

2. MATERIALIEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Geräte

ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer		Applied Biosystems, Foster City/USA
Bakterienschüttler		New Brunswick Scientific, Edison/USA
Blotkammer (Fast-Blot)		Biometra, Göttingen/D
Brutschränke		Heraeus, Osterode/D
Feinwagen		Sartorius, Göttingen/D
Fluorescent Image Analyzer (FLA-2000)		Fuji Photo Film CO. Ltd., Tokyo/J
Fluorometer		Turner Designs, Sunnyvale/USA
Fotodokumentationsanlage		Intas, Göttingen/D
Gefrierschränke	-80°C	Heraeus, Hanau/D
		Forma Scientific, Marietta/USA
	-20°C	Liebherr, Biberach/Riss/D
		Bosch, Stuttgart/D
Gelelektrophoresesysteme, horizontal		Biometra, Göttingen/D
Gelelektrophoresesysteme, vertikal		GE Healthcare, Uppsala/S
		PEQLAB, Erlangen/D
Gene Pulser		BioRad, Hercules/USA
Konfokales Laser Scanning Mikroskop		Zeiss, Jena/D
Kühlschränke		Bosch, Stuttgart/D
		Liebherr, Biberach/Riss/D
Lichtmikroskope		Zeiss, Jena/D
		Nikon, Tokyo/J
Microlumat Plus LB96V		EG&G Berthold, Bad Wilbach/D
Magnetrührer		IKA-Werk, Staufen/D
pH-Messgerät		Beckman Coulter, Fullerton/USA
Photometer		Beckman Coulter, Fullerton/USA

Pipetten		Gilson, Middleton/USA Eppendorf, Hamburg/D
Röntgenfilmentwicklerstrasse		AGFA, Mortsel/B
Röntgenkassetten		MS Laborgeräte, Wiesloch/D
Schwenkschüttler		Biometra, Göttingen/D
Spannungsquellen		Biometra, Göttingen/D Hofer Scientific Instruments, San Francisco/USA
SpeedVac-Zentrifuge		Savant, Hicksville/USA
Thermocycler		Applied Biosystems, Foster City/USA Biometra, Göttingen/D
Transilluminator		MS Laborgeräte, Wiesloch/D
Ultraschallgerät		Heinemann, Schwäbisch Gmünd/D
UV-Handlampe		Novodirect, Kehl/D
Vakuumapparatur (QIAvac 6S)		
Vortex		Roth, Karlsruhe/D
Wasserbäder		Thermo Haake, Karlsruhe/D GFL, Burgwedel/D
Zentrifugen	Biofuge primo R	Heraeus, Hanau/D
	Multifuge 3/3-R	Heraeus, Hanau/D
	RC5C+	Sorvall, Langenselbold/D

2.1.2 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt wurden alle verwendeten Chemikalien bei der Firma Merck, Darmstadt bezogen und entsprachen dem Reinheitsgrad p.a. oder aber der höchsten verfügbaren Reinheitsstufe.

Acrylamid 40 % (Arylamid-Bisacrylamid 29:1)	Roth, Karlsruhe/D
Acrylamid 30 % (Arylamid-Bisacrylamid 37,5:1)	Roth, Karlsruhe/D
Ade	Sigma, St. Louis/USA
Agarose LE und MP	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Amidoschwarz	Serva, Heidelberg/D
APS	Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg/USA

3-AT	Sigma, St. Louis/USA
Bacto Agar	Difco, Detroit/USA
Bacto Pepton	Difco, Detroit/USA
Bacto Trypton	Difco, Detroit/USA
Bacto Yeast Extrakt	Difco, Detroit/USA
ddH ₂ O	Fluka, Buchs/CH
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg/D
BSA	Roth, Karlsruhe/D
Chloroform/Isoamylalkohol	Appligene Oncor, Illkirch/FR
dNTPs	Roche Diagnostics, Mannheim/D
Dextranblau	Serva, Heidelberg/D
DTT	Roche Diagnostics, Mannheim/D
DMEM-Pulver	Invitrogen, De Schelp/NL
DMSO	Merck, Darmstadt/D
Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg/D
EDTA	Merck, Darmstadt/D
FKS	Invitrogen, De Schelp/NL
Glutathion	Sigma, St. Louis/USA
[γ ³² P]ATP	GE Healthcare, Uppsala/S
Hoechst 33258 Farbstoff	GE Healthcare, Uppsala/S
IPTG	Biomol, Hamburg/D
Leu	Sigma, St. Louis/USA
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg/D
NP40	Sigma, St. Louis/USA
TEMED	Bethesda Research Laboratories (BRL), Gaithersburg/USA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Appligene, Illkirch/FR
Ponceau S-Lösung	Roth, Karlsruhe/D
Roti-Blue Coomassie-Färbelösung	Roth, Karlsruhe/D
SDS	Serva, Heidelberg/D
SeaPrep (low melting point) Agarose	Cambrex, Rockland/USA
Sucrose	Biomol, Hamburg/D
Tris	Biomol, Hamburg/D
Trp	Sigma, St. Louis/USA

