCl_2$  (25 mM-Stock), sofern es nicht bereits im Puffer enthalten war, 0,5 µl dNTP (10 mM-Stock), jeweils 0,75 µl der beiden Primer (10 µM-Stock), 20 µl Aqua bidest., 1 µl DNA (0,05 ng) und 0,25 µl Taq-Polymerase eingesetzt. Die Ziel-DNA wurde bei einer Temperatur von 94 °C für 60 Sekunden in der PCR-Maschine denaturiert. Wenn die Temperatur für 60 Sekunden auf 65-55 °C sinkt, lagern sich die Primer an homologe Sequenzen der Einzelstrang-DNA an (diese Annealing-Temperatur richtet sich nach der niedrigsten Schmelztemperatur der beiden Primer und sollte 2-5 °C unterhalb dieser liegen). Bei einer Temperatur von 72 °C findet die Elongation durch die Taq-Polymerase statt, wobei sich die Elongationszeit nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes richtet und ca. 1 Minute pro kb DNA betragen sollte. Dieser Zyklus wurde 35 mal wiederholt.

Ein Aliquot der amplifizierten DNA wurde zur Kontrolle der PCR mit 5 µl DNA-Probenpuffer vermischt und je nach entstandener Fragmentgröße auf ein entsprechend prozentiges Agarosegel aufgetragen, durch eine Elektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert, sofern die PCR ein Fragment der richtigen Größe amplifiziert hatte.

### 5.1.6 Erstellung von Punktmutationen mit Hilfe des QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit

Der QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene ist ein PCR-basierender Kit, mit dessen Hilfe auf einfache Weise Punktmutationen in bekannte, in ein Plasmid hineinklonierte, DNA-Sequenzen eingefügt werden können. Es werden Primer generiert, die homolog zu der zu mutierenden DNA-Sequenz sind, zusätzlich aber eine oder mehrere der gewünschten Punktmutationen tragen. In einer PCR-Reaktion wird dann das komplette Plasmid amplifiziert und die Mutation inseriert.

Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

### 5.1.7 Automatische DNA-Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 Integrated Thermal Cycler

Die automatisierte DNA-Sequenzanalyse basiert auf einer DNA-Kettenverlängerungsreaktion nach der Sanger-Methode [210]. Dabei wird ein fluoreszenzmarkierter Primer eingesetzt, mit dem mittels PCR in vier verschiedenen Reaktionsansätzen basenspezifische Kettenabbruchprodukte unterschiedlicher Länge erzeugt werden. Die Reaktionsgemische werden auf ein Sequenzigel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und die durch das Gel wandernden Banden anhand eines Laser detektiert. Die Daten werden im Computer gespeichert und analysiert.

Es wurden ca. 1 µg DNA, 4 pmol Primer, 1 µl DMSO und 4 µl Terminator-Mix (enthält dRhodamin-Terminatoren) zusammengegeben und mit Aqua bidest. auf 20 µl Gesamtansatz aufgefüllt. Die Sequenzierung selbst wurde von einem hauseigenen Servicedienst übernommen, der einen ABI PRISM 377 Integrated Thermal Cycler verwendete.

## 5.2 Zellkultur

### 5.2.1 Baculovirus-Expressionssystem [81, 128, 175]

Baculoviren (Familie der *Baculoviridae*) haben sich als sehr starke und vielseitig einsetzbare eukaryotische Expressionsvektoren erwiesen. Es können Gene verschiedener Quellen, z. B. von Pilzen, Pflanzen, Bakterien, Viren oder Eukaryoten exprimiert werden. Die natürlichen Wirte der Baculoviren sind verschiedene Insektenarten. Das Baculovirusgenom wird im Nukleus von infizierten Wirtszellen repliziert und transkribiert. Dort wird die große doppelsträngige Baculovirus-DNA (80-200 kb) in ein Capsid verpackt, in dem sie zu einer Nukleoproteinstruktur kondensiert ist, die Core genannt wird. Capsid und Core zusammen werden als Nukleocapsid bezeichnet. Die Größe dieser Nukleocapside ist flexibel, so daß rekombinante Baculoviren große Mengen an fremder DNA akkomodieren können.

Insektenlarven nehmen Viren als Futterkontaminationen auf. Durch Fusion mit Mikrovillimembranen treten die Viruspartikel in die Darmzellen ein.

Der Baculovirus-Infektionszyklus kann in zwei verschiedene Phasen unterteilt werden. Während der frühen Phase entläßt die infizierte Insektenzelle extrazelluläre Viruspartikel, die sich von der Zellmembran abschnüren (Budding) und Nachbarzellen infizieren. Über die Hämolymphe gelangen diese abgeschnürten Viruspartikel zu anderen Geweben des Insekts.

Später im Infektionszyklus sammeln sich innerhalb des Nukleus größere Viruspartikel (occluded viruses) an. In dieser Phase werden die Nukleocapside in Gruppen umhüllt und in einer homogenen Matrix eingebettet, die vorwiegend aus einem einzigen Protein, dem Polyhedrinprotein, besteht. Diese als Einschlußkörper bezeichneten Virusgruppierungen

werden durch Lyse der Wirtszelle freigelassen. Wenn infizierte Insektenlarven sterben, werden Millionen dieser Virus-Einschlußkörper durch das Verwesen des Materials freigesetzt.

Virale Einschlußkörper schützen die eingebetteten Viruspartikel vor einer Inaktivierung durch Umweltfaktoren. Diese Einschlußkörper sind ein wichtiger Teil des natürlichen Baculovirus-Lebenszyklus und für die horizontale Ausbreitung der Viren in ihrer Umwelt essentiell. Sobald Insektenlarven auf kontaminierten Pflanzen auf Nahrungssuche gehen, beginnt der Infektionszyklus der Baculoviren von vorne. In der alkalischen Umgebung des Insektenmagens wird die Polyhedrinmatrix aufgelöst, so daß infektiöse Viren freigesetzt werden.

Während der späten Infektionsphase ist Polyhedrin das am meisten exprimierte Protein und nimmt einen Anteil von 30-50 % aller Insektenzellproteine ein. Dieses Protein ist unter Zellkulturbedingungen nicht essentiell für den Baculovirus-Lebenszyklus und konnte daher durch Fremdgene ersetzt werden, die durch den starken Promotor des Polyhedringens in kultivierten Insektenzellen (Sf9) stark überexprimiert werden.

### 5.2.1.1 Aufzucht von Sf9-Zellen

*Spodoptera frugiperda* (Sf9)-Zellen verdoppeln sich normalerweise alle 18-24 Stunden, wenn sie in Medium mit 10 % FCS wachsen. Sie sind rund und setzen sich schnell an den Boden einer Zellkulturschale fest, um einen Monolayer zu bilden. Mit Baculoviren infizierte Zellen nehmen an Größe zu, entwickeln große Nuklei und haften relativ schlecht am Untergrund.

Die Sf9-Zellen für die Experimente wurden als Suspensionkultur in Glas-Erlenmeyerkolben mit Schikane oder Zellkulturflaschen für Suspensionszellen vermehrt. Das Volumen der Zellsuspension entsprach dabei nicht mehr als 20 % der Kolbengröße. Die Zellen wurden in einem auf 27 °C temperierten Raum in Dunkelheit auf Schüttlern kultiviert. Die Schüttelgeschwindigkeit wurde so eingestellt, daß das Zellmedium keinen Schaum gebildet hat (50-60 rpm). Die Zellen wurden dreimal in der Woche gezählt und auf eine Zelldichte von  $0,5 \times 10^6$ /ml verdünnt. Das komplette dazu verwendete Insektenzellmedium hatte Raumtemperatur. Die Zellen wurden wöchentlich bei 200 × g und 22 °C 3-5 Minuten pelletiert, um das gesamte Medium zu entfernen und durch frisches zu ersetzen. Meist wurde bei diesem Vorgang auch der Schikanekolben/Zellkulturflasche ausgewechselt, um Kontaminationen vorzubeugen.

### 5.2.1.2 Infektion von Sf9-Zellen mit rekombinanten Baculoviren

$10^7$  Sf9-Zellen wurden mit 10 MOI rekombinanten Baculoviren in 5 ml Kulturansätzen infiziert und als Suspensionskultur in Glas-Erlenmeyerkolben oder T25 Zellkulturflaschen für Suspensionszellen für 48 h bei 27 °C auf einem Schüttler kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die infizierten Zellen für die Gewinnung der exprimierten Proteine geerntet (→ 5.3.1.1).

## 5.2.2 293/NIH3T3-Zellkultur

293-Zellen sind embryonale, epitheliale Nierenzellen des Menschen, die durch Adenovirus 5 DNA transformiert worden sind. Bei NIH3T3-Zellen handelt es sich um immortalisierte, embryonale Maus-Fibroblasten. Beide Zelllinien können gut mit eukaryotischen Expressionsplasmiden transfiziert werden und exprimieren dann transient bzw. stabil die codierten Proteine.

