

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Medien, Lösungen, Bakterienstämme und Vektoren

Die verwendeten Feinchemikalien, Antibiotika und sonstigen Substanzen sind, wenn keine Firma angegeben ist, von Sigma oder Merck bezogen worden.

Tab. 2: Bakterienmedien und Antibiotikazusätze

Name	Zusammensetzung
LB	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Bacto Hefe Extrakt; 1 % NaCl; pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/L Agar
M9 Minimal-Medium	0,6 % Na ₂ HPO ₄ ; 0,3 % KH ₂ PO ₄ ; 0,05 % NaCl; 0,1 % NH ₄ Cl; 2 mM MgSO ₄ ; 0,2 % Glukose; 0,1 mM CaCl ₂ ; 1 mM Thiamin; pH 7,4
M9 Minimal-Agar	M9 Minimal-Medium mit 20 g/L Agar

Ampicillin wurde in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Medium, Kanamycin mit 50 µg/ml Medium eingesetzt.

Herstellung von M9 Trp⁻-Medium

Pro Liter wurden 10 g M9 Minimal Salts (Sigma) und 0,5 g NaCl (für Agarplatten zusätzlich 20 g Agar) mit Aqua bidest. ad 850 ml gebracht und der pH mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Es wurde mit Aqua bidest. auf 900 ml ergänzt und 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden 2 ml 1 M MgSO₄, 5,6 ml 45 % D-(+)-Glukoselösung (Sigma), 0,1 ml 1M CaCl₂, 1 ml Ampicillin-Stock, 1 ml 1 M Thiamin-HCl (Life Technologies) und 100 ml 10x Trp⁻-Lösung (s. Hefemedien) zugegeben und gemischt. Alle eingesetzten Lösungen wurden vorher unter Verwendung von 0,22 µm-Membranfiltern sterilfiltriert.

Tab. 3: Puffer

Name:	Zusammensetzung:
0,5 % Lysispuffer	0,5 % Triton; 20 mM Tris, pH 7,7; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA
1 % Lysispuffer	1 % Triton; 20 mM Tris, pH 7,7; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA
Waschpuffer	0,02 % SDS in 1 % Lysispuffer
Probenpuffer	Laemmli Sample Buffer (BioRad) 5 % β -Mercaptoethanol (Sigma)
Laufpuffer	1 Teil 10x Tris/Glycine/SDS Buffer (BioRad); 9 Teile H ₂ O
Transferpuffer	1 Teil Premixed 10x Tris/Glycine Buffer (BioRad); 2 Teile Ethanol (Merck); 7 Teile H ₂ O
Blockierungspuffer	50 g Trockenmilch; 10 g BSA (Sigma); 100 ml FKS (Biochrom KG) in 840 ml PBS/Tween 0,1 %
PBS/Tween 0,1 %	0,1 % Tween 20 (Sigma) in PBS
Binding Puffer	10 mM Hepes/NaOH; pH 7,4; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl ₂ in H ₂ O
Stripping Puffer	30 ml Wasserstoffperoxyd 30 % (Merck); 30 ml PBS
GST-Binding Puffer	1 % Triton, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , PBS
GST-Lyse-Puffer	1 % Triton in PBS, 1 Spatelspitze Lysozym
Elutions-Puffer	50 mM Tris-HCL, 10 mM red. Glutathion, pH 8
DNA 6x-Loading-Puffer	10 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, 10 % Ficoll-400 (w/v), 0,4 % Orange-G (w/v) in H ₂ O

Den verschiedenen Lysispuffern und dem Waschpuffer wurden Protease-Inhibiator Tabletten (Roche) kurz vor der Benutzung zugefügt. Dabei wurde die Menge der Herstellerangabe verdoppelt.