Tween 20	Fluka, Buchs/CH
X-Gal	Biomol, Hamburg/D

2.1.3 Enzyme

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Enzyme bei der Firma New England Biolabs, Beverly/USA bezogen und in den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen und Puffern eingesetzt.

Benzonase (25 KU/ μ l)	EMD Biosciences, San Diego/USA
High Fidelity Polymerase ($3,5 \times 10^3$ U/ml)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/D
Lyticase (200 U/mg)	Takara Bio, Otsu/J
Proteinase K (5 mg/ml)	Quiagen, Valencia/USA
r-Lysozym (30 KU/ μ l)	EMD Biosciences, San Diego/USA
Trypsin	Invitrogen, De Schelp/NL

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

Maus anti-FLAG M2 monoklonal (1 mg/ml)	Sigma, St. Louis/USA
Maus anti-His monoklonal (0,2 mg/ml)	Dianova, Hamburg/D
Maus anti-Biotin Agarose (1 ml bindet 3,1 μ g Biotin)	Sigma, St. Louis/USA

Sekundärantikörper

Ziege anti-Maus IgG polyklonal (POD-konjugiert, 0,8 mg/ml)	Dianova, Hamburg/D
Maus anti-Biotin monoklonal (POD-konjugiert, 6,3 mg/ml)	Sigma, St. Louis/USA

2.1.5 Proteinstandard

BenchMark™	Invitrogen, De Schelp/NL
------------	--------------------------

2.1.6 Nukleinsäuren

DNA aus Kalbsthymus (500 ng/μl, 2000 ng/μl)	Boehringer, Mannheim/D
φX174-DNA, HaeIII Verdau (150 ng/μl)	New England Biolabs, Beverly/USA
λ-DNA, HindIII Verdau (150 ng/μl)	New England Biolabs, Beverly/USA
carrier DNA (Heringshoden, 20 mg/ml)	Takara Bio, Otsu/J

2.1.7 Vektoren

pAM4	(94)
pAM9	(94)
pGADT7	Takara Bio, Otsu/J
pGADT7-T	Takara Bio, Otsu/J
pGBKT7	Takara Bio, Otsu/J
pGBKT7-Lam	Takara Bio, Otsu/J
pGBKT7-53	Takara Bio, Otsu/J
pGEX-6P-1	GE Healthcare, Uppsala/SE
pGL3-p	Promega, Madison/USA
pORF4A	(98)
pRep-mutI	(94)
pRep-mutII	(94)
pRep-mutP	(94)
pSK 140	(95)
pSVL-rep	(96)
pSVL-rep'	(96)
pSVL-SV40	GE Healthcare, Uppsala/S
pTriEx1.1	GE Healthcare, Uppsala/S
pUC19	New England Biolabs, Beverly/USA

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren, die nicht käuflich erworben wurden, sind im Anhang A.4 näher beschrieben.

2.1.8 Oligonukleotide und Primer

Die Namen und Sequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Primer sind dem Anhang A.5 und A.6 zu entnehmen.