Sowohl 293- als auch NIH3T3-Zellen wurden für die Experimente in DMEM mit 10 % FCS als Monolayerkulturen in T75 Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Gewebekulturbrutschrank vermehrt. Sobald die Zellen nahezu Konfluenz erreicht hatten,



wurde das Medium abgesaugt und sie wurden vorsichtig mit 5 ml PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen. Es folgte eine Behandlung mit 3-5 ml Trypsin/EDTA für 2-5 Minuten im Brutschrank. Dadurch lösen sich die Zellen ab. Durch Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen 1:5 bis 1:10 gesplittet und in neue Kulturflaschen überführt.

Für Transfektionsexperimente wurden  $0,25 \times 10^6$  Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach 24 h Kultur hatten sich die Zellen angeheftet und das Medium wurde erneuert.

### **5.2.2.1 Transfektion von Expressionsplasmiden in Säugerzellen**

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Säugerzellen wird als Transfektion bezeichnet. Es wurden viele Methoden entwickelt, um eukaryotische DNA in kultivierte Säugerzellen einzubringen. Einige, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, werden im Folgenden näher erläutert.

#### **5.2.2.1.1 Transiente Transfektion nach der Calciumphosphatmethode [36]**

Bei der Calciumphosphatmethode wird die DNA in Calciumchloridpräzipitaten eingeschlossen. Die Präzipitate setzen sich auf der Zelloberfläche ab und können von den Zellen durch Endocytose inkorporiert werden, so daß die Plasmide zur Expression kommen. Abhängig vom Zelltyp können so bis zu 20 % der Zellpopulation transfiziert werden.

Bis zu 20 µg in  $1 \times$  TE gelöste Plasmid-DNA ( $\rightarrow$  5.1.4.3) wurde mit 25 µl einer 2,5 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in ein Gesamtvolumen von 250 µl sterilfiltriertes Aqua. bidest. in Polystyrenröhrchen gegeben und auf dem Vortex langsam tropfenweise mit 250 µl  $2 \times$  BES versetzt. Die Vortexgeschwindigkeit wurde so gewählt, daß der Meniskus nicht den Boden des Röhrchens berührte. Nach 20 Minuten ruhigem Stehenlassen hatte sich ein Präzipitat gebildet, das tropfenweise zu den einige Stunden zuvor mit je 2 ml frischem Medium versorgten 293-Zellen gegeben wurde. Dabei wurden die 6-Loch-Platten zur gleichmäßigen Verteilung des Präzipitates leicht geschwenkt. Nach 6-12 h Inkubation der Zellen bei 37 °C im Brutschrank wurden sie  $1 \times$  mit PBS/1mM EGTA und  $2 \times$  mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 2 ml low-Serum Medium bei 37 °C für 48 h kultiviert.

#### **5.2.2.1.2 Transfektion durch Lipofectamine (Lipofektion) [151]**

Lipofectamine Reagenz (Gibco-BRL) besteht aus einem Gemisch von synthetischen Membranvesikeln (Liposomen) und ist sowohl für transiente als auch für stabile Transfektionen geeignet. Die kationische Kopfgruppe der Lipidkomponenten assoziiert mit den negativ geladenen Phosphaten der DNA, die so in die Vesikel aufgenommen wird. Dieser DNA-Liposom Komplex kann dann mit der Zellmembran fusionieren, so daß die Plasmide zur Expression kommen.

In Transfektionsröhrchen wurden pro Ansatz 100 µl DMEM-Medium ohne Serum und insgesamt 1,5-2 µg DNA vorgelegt. Diesem Gemisch wurden jeweils 100 µl DMEM mit 6 µl Lipofectamine zugefügt und 30 min stehen gelassen. In der Zwischenzeit wurden die Zellen 2 mal mit DMEM-Medium ohne Serum gewaschen, um sämtliche Serumrückstände zu beseitigen, die die Transfektionseffizienz erniedrigen können. Schließlich wurden auf die Zellen 800 µl DMEM-Medium ohne Serum und die 200 µl Lipofektionsgemisch gegeben und für 5 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach diesen 5 Stunden wird die Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen mit 2-3 ml frischem DMEM-Medium mit Serum gefüttert und für 48 h kultiviert.

### 5.2.2.2 Retroviren als effiziente Vektoren für den Gentransfer in Säugerzellen [227]

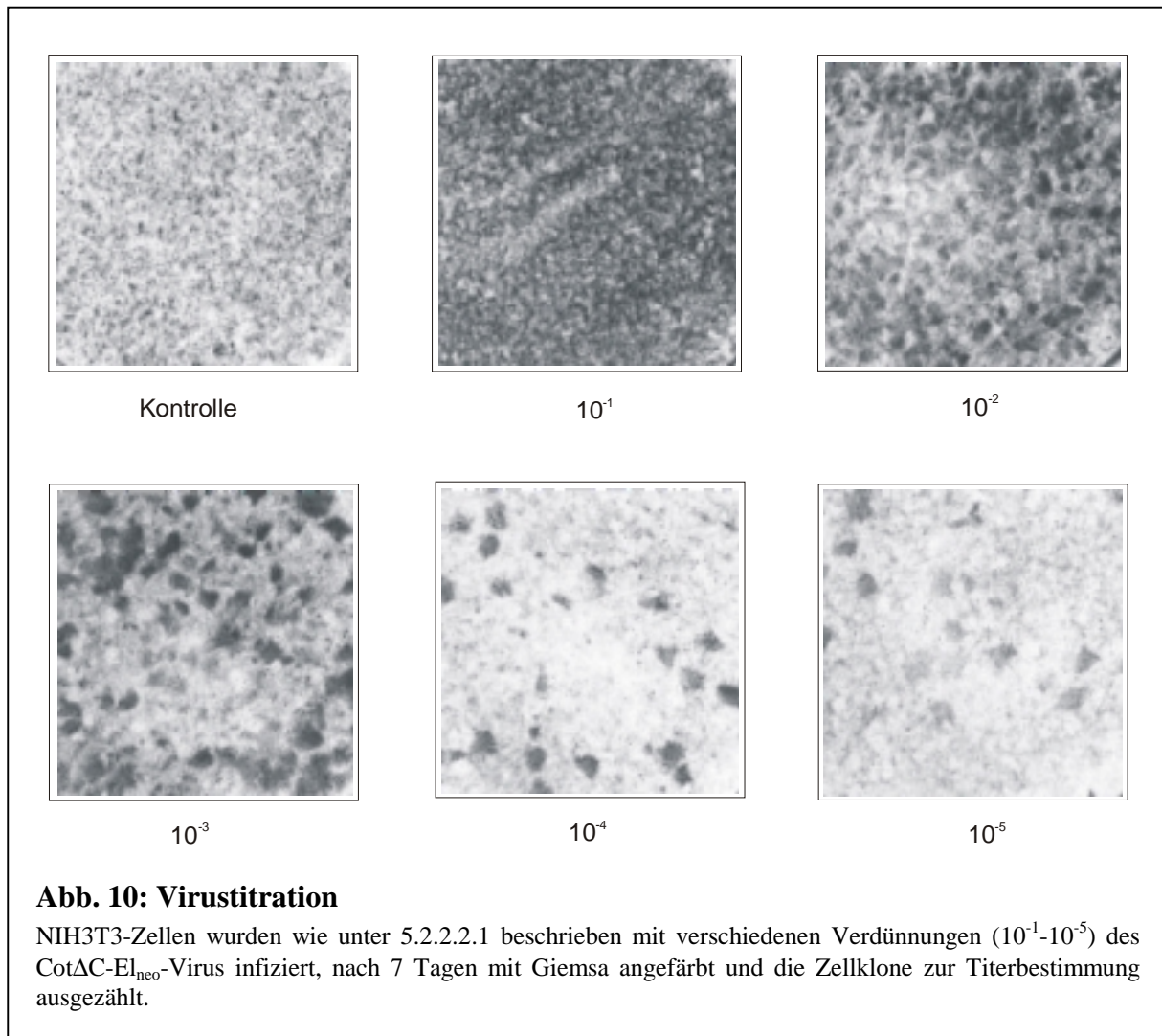
Gentransfer durch retrovirale Vektoren ist eine der effizientesten Techniken, um funktionale Gene in Säugerzellen integrativ einzuführen und zu exprimieren. Das gewünschte, in den Vektor klonierte Gen steht unter der Transkriptionskontrolle der viralen LTRs. In diesen Vektoren wurden retrovirale Gene, die z.B. Verpackungsproteine kodieren, durch nichtvirale Sequenzen ersetzt und erlauben so die Einbringung von Fremdgenen. Für die Gewinnung von Virusüberständen werden diese replikationsdefekten Viren zusammen mit Helfervirus DNA in geeignete Zellen transfiziert. Das Helfervirus stellt dann in trans die Proteine zur Verfügung, die für den Aufbau intakter Viruspartikel benötigt werden. Alternativ können auch sogenannte Verpackungszelllinien für die Transfektion der retroviralen DNAs verwendet werden. Diese Zellen exprimieren stabil von unterschiedlichen Plasmiden die für die Verpackung benötigten Proteine. Die retroviralen Partikel, die auf diese Weise produziert werden, können Zielzellen infizieren und das Gen von Interesse übertragen, können sich aber nicht replizieren, weil die genomische Information für die Verpackung nicht in den retroviralen Partikeln enthalten ist.