Tab. 4: Lösungen

Name	Zusammensetzung
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	137 mM NaCl; 3 mM KCl, 16.5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
TE	10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8,0
10x TE	0,1 M Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA
10x LiOAc	1M Lithiumacetat
50 % PEG 3350	500 g/L Polyethylenglykol 3350
TE/LiOAc	1 Teil 10x TE, 1 Teil 10x LiOAc, 8 Teile Aqua bidest.
TE/LiOAc/PEG	1 Teil 10x TE, 1 Teil 10x LiOAc, 8 Teile 50 % PEG3350
65 % Glycerol/MgSO ₄	65 % (w/v) Glycerol; 100 mM MgSO ₄ ; 25 mM Tris-HCl pH 8,0
TAE	40 mM Tris-Acetat; 1mM EDTA; pH 7,2
10x BU-Salze	70g/L Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O; 30 g/L NaH ₂ PO ₄ ; pH 7

Name	Zusammensetzung
X-Gal-Stock	100 mg/ml X-Gal in N,N-Dimethylformamid
Trypsin/EDTA	0,25 % Trypsin; 0,02 % EDTA in PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺

Bakterienstämme

Für die Transformation von Vektoren in *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) wurden elektrokompetente One Shot[®] TOP10-Zellen (Invitrogen) verwendet. Rekombinantes Protein wurde in dem *E. coli* Stamm BL21 (DE3) (Novagen) produziert. Er enthält den lysogenen Phagen DE3 und exprimiert nach IPTG-Induktion die T7-Polymerase.

Vektoren

Zur Proteinexpression in eukaryontischen Zellen wurden der Vektor pcDNA3 (Invitrogen) mit eingefügtem V5-Tag sowie der kommerziell erhältliche Vektor pCMV-Tag2 (FLAG-Tag) eingesetzt. Für den *in vitro*-Bindungs Assay wurde der Vektor pGex (Amersham Biosciences) zur Herstellung der GST-Fusionsproteine verwendet.

2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.1. Zellkultur und Medien für eukaryontische Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit 25 – 175 ml Fassungsvermögen oder 6-Loch-Platten (Greiner) bei 37°C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Vor Verwendung wurden die Zellen mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und bei Bedarf die Zellzahl im „Coulter Z2“-Zellzähler (Beckman-Coulter) bestimmt.

Verschiedene Zelllinien wurden für die unterschiedlichen Nachweisverfahren verwendet. Für Transfektionen sowie Kolokalisationsexperimente wurden HEK 293T-Zellen (ATCC Nr.: CRL-11268[™]), Humane embryonale Nierenzellen, Adenovirus immortalisiert, Cos7-Zellen (ATCC Nr.: CRL-1651[™]), SV-40 immortalisierte Fibroblastenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze, sowie 3T3 (ATCC Nr.: CRL-10686[™]), fibroblastenartige embryonale Mäusezellen, eingesetzt. Für den Nachweis von nativem IL-16 und HS1 wurden C8166-Zellen

verwendet. Hierbei handelt es sich um eine HTLV-1 immortalisierte, CD4-positive T-Zelllinie.

Tab. 5: Zelllinien (Alle Medien: Biochrom AG)

Zellen	Medium	Additive
HEK 293T	DMEM	Für alle Medien:
Cos7,	CMRL 1066	10 % FKS (Life Technologies), 1 %
C8166	RPMI 1640	Antibiotic/Antimycotic 100x (Gibco BRL),
3T3	DMEM	2 mM L-Glutamin (Biochrom AG)

Die Suspensionszelllinie C8166 wurde in Zellkulturflaschen gehalten und bei Bedarf das Medium gewechselt sowie ein Teil der Zellen verworfen. Die adhären Zellen HEK 293T, 3T3 und Cos7 wurden zum Umsetzen durch eine Inkubation für ca. 2 min mit einer PBS - 0,25 % Trypsin / 0,02 % EDTA Lösung vom Flaschenboden gelöst und in 10 ml PBS aufgenommen. Davon wurde ein Teil ausgesät.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Western Blot

SDS-PAGE

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde die Auftrennung von Proteinfractionen unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Mini Protean II und III, BioRad) durchgeführt. Die Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Sammelgel (4 - 5 %) konzentriert und über ein Polyacrylamid-Trenngel (7,5 - 15 %) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Gelherstellung und die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgten nach den Angaben von BioRad (Tris/Glycin, Laemmli). Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf PVDF-Membranen geblottet.

Blotting

Das Übertragen der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (Immun-Blot™PVDF Membrane, BioRad) erfolgte im Semi-Dry-Blot Verfahren mit der Trans-Blot SD®-Semi Dry Transfer Cell (BioRad) nach den Angaben des Herstellers mit einem elektrophoretischen Proteintransfer (1 h, 10 Volt) auf die Membran.