2.1.9 Zelllinien, Bakterienstämme, Hefestämme

Zelllinien

PK15-Zellen

Permanente Schweinenierenzelllinie,
Stammsammlung RKI

Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α

F'/endA1 hsdR17(r_K^- , m_K^+) supE44 thi-1
recA1 gyrA (Nal^r)relA1 D(lacZYA
argF)_{U169} deoR (ϕ 80lacZ Δ M15)
(Invitrogen, De Schelp/NL,
Hanahan, 1983)

E. coli BL21

F⁻ ompT hsdS_B (r_B^- , m_B^-) gal dcm
(GE Healthcare, Uppsala/SE)

E. coli Electro MAXTMDH10BTM

F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)
 Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR
recA1araD139 Δ (ara-leu)7697 galU
galK rpsL endA1 nupG
(Invitrogen, De Schelp/NL)

RosettaBlue(DE3)pLacI

endA1 hsdR17(r_{K12}^- m_{K12}^+)supE44 thi-1
recA1 gyrA96 relA1 lac(DE3)
[F⁺ proA⁺B⁺ lacI^qZ Δ M15::Tn10]
pLacIRARE² (Cam^R, Tet^R)
(EMD Biosciences, San Diego/USA)

Hefestamm

AH109 MATa trp1-901 leu2-3 112 ura3-52
 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ LYS2 ::
 GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 GAL2_{UAS}-
 GAL2_{TATA}-ADE2 URA3 :: MEL1_{UAS}-
 MEL1_{TATA}-lacZ
 (Takara Bio,(69))

2.1.10 Reagenziensätze

ABIPRISM™ Dye Terminator
 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Applied Biosystems, Foster City/USA
 BugBuster Protein Extraction Reagent EMD Biosciences, San Diego/USA
 DO -Ade/-His/-Leu/-Trp Takara Bio, Otsu/J
 DO -Leu/-Trp Takara Bio, Otsu/J
 Dual Light Kit Applied Biosystems, Foster City/USA
 Effectene Transfection Reagent Qiagen, Valencia/USA
 Expand High Fidelity PCR System Roche Diagnostics, Mannheim/D
 His Bind Purification Kit EMD Biosciences, San Diego/USA
 ECL Plus Western Blotting Detection Reagent GE Healthcare, Uppsala/S
 QIAprep 8 Miniprep Kit Qiagen, Valencia/USA
 QIAGEN Plasmid Maxi and Midi Kit Qiagen, Valencia/USA
 QIAquick PCR Purification Kit Qiagen, Valencia/USA
 QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen, Valencia/USA
 Z-competent *E. coli* Buffer Set Zymo Research, Orange/USA

2.1.11 Filter, Membranen, Säulen

Filterpapier Whatman, Dassel/D
 Immubilon PVDF-Membran Millipore, Schwalbach/D
 MicroSpin Columns GE Healthcare, Uppsala/S
 Microcon YM-10 Millipore, Schwalbach/D
 Oligotexsäulen Qiagen, Valencia/USA
 Poly-Prep Chromatographiesäulen BioRad, Hercules/USA
 Sterilfilter (0,2 und 0,45 μ m) Whatman, Dassel/D

2.1.12 Kunststoffartikel

Cryogefäße		Nunc, Roskilde/DK
Elektroporationsküvetten		BioRad, Hercules/USA
Einweg-Zelkulturgefäße		Nunc, Roskilde/DK
Küvetten		Sarstedt, Nümbrecht/D
PCR-Pipettenspitzen mit Aerosolschutz		Molecular Bio Products San Diego/USA
PCR-Pipettenspitzen ohne Aerosolschutz		Süd Laborbedarf, Gauting/D
PCR-Reaktionsgefäße	0,2 ml	Eppendorf, Hamburg/D Applied Biosystems, Foster City/USA
Reaktionsgefäße	0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht/D
	1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg/D
	15 ml, 50 ml	Falcon, Oxnard/USA Greiner, Nürtingen/D
96-well Mikrotiterplatten und Abdeckplatten		Greiner, Nürtingen/D
Zentrifugationsgefäße		DuPont NEN, Boston/USA Kontron Instruments, Whatford/GB Falcon, Oxnard/USA

2.1.13 Glaswaren

Bechergläser	Labor Brand, Giessen/D
Erlenmeyerkolben	Labor Brand, Giessen/D
Erlenmeyerkolben mit Schikane	Labor Brand, Giessen/D
Pipetten	Labor Brand, Giessen/D

2.1.14 Weitere Verbrauchsmaterialien

Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala/S
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Uppsala/S
Ni-NTA-Agarose	EMD Biosciences, San Diego/USA
Protein G-Sepharose	EMD Biosciences, San Diego/USA
Complete EDTA free	Roche Diagnostics, Mannheim/D