NIH3T3-Fibroblasten wurden wie unter 5.2.2.1 beschrieben mit dem retroviralen Konstrukt und dem Helfervirus (leuk: einem Stamm von MoMuLV) transfiziert. Zur Ernte der Viren, wurden die Zellen 24 Stunden später mit einer geringen Menge frischen Mediums gefüttert, das am nächsten Tag abgenommen, sterilfiltriert und zur längeren Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden konnte.

#### 5.2.2.2.1 Virustitration [124, 33, 232, 183]

Pro Loch einer 6-Loch-Platte wurden  $0,15\text{-}1,3 \times 10^6$  Zellen ausgesäht. Am nächsten Tag wurde dem Medium der zu transfizierenden Zellen für 2 h 20 mg/ml Polybrene (Sigma) zugegeben und die Zellen wurden bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Das Polykation Polybrene (Hexadimethrinbromid) erlaubt eine effiziente und stabile Aufnahme von Viruspartikeln in Zellen. Es wird angenommen, daß Polybrene eine Neutralisation der elektrostatischen Ladungen zwischen Viruspartikel und Zellmembran hervorruft und dadurch die Anheftung der Viruspartikel an die Zelle verstärkt und ihre Aufnahme in die Zelle erleichtert.

In der Zwischenzeit wurden verschiedene Virusverdünnungen mit DMEM-Medium angesetzt ( $10^0\text{-}10^7$ ). Dann wurde das Polybrene-Medium abgesaugt und 0,5-1 ml der jeweiligen Virusverdünnung auf die Zellen gegeben. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen leicht geschwenkt, um das Virus gleichmäßig zu verteilen. Nach 2 Stunden Inkubation im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Brutschrank wurde jeweils 1 ml frisches Medium zu den Zellen gegeben. Alternativ können auch 4 mg/ml Polybrene zu frischem Medium gegeben und damit die Virusverdünnungen angesetzt werden. Nach 3 Stunden Inkubation im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Brutschrank wurde 1 ml frisches Medium auf die infizierten Zellen gegeben. Falls diese Viren ein transformierendes Gen (Onkogen) exprimieren, können die infizierten Zellen aufgrund der morphologischen Veränderungen leicht identifiziert werden. Über einen Zeitraum von 3-10 Tagen wachsen diese Zellen zu sichtbaren Zellaggregaten, den sogenannten Foci, heran, die zur Titerbestimmung ausgezählt werden können. Zur leichteren Auszählung der Klone wurden die Zellen mit Giemsa angefärbt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen für 5 min mit 2 ml Methanol fixiert. Für 10-30 min wurden 2 ml Giemsa-Färbelösung auf die Zellen gegeben, die danach mit Leitungswasser gewaschen wurden. Nach dem Trocknen konnten die dunkelblau gefärbten Foci leicht ausgezählt werden (Abb. 10.)



### 5.2.2.2.2 Soft-Agar-Klonierung

Soft-Agar-Klonierung ist eine Methode, um transformierte Zellen zu identifizieren und Klone zu isolieren, die die Fähigkeit haben, ohne Anheftung an ein Substrat und unabhängig von anderen Zellen wachsen zu können und keine Kontaktinhibition aufweisen.

Für die Soft-Agar-Klonierung wurden Zellen 24 Stunden nach einer Virusinfektion verwendet (→ 5.2.2.2.1). Für den Bottom-Agar wurde zunächst 0,5 %iger Agar hergestellt. Dazu wurde 5 % sterile Sea Plaque Agarose (in Aqua bidest. oder PBS) in der Mikrowelle verflüssigt und mit vorgewärmtem komplettem Medium zu 0,5 %iger Agarose verdünnt. Diese wurde á 2 ml pro Loch in 6-Loch-Platten gegossen und bei Raumtemperatur festwerden gelassen.

Der Topagar besteht aus 0,3 %iger Sea-Plaque-Agarose. Zunächst wurde mit Medium und der verflüssigten 5 %igen Agarose eine 0,6 %ige Agarose hergestellt. 1 ml dieser verdünnten Agarose wurde mit dem gleichen Volumen vorgewärmten Medium, das  $10^3$ - $10^5$  Zellen enthält, vermischt und auf den Bottomagar gegossen. Nachdem der Agar bei Raumtemperatur ausgehärtet war, wurden die 6-Loch-Platten im 37 °C-Brutschrank für 7-21 Tage inkubiert und nach Koloniebildung überprüft. Transformierte Zellhaufen können leicht mit einer Pipette aus dem Agar isoliert und weiter vermehrt werden, um weitere Experimente durchzuführen oder einen hochtitrigen Virusüberstand zu gewinnen.

### 5.2.3 PC12-Zellen

PC12-Pheochromocytoma-Zellen wurden als Modellsystem für die Differenzierung neuronaler Zellen verwendet. In Gegenwart von NGF fangen diese Zellen an, Neuritenausläufer zu bilden, die unter dem Lichtmikroskop sichtbar sind. Die Zellen wurden mit Retroviren, die das gewünschte Gen enthielten, infiziert (→ 5.2.2.2.1). Nach 2-8 Tagen wurde der Phänotyp der Zellen dokumentiert und die Zellen z.B. für Expressionsanalysen geerntet.

### 5.2.4 32D-Zellen/Survival-Assay

Bei 32D-Zellen handelt es sich um eine IL-3-abhängige Maus-promyeloische Zelllinie, die in Apoptosestudien Verwendung findet. 32D-Zellen wurden mit dem gewünschten Expressionskonstrukt, das z.B. ein Neomycinresistenzgen enthält, elektroporiert [103] und über 2 Wochen mit Neomycin (G148) behandelt, um die transfizierten Zellen zu selektieren. Diese Zellen wurden für einen Survival-Assay 2 mal mit PBS oder Wehi-freiem Medium gewaschen, um das IL-3 zu entfernen.  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro ml und Loch einer 24-Loch-Platte wurden in 3-fachem Ansatz ausgesät. Die Viabilität der verschiedenen 32D-Zelllinien wurde über 6 Tage alle 24 h durch Auszählen bestimmt. Dafür wurden 50 µl resuspendierte Zellen eines Loches mit 50 µl Trypan Blau vermischt. In einer Zählkammer wurden sowohl die lebenden als auch die toten Zellen aus 3 Kästchen bestimmt, wobei die lebenden Zellen kein Trypan Blau aufnehmen. Diese Zählung wurde mit 3 unabhängigen Löchern wiederholt und der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

### 5.2.5 Herstellung primärer Milztumorzelllinien

Die Milz einer Maus wurde unter sterilen Bedingungen entnommen und in PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Skalpell wurde die Milz zu einer Zellsuspension zerrieben und durch mehrere Lagen einer sterilen Mullbinde gefiltert. Die Zellen wurden in Medium für primäre Zelllinien (→ 4.6) aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren weiter suspendiert. In T75 Kulturflaschen wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Gewebekulturbrutschrank kultiviert und kurz vor dem Erreichen einer Konfluenz 1:5 gesplittet (→ 5.2.2).

## 5.3 Molekularbiologisches Arbeiten mit Proteinen

### 5.3.1 Gewinnung von Zell-Lysaten

Um exprimierte Proteine untersuchen zu können, werden die Zellen durch Wahl entsprechender Lysispuffer aufgebrochen und größere unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert. Die Zell-Lysate können dann verwendet werden, um Proteinexpression nachzuweisen (→ 5.3.2), in Coimmunpräzipitationsexperimenten Komplexbildung zweier oder mehrerer Proteine zu zeigen (→ 5.3.3) oder in Kinase-Assays funktionelle Beziehungen zwischen interagierenden Faktoren zu untersuchen (→ 5.3.4).