Detektion

Die geblottete Membran wurde 1 h bei RT in Blockierungspuffer auf einem Horizontalschüttler blockiert und dann mit dem primären Antikörper (AK) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde mit dem sekundären AK inkubiert, wenn nicht bereits der erste AK mit HRP konjugiert war, 2 h bei RT. Nach viermaligem Waschen mit PBS-Tween wurde detektiert durch Schwärzung eines Röntgenfilms durch Chemilumineszenz. Die Chemilumineszenz wurde mit dem ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers erzeugt.

Tab. 6: Antikörper und ihre Verdünnung im Western Blot

Direkt-Konjugat	Verdünnung	Firma
Mouse α -V5-HRP	1:10 000	Invitrogen
Primär-Antikörper	Verdünnung	Firma
Mouse α -human IL16 Klon 14.1	1:1000	Becton Dickinson Biosciences
α -GST	1:20 000	Amersham
Mouse α -HS1	1:1000	Becton Dickinson Biosciences
Goat α -IL-16	1:500	R&D Systems
Rabbit α -Flag	1:500	Sigma
Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Firma
Donkey α -goat IgG-HRP	1:5000	Santa Cruz
Goat α -Mouse IgG-HRP	1:1000	Sigma

2.3.2. Herstellung von rekombinanten Proteinen in *E. coli*

Die zu exprimierenden Sequenzen wurden in den Vektor pGex kloniert. Die Bakterien wurden in ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht kultiviert. Das Bakterienpellet wurde am nächsten Tag in 400 ml ampicillinhaltigem Medium bis

zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert und anschließend mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach weiteren 3 h wurden die Bakterien pelletiert und über Nacht bei -80°C deponiert. Die Zellen wurden in 30 ml GST-Lyse-Puffer aufgeschlossen und 5 - 10 U Benzonase zugefügt. Nach 15 min wurde die Probe einer dreiminütigen Ultraschallbehandlung unterzogen. Anschließend wurde 30 min bei 15 560 g zentrifugiert. Dem Überstand wurden 300 μl gewaschene und in PBS resuspendierte GST-Sepharose (Glutathion Sepharose 4B, Amersham Biosciences) zugefügt, 20 min überkopfgeschüttelt und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Das Gemisch wurde in eine Plastiksäule (PolyPrep Chromatography Columns, BioRad) gegeben und 3 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 4 x 500 μl Elutionspuffer zugegeben und das Eluat aufgefangen. Auf einem SDS-Gel wurden die Eluate auf das Vorhandensein der entsprechenden Proteine untersucht. Die positiven Proben wurden dialysiert und sterilfiltriert. In einer Bestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde die Proteinkonzentration ermittelt. Die so hergestellten GST-Fusionsproteine wurden im *in vitro*-Bindungs Assay eingesetzt.

2.3.3. Ko-Immunopräzipitation

Die Ko-Immunopräzipitation zählt zu den biochemischen Methoden zur Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Zelle. Dabei werden Zellen mit den zwei Expressionsplasmiden, die für die zu untersuchenden Proteine kodieren, transfiziert und nach Zelllyse ein Protein durch Zugabe von spezifischen Antikörpern und Protein A-Sepharose 10 % (FastFlow[®], Amersham Biosciences) präzipitiert. Nach Abtrennung von anderen Zellbestandteilen werden die Proteinkomplexe in ihre Fragmente zerlegt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wird anschließend mit spezifischen Antikörpern der Bindungspartner detektiert.

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die transfizierten HEK 293T-Zellen mit 1 ml Lysispuffer 1 % Triton 5 min bei RT inkubiert, mit PBS abgelöst und in Eppendorf-Gefäße überführt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 4°C im Überkopf-Schüttler, der sich eine Zentrifugation von 30 min bei 10.000 g und 4°C anschloss. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und 30 min

bei 115.600 g in der L8-70 Class H-Ultrazentrifuge (Beckmann) bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der klare Überstand mit 1 µg AK (siehe Ergebnisteil) und 100 µl Sepharose-A versetzt und 4 h bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Danach wurde 4 min bei 3000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 500 µl Lysispuffer 1 % Triton resuspendiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, wobei die letzte Zentrifugation bei 10.000 g stattfand. Der Überstand wurde völlig entfernt und das Pellet mit 10 µl Aqua bidest. und 10 µl Laemmli Sample Buffer (BioRad) versetzt. Es folgte die Analyse im Western Blot.