2.1.15 Antibiotika

Ampicillin	Sigma, St. Louis/USA
Chloramphenicol	Sigma, St. Louis/USA
Kanamycin	Sigma, St. Louis/USA
Penicillin G/Streptomycin	Invitrogen, De Schelp/NL

2.2 Nährmedien und Lösungen**2.2.1 Zellkultur**Einfriermedium

50	%	DMEM-Medium
40	%	FKS
10	%	DMSO

FKS-Lösung

Invitrogen, De Schelp/NL

Trypsin EDTA

0,25	%	Trypsin
3	mM	EDTA
in PBS, pH 7,2		

DMEM-Medium

DMEM-Pulver für 10 l	
37	g NaHCO ₃
ad 10 l, pH 7,2 (HCl)	
sterilfiltrieren	

Zellkulturmedium

DMEM-Medium	
0,2	g Penicillin G
0,2	g Streptomycin
5	% FKS
sterilfiltrieren	

2.2.2 E. coliLB-Agar

17 g/l Bacto Agar
in LB-Medium
autoklavieren

LB-Medium

10 g/l Bacto Trypton
5 g/l Bacto Yeast Extrakt
10 g/l NaCl
pH 7,5 (NaOH)
autoklavieren

SOB-Medium

20 g/l Bacto Trypton
5 g/l Bacto Yeast Extrakt
0,58 g/l NaCl
0,19 g/l KCl
pH 7,0 (NaOH)
autoklavieren
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
sterilfiltriert

SOC-Medium

20 mM Glucose in SOB
sterilfiltriert

2.2.3 Yeast Two-HybridEinfriermedium

75 % YPD-Medium
25 % Glycerin
autoklavieren

SD-Agar

6,7 g Yeast Nitrogen Base
20 g Agar
100 ml DO Solution (10 x)
bzw. 100 ml Trp-/Leu-Lösung (10 x)
50 ml Glucose (40 %)
ad 1 l, pH 5,8
autoklavieren

SD-Medium

6,7	g	Yeast Nitrogen Base
100	ml	DO Solution (10 x)
(100	ml	Trp-/Leu-Lösung (10 x))
50	ml	Glucose (40 %)
		ad 1 l, pH 5,8
		autoklavieren

YPD-Agar

20	g/l	Bacto Pepton
10	g/l	Bacto Yeast Extract
20	g/l	Agar
50	ml	Glucose (40 %)
		ad 1 l, pH 6,5 (HCl)
		autoklavieren

YPD-Medium

20	g/l	Bacto Pepton
10	g/l	Bacto Yeast Extract
50	ml	Glucose (40 %)
		ad 1 l, pH 6,5 (HCl)
		autoklavieren

YPDA-Agar

20	g/l	Bacto Pepton
10	g/l	Bact Yeast Extract
20	g/l	Agar
15	ml	Ade-Lösung (0,2 %)
50	ml	Glucose (40 %)
		ad 1 l, pH 6,5 (HCl)
		autoklavieren

YPDA-Medium

20	g/l	Bacto Pepton
10	g/l	Bacto Yeast Extract
15	ml	Ade-Lösung (0,2 %)
50	ml	Glucose (40 %)
		ad 1 l, pH 6,5 (HCl)
		autoklavieren

2.2.4 semi solid ProtokollEinfriermedium

175	%	LB-Medium (2x)
25	%	Glycerin
		autoklavieren

2x LB-Medium

20	g/l	Bact Trypton
10	g/l	Bacto Yeast Extract
10	g/l	NaCl
		ad 1 l, autoklavieren

2.3 Puffer- und Gebrauchslösungen

Wenn hier nicht angeführt, ist die Zusammensetzung der jeweiligen Puffer und Lösungen den entsprechenden Protokollen des Herstellers zu entnehmen.