#### 5.3.1.1 Gewinnung von Sf9-Zell-Lysaten

Baculovirus-infizierte Sf9-Zellen (→ 5.2.1.2) wurden in 15 ml Greiner-Röhrchen umgefüllt, 3 Minuten bei  $200 \times g$  sedimentiert und mit 3 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml PBS resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Nach 3 Minuten Zentrifugation

bei  $200 \times g$  wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde entweder zur alleinigen Überprüfung der Expression in  $200 \mu\text{l}$   $2\times$  Lämmli aufgenommen und anschließend 5 min bei  $100^\circ\text{C}$  inkubiert oder aber in 1 ml Lysispuffer auf Eis resuspendiert und unter zwischenzeitlichem Vortexen 10 bis 15 Minuten auf Eis stehen gelassen. In dieser Zeit lysierten die Zellen. Es folgte ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei  $12.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$ , um Zellmembranen und Kerne abzutrennen. Der Überstand wurde für Western-Blot- ( $\rightarrow$  5.3.2) und Coimmunpräzipitationsexperimente ( $\rightarrow$  5.3.3) verwendet.

### 5.3.1.2 Gewinnung von 293-Zell-Lysaten

Das Medium transfizierter 293-Zellen ( $\rightarrow$  5.2.2.1) wurde aus den Kulturschalen abgesaugt. Der Zellmonolayer wurde  $2 \times$  mit PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurden die Zellen durch kräftiges Pipettieren vom Untergrund gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei  $1000 \times g$  in der Zentrifuge sedimentiert und das Zellpellet entweder in  $200 \mu\text{l}$   $2\times$  Lämmli aufgenommen ( $\rightarrow$  5.3.1.1) oder in 1 ml Lysis- oder Ripapuffer für 10 Minuten auf Eis mit zwischenzeitlichem Vortexen lysiert. Die Zelllösung wurde 10 Minuten bei  $12.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zur Abtrennung von Zellmembranen und Kernen zentrifugiert und dann für Western-Blot- ( $\rightarrow$  5.3.2) und Coimmunpräzipitationsexperimenten ( $\rightarrow$  5.3.3) verwendet.

### 5.3.1.3 Gewinnung von Zell-Lysaten aus Mausorganen

Organe adulter Mäuse wurden durch einen Veterinär entnommen und in kaltes PBS gelegt. Zur Lyse wurden die Organe und Gewebe in ein 5 ml Transfektionsröhrchen zusammen mit 1-2 ml  $2\times$  Lämmli oder RIPA-Lysispuffer gegeben. Daraufhin wurden die Gewebestücke zunächst mit dem Ultra-Turrax mechanisch zerkleinert und anschließend 10 min bei  $100^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Lysate wurden nach gründlichem Vortexen durch 10 minütige Zentrifugation bei  $12.000 \times g$  geklärt. Zur Expressionskontrolle wurden  $10\text{-}20 \mu\text{l}$  auf ein Proteingel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt ( $\rightarrow$  5.3.2). Im Fall der RIPA-Lyse wurden die Gewebereste nach der mechanischen Zerkleinerung durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand mit  $500 \mu\text{l}$  Lämmli versetzt, bevor die Lysate 5 min gekocht und auf ein Proteingel aufgetragen wurden.

## 5.3.2 Western-Blots

Der Nachweis exprimierter Proteine wird in Western-Blot-Experimenten geführt. In Zellextrakten ( $\rightarrow$  5.3.1) enthaltene Proteine werden durch SDS-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen (Blotting) und dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Dabei wird der Antikörper-Antigen-Komplex durch Zugabe eines sekundären Antikörpers sichtbar gemacht, der an ein Enzym gekoppelt ist, welches ein Substrat zur Lichtemission anregen kann.

### 5.3.2.1 Vorbereitung der Proben

Um auf dem Polyacrylamidgel oder in Coimmunpräzipitationsexperimenten bzw. Kinase-Assays identische Proteinmengen verwenden zu können, wurde mit Hilfe des DC Protein Assays (Bio Rad) bei den durch Lysispuffer gewonnenen Zellextrakten dem Herstellerprotokoll folgend eine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt. Für einen Expressionsnachweis wurden dann ca.  $50 \mu\text{l}$  der konzentrationsangeglichenen Zellextrakte mit dem gleichen Volumen  $2\times$  Lämmli versetzt und für 5 Minuten bei  $100^\circ\text{C}$  gekocht. In Lämmli lysierte Zellextrakte wurden direkt aufgetragen.

### 5.3.2.2 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE werden denaturierte Proteine nach ihrer Masse aufgetrennt. Das Proteingemisch wird zunächst durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS), das im Lämmli-Puffer enthalten ist, gelöst. Dieses Detergenz zerstört nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen.  $\beta$ -Mercaptoethanol, ebenfalls im Probenpuffer enthalten, reduziert mögliche Disulfidbindungen. Die Proteine wandern in einem elektrischen Feld in Richtung positiver Elektrode (Anode), wobei größere Proteine langsamer vorankommen.

Es wurden Trenngele zwischen 7 und 12,5 % Polyacrylamid und einem pH-Wert von 8,8 verwendet. Das 4,5 %ige Sammelgel hatte immer einen pH-Wert von 6,8. Die gewählte Prozentualität des Trenngels richtete sich nach der Größe des nachzuweisenden Proteins. Je kleiner das Protein war, um so höherprozentig wurde das Trenngel gewählt.

Trenn- und Sammelgele wurden aus einer 40 % Acrylamid-Stammlösung mit 0,8 % quervernetzendem Bisacrylamid durch Zugabe entsprechender Mengen an Tris-Cl, Wasser und SDS gemischt:

|                        | Trenngel    |             |             | Sammelgel   |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|                        | 7,5 %       | 10 %        | 12 %        |             |
| Acrylamid-Bisacrylamid | 3,8 ml      | 5,0 ml      | 6,5 ml      | 1,10 ml     |
| 3 M Tris-Cl pH 9       | 2,5 ml      | 2,5 ml      | 2,5 ml      |             |
| 1 M Tris-Cl pH 6,8     |             |             |             | 1,25 ml     |
| Aqua bidest.           | 13,3 ml     | 12,1 ml     | 10,6 ml     | 7,55 ml     |
| 20 % SDS               | 100 $\mu$ l | 100 $\mu$ l | 100 $\mu$ l | 50 $\mu$ l  |
| 10 % APS               | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l | 200 $\mu$ l | 100 $\mu$ l |
| TEMED                  | 20 $\mu$ l  | 20 $\mu$ l  | 20 $\mu$ l  | 10 $\mu$ l  |

Die Polymerisation wurde durch Zugabe des Radikalstarters APS eingeleitet. Die Gele wurden mit Hilfe einer Minigel-Apparatur (*Biorad*) gegossen. Die Trenngellösung wurde bis 2 cm unter den oberen Rand gegossen und mit 2-Propanol überschichtet, um eine gleichmäßige Grenze zwischen den beiden Gelteilen zu erhalten und um gleichzeitig das Gel vor Sauerstoff zu schützen. Nach Auspolymerisierung und Entfernung des Propanols wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Anschließend wurde die Gel-Elektrophoresekammer (*Biorad*) aufgebaut, zwei Gele darin eingespannt und mit 1 $\times$  SDS-Page-Puffer befüllt. Jede Kammtasche wurde mit 20  $\mu$ l Probe ( $\rightarrow$  5.3.2.1) bzw. mit 10  $\mu$ l Proteinmarker beladen. Das Gel wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA ca 2,5 h laufen gelassen, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

### 5.3.2.3 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Blotten)

Das Blotten erfolgte mit einer Elektroblotkammer von *Hoefler*, die mit Blotting-Puffer gefüllt war. Mit einem Skalpell wurde das Sammelgel vom Trenngel abgeschnitten und letzteres auf feuchtes Blottingpapier gelegt. Weiterhin wurde eine Nitrozellulosemembran auf Gelgröße zurechtgeschnitten und ebenfalls befeuchtet auf das Gel gegeben. Sollten in der Immundetektion phosphospezifische Antikörper zum Einsatz kommen, wurde PVDF-Membran verwendet. Als Abschluß folgte wiederum Blottingpapier. Alle Lagen müssen unbedingt luftblasenfrei aufliegen, da sonst nur ein unvollständiger Transfer erfolgt. Dieses

"Gelsandwich" wurde zwischen zwei Schwämme gelegt und so in die Blottingkammer eingeführt, daß die Nitrozellulosemembran in Richtung Anode zeigte. Der Transfer fand unter konstanten 800 mA für 1 h statt.

#### 5.3.2.4 Färbung der Membran mit Ponceau S

Um den Transfer zu kontrollieren, kann die Membran mit Ponceau S angefärbt werden. Der Nitrozellulosefilter wurde für 5 min in Ponceau S Lösung geschwenkt und anschließend unter fließendem Wasser solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Anschließend wurde die Nitrozellulose mit PBS-Tween-Puffer wieder entfärbt.