2.3.4. Nachweis endogener Proteine mittels Immunopräzipitation

Bei dieser Methode werden Proteine in der Zelle ohne vorherige Transfektion detektiert. Nach Zellyse wird ein endogenes Protein durch Zugabe von spezifischen Antikörpern und Protein A-Sepharose präzipitiert. Nach Abtrennung von anderen Zellbestandteilen werden die Proteinkomplexe in ihre Fragmente zerlegt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wird anschließend mit spezifischen Antikörpern der Bindungspartner detektiert.

C8166 Suspensionszellen (2×10^7 Zellen) wurden 5 min bei 1000 g und RT pelletiert. Der Überstand wurde völlig entfernt und das Pellet in 100 µl Lysispuffer 1 % Triton resuspendiert. und 30 min bei 15.560 g zentrifugiert. Nach der Überführung des klaren Überstandes in neue Reaktionsgefäße wurden 1 µg AK und 100 µl Sepharose-A 10 % zugegeben und 4 h bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Danach wurde 4 min bei 3 000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 500 µl Lysispuffer 1 % Triton resuspendiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, wobei die letzte Zentrifugation bei 10.000 g stattfand. Der Überstand wurde völlig entfernt und das Pellet mit 10 µl Aqua bidest. und 10 µl Laemmli Sample Buffer (BioRad) versetzt. Es folgte die Analyse im Western Blot, wobei hier der Interaktionspartner mit einem spezifischen AK detektiert wurde.

2.3.5. *In vitro*-Bindungs Assay

Mit dieser Methode lassen sich Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* detektieren. Hierfür wurden Zellen mit nur einem Expressionsplasmid, welches das Baitprotein kodiert, transfiziert. Anders als bei der Ko-Immunopräzipitation wird hierbei nach der Zellyse mit einem GST-Fusionsprotein (pGex), welches mit GST-Sepharose (Glutathion Sepharose 4B, Amersham Biosciences) präzipitierbar ist, inkubiert und präzipitiert. Nach Abtrennung von anderen Zellbestandteilen werden die Proteinkomplexe in ihre Fragmente zerlegt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western Blot wird anschließend mit spezifischen Antikörpern der Bindungspartner detektiert.

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die transfizierten HEK 293T-Zellen mit 1 ml Lysispuffer 0,5 % Triton, 5 min bei RT inkubiert, mit PBS abgelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei 4°C im Überkopf-Schüttler, der sich eine Zentrifugation von 30 min bei 10.000 g und 4°C anschloss. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 5 µg GST-Fusionsprotein bzw. dem Kontrollprotein und 20 µl GST-Sepharose versetzt. Anschließend wurde 2 h bei 4°C im Überkopf-Schüttler inkubiert. Danach wurde 4 min bei 3000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 500 µl GST-Binding-Puffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt, wobei die letzte Zentrifugation bei 10.000 g stattfand. Der Überstand wurde völlig entfernt und das Pellet mit 10 µl Aq. bidest. und 10 µl Laemmli Sample Buffer (BioRad) versetzt. Es folgte die Analyse im Western Blot, wobei hier der Interaktionspartner mit spezifischen AK detektiert wurde.

2.4. Immunofluoreszenz Mikroskopie

Die adhärennten Zelllinien (Cos7 und 3T3) wurden in 6-Loch Platten mit pro-IL-16-V5 und FLAG-HS1 mit dem Polyfect-Reagenz (Qiagen) transfiziert. Die Kultivierung erfolgte auf Deckgläschen. Nach 24-48 h wurden die Zellen mit 2 % Formaldehyd (Sigma) in PBS für 30 min fixiert und anschließend mit 0,5 % Triton X-100 in PBS 15 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und einer 20 minütigen Inkubation mit 0,5 %igem Blockierungspuffer wurden die

Zellen mit dem Primär-Antikörper, gelöst in Blockierungspuffer, für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 30 min mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper bei RT inkubiert (AK siehe Tab. 7). Anschließend wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf Objektträgern befestigt. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Laserscan-Mikroskop (LSM510, Axioplan 2, Zeiss).