10 % APS-Lösung

100 g/l APS

X-Gal-Lösung

50 g/l X-Gal in DMF

3 M NaAc-Lösung

246,09 g/l NaAc

PBS nach Dulbecco

140 mM NaCl
10 mM Na₂HPO₄
2 mM KCl
2 mM KH₂PO₄
pH 7,2 (HCl)

TE-Puffer

10 mM Tris
0,1 mM EDTA
pH 8,3 (HCl)

Restriktions-/Ligationspuffer

50 mM Tris
150 mM NaCl
10 mM MgCl₂
5 mM DTT
1 mM EDTA
pH 7,5 (HCl)

2.3.1 Agarosegelelektrophorese

Ethidiumbromidlösung

10 g/l Ethidiumbromid

DNA-Probenpuffer

7 Teile 70 % Sucrose
5 Teile Brompheelblaulösung
gesättigt

Laufpuffer

2x TBE
0,4 µg/ml Ethidiumbromid

TBE-Puffer

45 mM Tris-Borat
1 mM EDTA
pH 8,3 (HCl)

2.3.2 FluorometerLösung A

0,1 ml/l Hoechst 33258 Lösung
in TNE-Puffer

Lösung B

1 ml/l Hoechst 33258 Lösung
in TNE-Puffer

Hoechst 33258 Lösung

1 g/l Hoechst 33258 Farbstoff

TNE-Puffer

10 mM Tris
200 mM NaCl
1 mM EDTA
pH 7,4 (HCl)

2.3.4 SDS-PAGEEntfärbelösung

25 % Methanol
5 % Essigsäure

Färbelösung

20 ml Methanol
60 ml ddH₂O
20 ml Roti-Blue (5x)

Laufpuffer

0,25 M Tris
2 M Glycin
1 % SDS

2x Probenpuffer

0,125 M Tris
4 % SDS
20 % Glycerin
0,02 % Bromphenolblau
5 % β-Mercaptoethanol
2 mM EDTA
pH 6,8 (HCl)

Sammelgelpuffer

1 M Tris
pH 6,8 (HCl)

10 % SDS-Lösung

100 g/l SDS

Trenngelpuffer

1,5 M Tris
pH 8,8 (HCl)

2.3.5 PAGELaufpuffer

0,5 x TBE
1 % Glycerin

Probenpuffer

7 Teile 70 % Sucrose
5 Teile Bromphenolblaulösung
gesättigt

2.3.6 Western Blot10x AP-Puffer, pH 7,4

1 M Tris
1 M NaCl
25 mM MgCl₂
pH 7,4 (HCl)

10x AP-Puffer, pH 9,5

0,5 M Tris
0,5 M NaCl
25 mM MgCl₂
pH 9,5 (HCl)

Blockpuffer

Waschpuffer I
3 % BSA

Entfärbelösung

500 ml Methanol (98 %)
1400 ml H₂O
100 ml Essigsäure (100 %)

Ponceau S-Färbelösung

0,1 % Ponceau S
1 % Essigsäure

Transferpuffer

28 mM Tris
22 mM Glycin
0,1 % SDS
11 % Methanol
ad 1 l

Waschpuffer I

AP-Puffer (pH 7,4)
0,05 % Tween 20

Waschpuffer II

AP-Puffer (pH 9,5)

Amidoschwarz-Färbelösung

0,2 g Amidoschwarz
90 ml Methanol
20 ml Essigsäure (100 %)

2.3.7 Yeast Two-Hybrid0,2 % Ade-Lösung

2 g/l Ade
autoklavieren

10x Trp-Lösung

200 mg/l Trp
autoklavieren

1 M 3-AT-Lösung

84,08 g/l 3-AT
autoklavieren

40 % Glucoselösung

400 g/l Glucose
sterilfiltriert

10x Leu-Lösung

1000 mg/l Leu
autoklavieren

10x LiAc-Lösung

1 M LiAc
pH 7,5 (HCl)
autoklavieren

X-Gal-Lösung

4 mg/ml X- α -Gal in DMF

50 % PEG-Lösung

500 g/l PEG 3350
autoklavieren

PEG/LiAc-Lösung

8 ml PEG (50 %)
1 ml TE (10x)
1 ml LiAc (10x)
autoklavieren

20 % SDS-Lösung

200 g/l SDS

10x TE-Puffer

0,1 M Tris
10 mM EDTA
pH 7,5 (HCl)
autoklavieren

TE/LiAc-Lösung

8 ml ddH₂O
1 ml TE (10x)
1 ml LiAc (10x)
autoklavieren

2.3.8 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl (pH 8)

10 mM reduziertes Glutathion

Sofern nicht anders vermerkt, handelt es sich um wässrige Lösungen in bidestilliertem H₂O. Auch in den nachfolgenden Abschnitten steht H₂O immer für die Verwendung von gefiltertem (Millipore Ionenaustausch- und Filtrationsanlage) und anschließend bidestilliertem Wasser.