#### 5.3.2.5 Immundetektion von Proteinen

Hierzu wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen, die störende Hintergrundsignale verursachen könnten, durch Inkubation des Nitrozellulosefilters für mindestens 1 h in Blockingpuffer abgedeckt. Anschließend wurde auf den Filter der erste Antikörper, verdünnt in mind. 3 ml Blockingpuffer, auf die Membran gegeben. Nach 1 - 3 h Inkubation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur, wurde gründlich mit PBST gewaschen ( $3 \times 10$  Minuten), um überschüssigen, nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Es folgte eine 60 minütige Behandlung mit dem sekundären, Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper (in 10 ml PBS-Tween/Blockingpuffer 3:1 v/v verdünnt), der spezifisch an den Fc-Teil des ersten Antikörpers bindet. Danach wurde der Blot wie oben beschrieben gewaschen und einer ECL (Enhanced Chemoluminescence) Reaktion unterworfen. Die ECL Lösungen enthalten Luminol, welches ein Substrat für die Meerrettichperoxidase darstellt und nach Oxidation in einen angeregten Zustand übergeht, wobei Licht emittiert wird. Dazu wurde für 1 Minute 1-5 ml der beiden 1:1 vermischten ECL-Lösungen über den Filter gegeben, dieser anschließend getrocknet, mit Klarsichtfolie umhüllt und in einer ECL-Expositionskassette plaziert. Die leuchtenden Banden konnten durch Auflegen eines ECL-Hyperfilms dokumentiert werden.

##### 5.3.2.5.1 Western-Blots strippen

Nach erfolgter Antikörperreaktion können diese wieder vom Blot abgewaschen werden (Strippen), damit mit anderen Antikörpern eine Detektion weiterer Proteine auf dem selben Blot durchgeführt werden kann.

Dazu wurde der Blot in Strip-Puffer für 1-2 h geschwenkt und anschließend  $5-7 \times 10$  Minuten in PBS-Tween gewaschen.

### 5.3.3 Präzipitations- und Coimmunopräzipitations-experimente

Mit Hilfe von Coimmunopräzipitationsexperimenten kann die Fähigkeit eines Proteins, an ein anderes zu binden, nachgewiesen werden.

20  $\mu$ l Protein-A- oder G-Agarose wurden in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. 800  $\mu$ l Zellysat ( $\rightarrow$  5.3.1) (die Proteinkonzentrationen zu vergleichender Ansätze wurden vorher bestimmt und aneinander angeglichen) wurden hinzugegeben und 2  $\mu$ l Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein beigefügt. Die Mixtur wurde für 2 h bei 4 °C auf einem Rotarimischer inkubiert. In dieser Zeit konnte der Antikörper sowohl an die Agarose-Perlen, als auch spezifisch an sein Antigen binden und einen Komplex bilden, der durch 1 minütige Zentrifugation bei  $150 \times g$  sedimentiert wurde. Der Bodensatz wurde  $2 \times$  mit 1 ml Lysispuffer gewaschen, bevor 30-50  $\mu$ l  $2 \times$  Lämmli zugegeben und 5 Minuten bei 100 °C gekocht wurde.

Die Proben wurden dann durch SDS-PAGE aufgetrennt (→ 5.3.2.2) und in Western-Blots (→ 5.3.2) auf copräzipitierte Proteine untersucht.

### 5.3.4 Kinase-Assays

In Kinase-Assays können Phosphorylierungsereignisse festgestellt und Aktivierungsprozesse von Kinasen untersucht werden. Proteinkinasen werden z.B. in Sf9- oder 293-Zellen überexprimiert (→ 5.2.1.2/5.2.2.1) und coexprimierte Regulatorproteine können Effekte auf sie ausüben. Nach der Zellyse mit Lysispuffer (→ 5.3.1) und Präzipitation der Kinase (→ 5.3.3) können dann *in vitro* Substrate und radioaktiv markiertes ATP hinzugegeben werden. Je nach Aktivierungsgrad ist die Kinase in der Lage, das Substrat unter Verwendung des radioaktiven Phosphates zu phosphorylieren. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (→ 5.3.2.2) kann der Phosphorylierungsgrad des Substrates am Phosphoimager qualitativ und quantitativ ausgewertet werden.

Die ersten Schritte bei einem Kinase-Assay waren identisch mit jenen in der Coimmunopräzipitation. Zellen wurden lysiert und die interessierenden Proteine mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert (→ 5.3.3). Das Präzipitat wurde 2 × mit 1 ml Lysispuffer und 1 × mit 1× Kinasepuffer gewaschen. Die Pellets wurden dann mit 30 µl 2× Kinasepuffer, der die entsprechenden Substrate und pro Reaktion 10 µCi [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-dATP enthielt, vermischt und 15-30 Minuten bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluß daran wurde 10 µl 2× Lämmli zugegeben und 5 Minuten bei 100 °C gekocht. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch SDS-PAGE (→ 5.3.2.2). Nach dem Blotten auf Nitrozellulosemembranen (→ 5.3.2.3) wurden sie unter einem Phosphoimager-Screen exponiert und am Phosphoimager ausgewertet.

Proteinexpression und Coimmunpräzipitationsereignisse wurden auf den selben Membranen in Western-Blots mit spezifischen Antikörpern untersucht (→ 5.3.2.5).

### 5.3.5 Reporteragen-Assays [80]

Genetische Reporter-Systeme haben sehr viel dazu beigetragen, die eukaryotische Genexpression und -regulation zu analysieren. Reportergene werden als Indikator der Transkriptionsaktivität in Zellen benutzt. Ein Reporteragen ist mit einer Promotorsequenz (z.B. AP-1) in einem Expressionsvektor verbunden und wird wie beschrieben (5.2.2.1.1) in eine Zelle transfiziert. Dann wird die enzymatische Aktivität des Reporterproteins überprüft. Das Luciferaseenzym wird am häufigsten für die Reporteragen-Technologie verwendet und wurde ursprünglich aus der Feuerfliege *Photinus pyralis* kloniert. Das Luciferaseenzym katalysiert eine Reaktion von D-Luciferin und ATP in Gegenwart von Sauerstoff und Magnesium, was zur Lichtemission führt. Die Luciferase Reaktion wird mit Hilfe eines Luminometers quantifiziert, das die Lichtemission mißt. Das Licht, das in einem bestimmten Zeitraum gemessen wird, ist proportional zur Luciferase-Reporteraktivität in der Probe.

293-Zellen wurden mit dem Reporteragen-Konstrukt in Kombination mit den gewünschten anderen Vektorkonstrukten transfiziert (5.2.2.1.1) 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit Harvesting-Puffer für 15 min bei 4 °C lysiert. Die Lysate wurden in Eppendorf-Gefäße transferiert und 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert. In einer 96-Loch-Luminometer Platte wird zu 50 µl Zellysat 50 µl Assay-Puffer gegeben. Das Luminometer wurde vor der Messung 2 mal mit Aqua bidest. und einmal mit Luciferin (50 µl Injektion) gespült.



## 5.4 Molekularbiologisches Arbeiten mit RNA

### 5.4.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN) laut Anleitung durchgeführt.  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen wurden geerntet und mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 350-600  $\mu$ l RLT Puffer aufgenommen. Die Lysate wurden unter der Verwendung von QIAshredder-Säulen (QIAGEN) homogenisiert. 1 Volumen 70 %iges Ethanol wurde zu den Lysaten gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gut durchmischt. Die Proben wurden auf eine RNeasy-Säule gegeben und 15 sec bei  $8000 \times g$  zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Die Säule wurde mit 700  $\mu$ l RW1 beladen und erneut 15 sec bei  $8000 \times g$  zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde das 2 ml Auffanggefäß gegen ein neues ausgetauscht. Die Säule wurde nun zweimal mit 500  $\mu$ l RPE-Puffer gewaschen (15 sec,  $8000 \times g$ ) und der Durchfluß wurde verworfen. Um die RNeasy-Membran zu trocknen, wurde die Säule für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nachdem die Säule in ein steriles 1,5 ml Reagiergefäß umgesetzt wurde, wurde die RNA mit 30-50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert (1 min,  $8000 \times g$ ). Um die Ausbeute zu vergrößern, wurde der Elutionsschritt wiederholt. Eine Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Messung der Extinktion bei 260nm (OD=1 entspricht 40  $\mu$ g/ml). Die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.4.2 cDNA-Synthese

cDNA wurde mit Hilfe des 1st Strand c-DNA Synthesis Kits für RT-PCR (Boehringer Mannheim) laut Anleitung gewonnen. Folgende Komponenten wurden pro Ansatz vermischt, bei  $25^\circ\text{C}$  10 min und anschließend bei  $42^\circ\text{C}$  für 60 min inkubiert: 2  $\mu$ l 10 $\times$  Reaktions-Puffer, 4  $\mu$ l  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 2  $\mu$ l dNTP (5 mM), 2  $\mu$ l oligo-p(dt) Primer, 1  $\mu$ l RNase Inhibitor, 0,8  $\mu$ l AMV Reverse Transkriptase und  $\leq 1$   $\mu$ g RNA. Mit Aqua.bidest wurde das Reaktionsgemisch auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Während der ersten Inkubation „annealen“ die Primer an die RNA-Vorlage. Die RNA wird revers transkribiert, so daß eine cDNA während der zweiten Inkubation synthetisiert wird. Im Anschluß an die beiden Inkubationen wurde die AMV reverse Transkriptase 5 min bei  $99^\circ\text{C}$  denaturiert und langsam auf Eis abgekühlt. Für eine Langzeitlagerung wurde die cDNA bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