Tab. 7: Für die Immunofluoreszenzmarkierung verwendete Antikörper

Primär-Antikörper	Verdünnung	Firma
Rabbit α -Flag	1:500	Sigma
Mouse- α -PK-Tag	1:500	Serotac

Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Firma
Goat α -Rabbit FITC	1:500	Jackson Immuno Research
Goat α -mouse Cy3	1:300	Jackson Immuno Research

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert und nach Erhalt auf eine Konzentration von 10 μ M eingestellt. Die folgenden Oligonukleotide wurden als Primer in der PCR und zum Teil auch in Sequenzierungsreaktionen eingesetzt:

Tab. 8: In der PCR verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
T 7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCG-3'
M 13	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
pEG202_F	5'-AGCAGAGCTTCACCATTG-3'
pEG202_R	5'-AGAAATTCGCCCGGAATTAGC-3'
Gex_F	5'-ACCATCCTCCAAAATCGGATCTC-3'
Gex_R	5'-TTTTACCGTCATCACCGAAACG-3'
Target_F	5'-CTGAGTGGAGATGCCTCC-3'
Target_R	5'-GCCGACAACCTTGATTG-3'
pYes_F	5'-GATGTTAACGATACCAGCC-3'
pYes_R	5'-GCGTGAATGTAAGCGTGAC-3'
Pro-IL-16 forw	5'-GCGCAGGCTGGATCCCCATGGACTATAGCTTTGATACCACA-3'
Pro-IL-16-102_F	5'-GCGCAGGCTGAATTCGCTTCAGACCCAAGAGGGCTCCCTG-3'
Pro-IL-16-174_F	5'-GCGCAGGCTGAATTCCTTGGGAAGCATGAGGAAGGACGG-3'
Pro-IL-16-342_R	5'-GACATCGAAGCGCCGCTCACAAGGCAGATGTTTCAGCAGAACC-3'
Pro-IL-16-78_F	5'-GCGCAGGCTGAATTCAGAAAGGTCTCTCTGTGGCTCCC-3'
Pro-IL-16-51_F	5'-GCGCAGGCTGAATTCGGCCACCCAGATGGGACCCACCA-3'

Name	Sequenz
CORTSH3GEX_F	5'-ATCCAGGCTGAATTCTATCCCCGAGAGGACAGCACCTACGATGAG-3'
HIPSH3GEX_F	5'-ATCCAGGCTGAATTCGTGCAGGCAGAAGAGGAGGCTGTGTATG-3'
LASPSH3GEX_F	5'-ATCCAGGCTGAATTCGCCGTGGCCAGTCCTATGGTGGCTACAAG-3'
HS1flag_F	5'-ACGGCAGAATTCTGATGTGGAAGTCTGTAGTGGGCCAT-3'
HS1flag_R	5'-ATCGCCGTGGTTCGACTCACTCCAGAAGCTTGACATAATT-3'
Lasp1_F	5'-GACGGCAGCAGCTACC-3'
LaspDSH3_R	5'-GATATCATTGCGGCCGCCTACCGCTTCCCCGCCACCACCTGG-3'
SH3Abp1_F	5'-TATCAGGCTGAATTCTGATTCAGGGCCAGGGGCTCAGTG-3'
Abp1DSH3_R	5'-ATCATTGTTCGACGCGGCCGCTCACGTACAGGGCACGGGCACAGA G-3'
SH3HS1_F	5'-ATTGACTATGAATTCTGTGCCCGGCTGGGGCTGGGGCTG-3'
SH3Lasp1_F	5'-TATCAGGCTGAATTCTGCCAGTCTCCATACAGCGCAGCG-3'
SH3Cort_F	5'-GCGCAGGCTGAATTCTGTACGAGAACGATCTGGGGTACAC-3'
Mut1_F	5'-CACTGTGAAGAAAGGTCCAGCTGTGGCTGCCAAGCCAGCCTGGTTT CGC-3'
Mut1_R	5'-GCGAAACCAGGCTGGCTTGGCAGCCACAGCTGGACCTTTCTTCACA GTG-3'
Mut2_F	5'-CAGAAAACCTCTCGCCCCTGGCGCGGACCCGCTCCTAAGGCTGCTGT CGACACAGGCTG-3'
Mut2_R	5'-CAGCCTGTGTCGACAGCAGCCTTAGGAGCGGGTCCGCGCCAGGGG CGAGAGTTTTCTG-3'

2.5.2. DNA-Sequenzierung nach Sanger

Diese DNA-Sequenzierung bezeichnet man auch als Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren. Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der von Sanger *et al.* (1977) beschriebenen Methode.