### 5.4.3 RT-PCR

Für die PCR-Reaktion wurden pro Ansatz 1  $\mu$ l cDNA, 20 pmol je Primer, 1  $\mu$ l dNTP (10 mM), 5  $\mu$ l 10 $\times$  PCR-Puffer und 0,25  $\mu$ l Taq-Polymerase vermischt und mit Aqua bidest. auf 50  $\mu$ l aufgefüllt. Die Ziel-cDNA wurde bei einer Temperatur von  $94^\circ\text{C}$  für 2 min in der PCR-Maschine denaturiert. Über 35 Zyklen wurde das Fragment mit folgendem Programm amplifiziert: 30 sec  $94^\circ\text{C}$ , 60 sec  $55^\circ\text{C}$  (primerabhängig) und 60 sec  $72^\circ\text{C}$ . Die Endelongation wurde für 10 min bei  $72^\circ\text{C}$  durchgeführt bevor die PCR Reaktion auf  $4^\circ\text{C}$  abgekühlt wurde. Die amplifizierte DNA wurde mit 5 $\mu$ l DNA-Probenpuffer vermischt, je nach entstandener Fragmentgröße auf ein entsprechend prozentiges Agarosegel aufgetragen und durch Elektrophorese aufgetrennt.

Bei der unter 6.5 beschriebenen RT-PCR wurden Primer mit folgender Sequenz verwendet:

Cot1: 5'-CCA AGT CAT TCA TGA AGG-3'

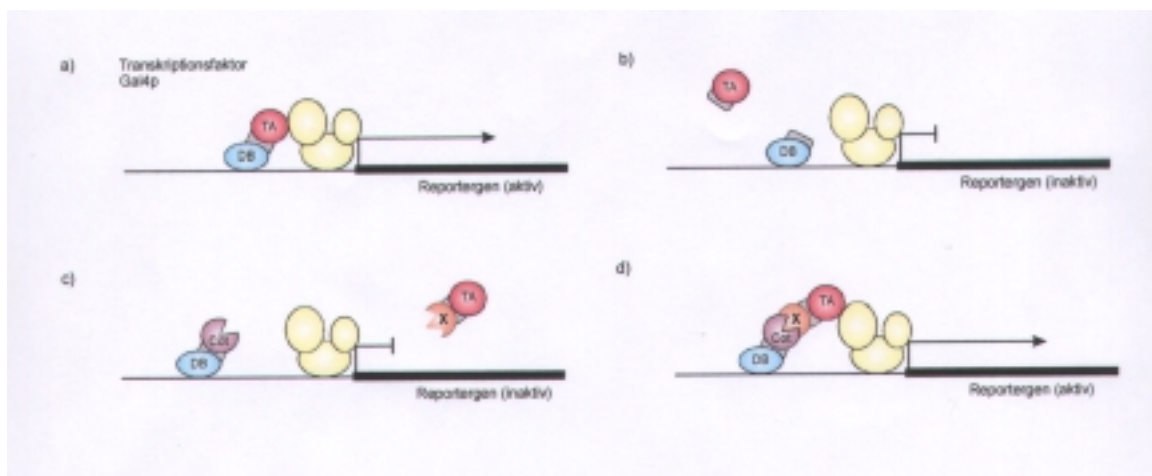
Cot2: 5'-CCG CCC AAG AGC CGC-3'

El<sub>neo</sub>1: 5'-GGA GTC TGG ACC CCC-3'

El<sub>neo</sub>2: 5'-GCG CCC TGA GTG CTT GC-3'

## 5.5 Two-Hybrid Screen

Mit Hilfe des Two-Hybrid Systems ist es möglich, cDNA-Bibliotheken zu screenen, um neue Faktoren zu identifizieren, die mit einem Bait-Protein in Wechselwirkung treten können (Abb. 11). Dazu muß zunächst das Bait mit der DNA-bindenden Gal4-Domäne in Form eines Baitplasmids fusioniert werden. Dieses wird in den Two-Hybrid Hefestamm HF7c transformiert (→ 5.5.2.1). Ein erster X-Gal Assay (→ 5.5.2.4) zeigt, ob das Bait allein eine Reporter-genaktivierung hervorruft. Bleibt dieser Test negativ, kann der eigentliche Screen durchgeführt werden. Die mit dem Baitplasmid transformierte Hefe wird mit einer cDNA-Bibliothek transformiert (→ 5.5.2) und auf Selektionsmedium ausgebracht. Die wachsenden Klone werden mit dem X-Gal Filterassay (→ 5.5.2.4) auf Aktivität des  $\beta$ -Galactosidase-Reporters getestet. Anschließend läßt man die positiven Klone das Baitplasmid verlieren (→ 5.5.2.5). Da es möglich ist, daß das Prey auch ohne Bait die Reportergene aktivieren kann, schließt sich nun ein weiterer X-Gal-Test an, bei dem alle blau werdenden Klone aussortiert werden. Aus den restlichen Hefekolonien wird die Plasmid-DNA isoliert (→ 5.1.4) und durch Transformation in *E. coli* (→ 5.1.3.8) amplifiziert. Die codierten Prey-Proteine können dann durch Sequenzierung identifiziert werden (→ 5.1.7). In direkten Two-Hybrid Tests (→ 5.5.2.2) wird die Interaktion von Bait und Prey noch einmal verifiziert, bevor durch Coimmunpräzipitationsexperimente (→ 5.3.3), Kinase-Assays (→ 5.3.4) oder andere Methoden versucht werden kann, die physiologische Funktion der identifizierten Wechselwirkung aufzuklären.



**Abb. 11: Prinzip des Two-Hybrid Systems**

Der Gal4p-Transkriptionsfaktor aktiviert normalerweise Gene, die für den Galaktose-Metabolismus in der Hefe notwendig sind. Die N-terminale Domäne bindet an spezifische DNA-Sequenzen (DB), während die C-terminale Domäne das Gen durch Wechselwirkung mit der Transkriptionsmaschinerie (gelb) aktiviert (transaktivierende Domäne, TA) (a). Wenn diese Domänen voneinander getrennt werden, können sie das Reporter-gen nicht aktivieren, obwohl die DB an die DNA binden kann (b). Fusionsproteine der DB mit z.B. Cot (Bait) und der TA mit einem unbekanntem Protein einer cDNA-Bibliothek (Prey), aktivieren nur dann das Reporter-gen, wenn sie miteinander in Wechselwirkung stehen (c, d). In diesem Fall wird ein funktioneller Gal4p-Aktivator rekonstituiert und das Reporter-gen aktiviert (d).

### 5.5.1 Amplifikation von cDNA-Bibliotheken

Eine cDNA-Bibliothek repräsentiert die durch RT-PCR in DNA umgeschriebene und in Expressions-Vektoren klonierte Gesamtheit der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle exprimierten mRNAs. Solche Bibliotheken finden z.B. in Two-Hybrid Screens Anwendung, müssen aber, um genug Material vorliegen zu haben, durch Transformation in *E. coli* amplifiziert werden.

2× 100 µl XL2-blue superkompetente *E. coli* (Stratagene) wurden den Herstellerangaben entsprechend mit je 0,5 µg cDNA-Bibliotheks-DNA transformiert. Die Bakterien wurden jeweils in 2 ml 2× TY-Flüssigmedium suspendiert, 1 h bei 37 °C im Luftschüttler inkubiert und mit 50 ml 2× TY-Flüssigmedium verdünnt. Sie wurden à 500 µl auf 15 cm 2×TY-Kulturplatten ausplattiert und über Nacht im 37 °C Brutschrank kultiviert.