Das sog. „Cycle-Sequenzierung“ wird methodisch von der PCR abgeleitet. Die zu sequenzierende DNA wird als Matrize eingesetzt. Im Gegensatz zur PCR wird aber nur ein Primer benötigt, dieser bindet nach Denaturierung des Doppelstrangs an einen Einzelstrang und stellt somit den Startpunkt für die DNA-Synthese dar. Die DNA-Polymerase baut die ihr zur Verfügung gestellten Nukleotide in den neuen Strang ein. Der Nukleotid-Mix besteht aus dNTPs und ddNTPs. Letztere sind unterschiedlich fluoreszenzmarkiert und ihnen fehlt eine 3'OH-Gruppe, so dass es zum Kettenabbruch kommt. Nach thermischer Denaturierung kann erneut ein Primermolekül an die Matrize binden und der Vorgang von Elongation und Kettenabbruch wiederholt werden. Die Elektrophorese der denaturierten Ansätze in 4,8 %igem Polyacrylamidgel ermöglicht die Auftrennung von Banden mit einem Unterschied von nur einer Base. In Folge der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung der vier ddNTPs kann die Sequenz anhand der verschiedenen fluoreszierenden Banden ermittelt werden. Die Auftrennung der

Sequenzierungsprodukte erfolgte mittels ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit der Software von Chromas und der Clone Manager-Software.

Sequenzierungsansatz:

	30-300 ng	Template DNA
	1 µl	BigDye™-Premix
	1,5 µl	Puffer
	30 ng	Primer
ad	10 µl	Aqua dest.

Im BigDye™-Premix (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Fa. Perkin Elmer) enthalten sind *AmpliTaq* DNA-Polymerase, dNTPs, ddNTPs und Puffer.

PCR-Bedingungen:

1x	2 min	94°C	Denaturierung
25 Zyklen	15 sek	94°C	Denaturierung
	4 min	60°C	Primer-Annealing und Elongation

2.5.3. Sequenzauswertung

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Blast-Programm über die NCBI-Hompage (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) mit in der öffentlichen Datenbank vorhandenen Sequenzen verglichen.

2.5.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der PCR lassen sich gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei Primern mit bekannter Sequenz eingegrenzt werden, amplifizieren. Von den Primern ausgehend synthetisiert eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase in 3'→5'-Richtung einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nukleinsäure-Matrize. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt die DNA-Sequenz zwischen den Primern amplifiziert werden.

Der erste Teilschritt einer PCR ist die thermische Denaturierung. Hierbei wird bei ca. 90-94°C die zu amplifizierende DNA aufgeschmolzen. Dadurch entstehen einzelsträngige Matrizenmoleküle. Bei einer niedrigeren Temperatur hybridisieren die Primer an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA, was die Elongation einleitet. Diese erfolgt bei 72°C durch die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen) oder *Pfu* Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene). Letztere besitzt eine proofreading-Aktivität. Das Prinzip der PCR ist die vielfache Wiederholung der Teilschritte, wodurch immer mehr identische Teilbereiche der Matrize gebildet werden. Die Kopienzahl steigt durch diese Reaktionsreihenfolge exponentiell an. Die Reaktion findet unter Zugabe von dNTPs und MgCl₂ statt. Die optimalen Bedingungen bezüglich der Temperaturen, Primer- und Magnesiumchloridkonzentration sowie der Anzahl der Zyklen sind Template- und Primerabhängig. Zur Kontrolle wird die DNA auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Die PCR wurde in einem PTC-200 DNA-Engine Thermocycler (Biozym) durchgeführt. Standard-PCR-Programm und prinzipielle Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes:

PCR-Ansatz:

	500 pg – 100 ng	Template DNA
	5 µl	Polymerase-Puffer 10x
	15 pmol	For/Rev-Primer
	2,5 U	Polymerase
ad	50 µl	Aqua dest.

PCR-Bedingungen:

1x	2 min	95°C	Denaturierung
35 Zyklen	30 sek	95°C	Denaturierung
	30 sek	60°C	Primer-Annealing
	1 min pro kb	72°C	Elongation
1x	10 min	72°C	Finale Elongation

2.5.5. *In vitro*-Mutagenese

Zum Austausch einzelner oder mehrerer Basen bzw. Aminosäuren werden Primerpaare verwendet, die an den entsprechenden Stellen mit den vorgesehenen Mutationen versehen sind. Dabei können Erkennungsstellen für

Restriktionsendonukleasen eingefügt werden, mit denen man den neusynthetisierten DNA-Strang vom Matrizenstrang unterscheiden kann. Mit der *Pfu* Turbo-DNA-Polymerase (Stratagene) wird dann der komplette Vektor neu amplifiziert. Anschließend erfolgt der Verdau des Templatevektors (1h bei 37°C) mit 20 Units Dpn I, welches nur die methylierte DNA aus *E. coli* erkennt und spaltet. Von diesem Ansatz werden 1 µl in Top10-Zellen (Invitrogen) elektroporiert und die erhaltene Plasmid-DNA mit dem Restriktionsverdau überprüft.