Am nächsten Tag waren die Platten nahezu konfluent bewachsen. Pro Platte wurden 2 ml 2× TY-Flüssigmedium zugegeben und die Zellen mit einem Drigalski-Spatel abgeschabt. Sie wurden in Zentrifugenbechern gesammelt. Anschließend wurde eine Plasmid-DNA-Präparation im großen Maßstab durchgeführt, wobei die Volumina der verwendeten Lösungen dem großen Volumen des hier vorliegenden Zellpellets angepaßt wurden. Das DNA-Pellet wurde in 20 ml 1× TE gelöst und über Nacht bei 37 °C mit 20 µl RNAase behandelt. Am nächsten Tag wurde 20 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben, kräftig gemischt und 5 Minuten bei 3600 × g zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und mit 20 ml Chloroform vermischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde abermals die obere Phase weiterverwendet. Es wurde 1/20 Volumen 8 M LiCl und 1 Volumen Iso-Propanol hinzugefügt, gemixt, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und die ausfallende DNA durch Zentrifugieren für 10 Minuten bei 3600 × g (4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde 1× mit 70 %igem Ethanol gewaschen, trocken gelassen und in 5 ml TE gelöst. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (→ 5.1.4.4), eventuell noch vorhandene RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (→ 5.1.3.2).

### 5.5.2 Hefe-Transformation und Two-Hybrid-Tests

Das Two-Hybrid-System kann auch dazu verwendet werden, zwei bekannte Proteine auf eine mögliche Wechselwirkung zu untersuchen. Dazu wird die cDNA des einen Proteins in frame in ein Plasmid hineinkloniert, welches die cDNA für die DNA-Bindedomäne von Gal4p trägt. Das resultierende Plasmid nennt man Bait-Plasmid. Das andere Protein wird auf die gleiche Weise mit der aktivierenden Gal4p-Domäne fusioniert (Prey).

Man muß für die Konstruktion des Prey allerdings nicht unbedingt die cDNA eines bekannten Faktors verwenden. Stattdessen können auch cDNAs einer cDNA-Bibliothek verwendet werden. Dadurch wird es möglich mit Hilfe des Two-Hybrid-Systems nach bisher unbekanntem Interaktionspartnern des bekannten Baits zu screenen.

Beide Plasmide werden in die Hefe transformiert (→ 5.5.2.1). Der Hefestamm HF7c ist aber nicht nur für das Histidin-Reportergen auxotroph, sondern auch für die Synthesen der Aminosäuren Leucin und Tryptophan. Das Bait-Plasmid trägt als Selektionsmarker ein Gen, das den defekten Leucin-Syntheseweg von HF7c repariert, das Prey-Plasmid das entsprechende Gen für den Tryptophan-Syntheseweg. Durch entsprechende Wahl der Kulturmedien kann man also auf das Vorhandensein beider Plasmide in der Hefezelle selektieren.

In einem Two-Hybrid-Screen zur Suche nach neuen, unbekanntem Bindepartnern für ein bekanntes Bait würde man also zunächst das Bait-Plasmid in die Hefe transformieren und anschließend Prey-Plasmide einer cDNA-Bibliothek. Diese Zellen könnten dann auf -Leu/-Trp-Mangelmedium wachsen, auf -Leu/-Trp/-His-Mangelmedium jedoch nur dann,

wenn die exprimierten Fusionsproteine miteinander interagieren können, weil nur dann der Histidin-Reporter angeschaltet wird.

### 5.5.2.1 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmiden

Eine Hefekolonie wurde für eine Übernachtskultur in 50 ml YEPD Medium inokuliert und im Wasserbadschüttler bei 30 °C kultiviert. Jeweils 1 ml dieser Zellkultur wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß gegeben und 5 Sekunden in der Tischzentrifuge herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen Rest von 50 - 100 µl abgenommen. Im verbliebenen Medium wurde das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden 2 µl Carrier-DNA und ca. 1 µg Plasmid-DNA (~1-3 µl) (→ 5.1.4) hinzugefügt und gut gevortext. Bei Carrier-DNA handelt es sich um unspezifische, einzelsträngige DNA aus Lachs-Sperma (Gibco), die im Transformationsansatz die Aufnahme von Plasmid-DNA durch Hefezellen unterstützt. Auch nach der folgenden Zugabe von 0,5 ml Plate-Mixture und von 20 µl DTT wurde zwischendurch immer wieder gemischt. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend für 6-8 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 10 minütigen Hitzeschock von 42 °C wurden 200 µl Zellen in Bodennähe des Reaktionsgefäßes entnommen und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C, bis nach ca. 3 Tagen Klone sichtbar wurden.

### 5.5.2.2 Direkte Two-Hybrid Tests

Bait- und Prey-Plasmide zweier bekannter Proteine wurden gemeinsam in HF7c transformiert (→ 5.5.2.1). Die Transformanten wurden zunächst auf -Leu/-Trp-Kulturplatten herangezogen, bevor Nitrozellulosefilter für Wachstums- und X-Gal Filtertests auf -Leu/ -Trp/-His Kulturplatten gelegt wurden. Auf diese Filter wurden dann mit Hilfe von sterilen Zahnstochern einzelne Kolonien linienförmig ausgestrichen. Die Kulturschalen mit den Filtern wurden über Nacht bei 30 °C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag war Wachstum (Protein-Protein-Interaktion) gut von Nichtwachstum (keine Wechselwirkung) unterscheidbar und es wurde zur Absicherung der Ergebnisse ein X-Gal Assay durchgeführt (→ 5.5.2.4).

### 5.5.2.3 Transformation von *S. cerevisiae* für Two-Hybrid cDNA-Bibliothek-Screens

50 ml Selektionsmedium (-Leu bzw. -Trp) wurden mit einer Kolonie des Hefe-Stammes HF7c inokuliert, welcher bereits mit dem Bait-Plasmid transformiert worden war (→ 5.5.2.1) und über Nacht im Wasserbadschüttler bei 30 °C kultiviert. Am nächsten Morgen wurden mit dieser Kultur 500 ml Selektionsmedium (-Leu bzw. -Trp) angeimpft und erneut über Nacht wachsen gelassen. Sobald sich die Zellen auf eine  $OD_{600} > 1,0$  vermehrt hatten, wurden mit ihnen 3× 500 ml Vollmedium auf eine  $OD_{600}$  von 0,4 bis 0,5 eingestellt. Nach 4 h Inkubation bei 30 °C und 230 rpm im Wasserbadschüttler wurden die Zellsuspensionen auf insgesamt 4 Zentrifugenbecher verteilt und die Zellen bei  $1100 \times g$  5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert. Die Zellpellets wurden mit 1× TE gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in je 10 ml LiAc/TE-Mix (frisch angesetzt) resuspendiert und dann 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Pro Ansatz wurde 1 ml Carrier-DNA mit 250-500 µg cDNA-Bibliothek-Plasmid vermischt und zur Zellsuspension gegeben. Nach kurzem Schwenken wurde jeder Transformationsansatz zu 70 ml PEG/LiAc-Mix (frisch angesetzt) gegeben, leicht geschwenkt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 8,8 ml DMSO wurden tropfenweise unter vorsichtigem Schwenken zugegeben, bevor die Zellen für 6 Minuten einem Hitzeschock

von 42 °C im Wasserbad ausgesetzt wurden. Dabei sollten sie möglichst nur wenig bewegt werden. Nach dem Hitzeschock wurden alle 4 Ansätze im Wasserbad unter Schwenken schnell auf Raumtemperatur abgekühlt. Sie wurden in einem Zentrifugenbecher vereinigt und bei  $1100 \times g$  für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Das Zellpellet wurde mit  $1 \times TE$  gewaschen, in 1 l Vollmedium aufgenommen und für 1 h bei 30 °C im Wasserbadsschüttler kultiviert. Anschließend wurden die Hefezellen erneut pelletiert, mit 50 ml  $1 \times TE$  gewaschen, in 20 ml  $1 \times TE$  aufgenommen und à 250-350  $\mu l$  auf 15 cm Selektions-Kulturplatten (-Leu/-Trp/-His) ausplattiert. Kolonien, die mögliche Wechselwirkungen zwischen Bait und Prey anzeigen, erschienen nach ca. 3-8 Tagen Inkubation im 30 °C Brutschrank.

#### 5.5.2.3.1 Bestimmung der Transformationseffizienz

Die sich auf den Selektionskulturplatten entwickelnden Kolonien stellen nur einen Bruchteil der eigentlich vorhandenen Transformanten dar, da Klone, in denen keine Protein-Protein Wechselwirkung zwischen Bait und Prey stattfindet, nicht wachsen können. Um die Gesamtzahl der transformierten Hefezellen und die Transformationseffizienz pro  $\mu g$  eingesetzter DNA bestimmen zu können, müssen also auch Aliquots auf -Leu/-Trp-Mangelmedium ausgebracht werden. Die Auszählung der hier entstehenden Kolonien erlaubt dann einen Rückschluß darauf, ob die Gesamtheit der in der cDNA-Bibliothek vorhandenen unabhängigen Inserts durch die Anzahl der transformierten Hefezellen komplett abgedeckt wird.

Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden 10  $\mu l$ , 20  $\mu l$  und 50  $\mu l$  Aliquots der transformierten Zellsuspension auf -Leu/-Trp-Platten ausgestrichen und bei 30 °C für 2-3 Tage im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Hefekolonien wurden gezählt und auf das Volumen des Gesamtansatzes sowie auf die Menge der insgesamt eingesetzten cDNA-Bibliotheks-DNA hochgerechnet. Diese Werte geben die Zahl der insgesamt gescreenten Transformanten bzw. die Transformationseffizienz pro  $\mu g$  DNA an.

#### 5.5.2.4 X-Gal Filterassay

Auf der Ebene des Histidin Reportergens kommt es häufig zu falsch positiven Signalen, da von der Hefezelle nur sehr wenig Histidin für das Überleben benötigt wird und bereits kurzzeitige, schwache Aktivierung dieses Reportergens z.B. durch eine unspezifische transiente Wechselwirkung von Bait- und Prey-Protein ausreichend ist, um Hefezellen zu Kolonien heranwachsen zu lassen. Auch Verunreinigungen, z.B. durch abgestorbene Hefezellen, die ihr Histidin in das umgebende Medium freisetzen, können anderen Zellen zum Überleben und Wachstum verhelfen. Daher müssen die gewachsenen Hefekolonien auf die Aktivität des zweiten Reportergens, des LacZ-Gens, getestet werden. Dieses geschieht in einem X-Gal Filterassay.

Nitrozellulosefilter (Hybond™-C Extra, Amersham) wurden auf die entsprechenden Selektionskulturschalen gelegt und zu testende, mit Bait- und Prey-Plasmiden transformierte ( $\rightarrow$  5.5.2.1) HF7c-Kolonien mit Hilfe steriler Zahnstocher linienförmig auf ihnen ausgestrichen. Den Hefen wurde über Nacht Gelegenheit gegeben, bei 30 °C im Brutschrank auf der Filteroberfläche zu wachsen. Am nächsten Tag wurden die Filter mit nach oben weisender Kolonieseite in flüssigen Stickstoff getaucht, wodurch die Zellen aufbrachen, und dann bei Raumtemperatur aufgetaut.

In leere Kulturschalen wurde je 1,8 ml Z-Puffer/X-Gal-Mix gegeben. Ein Whatman-Rundfilter wurde hineingelegt und auf seiner Oberfläche mit nach oben zeigender Kolonieseite der aufgetaute Nitrozellulosefilter aufgelegt. Die Petrischale wurde mit Parafilm abgedichtet und bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 30 Minuten, 4 h und 12 h wurde

auf Blaufärbung kontrolliert. Dabei gibt der Zeitpunkt des Auftretens einer ersten Blaufärbung einen ersten groben Hinweis auf die Stärke der Wechselwirkung (30 Minuten = starke, 4 h = mittlere und 12 h = schwache Interaktion). Die Filter wurden unter dem Abzug getrocknet und aufbewahrt.

### 5.5.2.5 Bait-Verlustkultur

Auch unter den sich blau färbenden Kolonien können sich falsch Positive befinden, z.B. wenn das Prey-Protein allein an die DNA binden kann und dadurch auch ohne Wechselwirkung mit dem Bait-Protein die Reportergene zur Expression angeregt werden. Diese falsch positiven Zellen können identifiziert werden, indem man durch geschickte Wahl der Selektionsmedien die Hefe dazu bringt, das Bait-Plasmid zu verlieren und nur noch das Prey-Plasmid zu exprimieren. Alle Kolonien, die wirkliche Wechselwirkung zwischen Bait-Protein und Prey-Protein zeigen, sollten nun in einem X-Gal-Test weiß bleiben, die falsch positiven aber nach wie vor blaue Färbung tragen. Letztere werden daraufhin verworfen, aus ersteren kann die Plasmid-DNA isoliert werden.

Eine Kolonie Bait- und Prey-Plasmid enthaltender HF7c (→ 5.5.2.3) wurde in 2 ml -Trp- bzw. -Leu-Flüssigmedium in einem Reagenzglas über Nacht bei 30 °C im Wasserbadschüttler kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Zellsuspension 1:500 mit Aqua bidest. verdünnt und 10 µl der Verdünnung mit 190 µl Aqua bidest. auf -Trp- bzw. -Leu-Kulturplatten gleichmäßig verteilt. Nach etwa 3 Tagen Inkubation bei 30 °C im Brutschrank waren gut sichtbare Einzelkolonien gewachsen. Durch Verwendung eines samtbezogenen Stempels wurden Replika auf -Leu/-Trp-Platten angefertigt, auf denen über Nacht bei 30 °C im Brutschrank die Kolonien erneut hochwachsen konnten, die noch immer beide Plasmide enthielten. Während der Kultur im -Trp-Medium hatten aber einige Zellen das Bait-Plasmid verloren, da dessen Vorhandensein keinen Überlebensvorteil mehr bot. Diese Zellen konnten zwar auf -Trp-Platten wachsen, sterben aber auf den -Leu/-Trp-Schalen. Sie wurden für das weitere Arbeiten gezielt ausgewählt und auf frischen -Trp bzw. -Leu-Platten ausgestrichen.

Alternativ zu dieser Methode konnte auch aus den Hefezellen, die sowohl noch das Bait- als auch das Prey-Plasmid enthielten, direkt Plasmid-DNA isoliert (→ 5.5.3.1) und zur Amplifikation in kompetente DH5α Bakterien transformiert werden (→ 5.1.3.8). Erfahrungsgemäß nehmen Bakterien bei einer Transformation nur ein Plasmid auf und durch anschließende erneute Plasmidisolation und entsprechende Kontrollverdaue konnten die Bakterienklone identifiziert werden, die das Prey Plasmid enthielten.

## 5.5.3 DNA-Gewinnung, Sequenzierung und Identifikation

Zur Identifizierung der auf dem Prey-Plasmid codierten cDNAs wurden diese Vektoren aus Hefezellen isoliert (→ 5.5.3.1), für eine weitere Amplifikation und Aufreinigung in den Bakterienstamm DH5α transformiert (→ 5.1.3.8) und dann erneut isoliert (→ 5.1.4). Die cDNA-Inserts der aufgereinigten Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des ABI Prism 377 Sequenzierautomaten sequenziert (→ 5.1.7) und durch eine computergestützte Datenbanksuche im Internet identifiziert (→ 5.5.3.3).

### 5.5.3.1 Plasmidisolation aus Hefezellen [200]

1,5 ml einer Hefe-Übernachtskultur wurden 10 Sekunden bei  $12.000 \times g$  in der Tischzentrifuge sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl Glasperlen wurde für 5 Minuten im IKA-Vibrax geschüttelt. Dadurch wurden die Zellwände mechanisch aufgebrochen. Nach erneuter Zugabe von 100 µl STET-Puffer wurde der Ansatz gevortext und dann für 3 Minuten bei 100 °C gekocht. Nach Abkühlung auf Eis

und 10 minütiger Zentrifugation bei 4 °C (12.000 × g) wurden 100 µl des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß überführt, welches bereits 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat enthielt. Es folgten 30 Minuten Inkubation bei -20 °C und 10 Minuten Zentrifugation (12.000 × g) bei 4 °C. 100 µl des Überstandes wurden zu 400 µl vorgekühltem 100 %igem Ethanol gegeben, gemischt, 5 Minuten auf Eis stehen gelassen und anschließend 10 Minuten mit 12.000 × g zentrifugiert. Nachdem das DNA-Pellet trocknen konnte, wurde es in 10-20 µl 1× TE gelöst. Zur weiteren Amplifikation wurden auf diese DNA-Lösung 200 µl ultrakompetente DH5α gegeben und mit den Hefepiasmiden transformiert (→ 5.5.3.2). Zur endgültigen Gewinnung der Plasmid-DNA wurden Bakterien Plasmidpräparationen durchgeführt (→ 5.1.4).

### 5.5.3.2 Transformation mit Plasmid-Isolaten aus Hefezellen

200 µl Aliquots der ultrakompetenten DH5α wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit Hefe-Isolaten (→ 5.5.3.1) vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 30 Sekunden einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Flüssigmedium wurden die Zellsuspensionen für 1 h bei 37 °C in einem Luftschüttler geschüttelt, um ihnen die Expression des auf den Plasmiden lokalisierten Ampicillin-Resistenzgens zu ermöglichen, dann à 200 µl auf LB+Amp.-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

### 5.5.3.3 Identifikation von cDNA-Sequenzen durch computer-gestützten Datenbankvergleich

Auf Diskette gespeicherte DNA-Sequenzen (→ 5.1.6) wurden mit Hilfe der Blast-Search-Funktion des



im World Wide Web des Internet identifiziert.