2.5.6. Restriktion mit Endonukleasen

Endonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA spezifisch spalten können. Die verwendeten Typ-2-Restriktionsendonukleasen erkennen jeweils eine palindromartige Sequenz und erzeugen Enden mit 5'-Überhang.

Die Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers (NEB). Vektoren sind 2 h und PCR-Produkte 4-5 h verdaut worden. Anschließend erfolgte die Analyse im Agarose-Gel und die Aufreinigung des gewünschten DNA-Abschnitts aus dem Gel (siehe Gelextraktion).

2.5.7. Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Dabei werden DNA-Fragmente zwischen 100 und 10.000 bp bei einem pH-Wert $\leq 7,5$ und hohen Salzkonzentrationen an eine Silikagelmembran gebunden, durch Waschschriffe gereinigt und mit 30 µl Aqua bidest. eluiert.

Gelextraktion

Bei der Agarosegel-Elektrophorese werden DNA-Fragmente durch ihre Mobilität im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt und durch Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht.

Zur Gelherstellung wurde Agarose (Biozym) und TAE-Puffer (Endkonzentration 0,8 bis 2 %, w/v) zusammen in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend ist 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) hinzugegeben und die flüssige Agarose in den

Gelschlitten mit Gelkamm (BioRad) eingefüllt worden. Nach ca. 30 min wurde das erkaltete Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer (Mini-Sub Cell, Wide Mini-Sub Cell, Bio-Rad) gelegt.

Die PCR-Amplifikate wurden mit DNA 6x-Loading-Puffer versetzt, bevor 5 µl in die Geltaschen pipettiert wurden. Als Größenstandard wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße eine 10 bp-, eine 100 bp-, eine 1 kb-Leiter oder die DNA eines HindIII-verdauten λ -Phagen (Life Technologies) verwendet. An die Elektrophorese-Kammer wurde eine Spannung von 85 V angelegt. Nach erfolgter DNA-Auftrennung wurde das Gel auf einen UV-Transilluminator gelegt und die DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick[®] oder MinElute[®] Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Dabei wird das Gel bei 50°C in einem Solubilisierungs- und Bindepuffer mit pH-Indikator aufgelöst und anschließend mit Isopropanol versetzt. Das weitere Aufreinigungsprinzip ist identisch mit dem der PCR-Aufreinigung, wobei auch hier mit 30 µl Aqua bidest. eluiert wurde.

Die DNA-Konzentration wurde mit einem UV-Spektrophotometer bei der Wellenlänge 260 nm gemessen. Dabei entspricht eine OD=1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook, 1989).

2.5.8. Ligation und Transformation

Ligation

Die T4-DNA-Ligase verknüpft unter Verbrauch von ATP-Molekülen freie 3'-OH-Gruppen mit 5'-Phosphatresten unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen. Damit können DNA-Abschnitte in geschnittene Vektoren eingefügt werden.

Der Ligationsansatz von 10-20 µl enthielt Vektor (100 ng) und Insert in einem molaren Verhältnis von 1:3, Ligasepuffer und 40 IU T4-DNA-Ligase (NEB). Mit Aqua bidest. wurde auf das Endvolumen aufgefüllt.

Transformation von *E. coli*

Elektrokompetente TOP 10- (Invitrogen) und KC8-Zellen (BD Clontech) wurden nach Anleitung wie folgt elektroporiert: Die Elektroporationsküvette mit 0,2 cm

Elektrodenabstand (BioRad) wurde in Eis vorgekühlt. Nach Zugabe von 1 μ l Ligationsansatz oder Plasmid wurden die im Eis aufgetauten Bakterien (50 μ l) zugefügt. Die Transformation erfolgte bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω mit dem Gene Pulser II (BioRad). Sofort nach dem Puls wurde den Bakterien 250 μ l bzw. 1 ml SOC-Medium (Sigma) zugegeben. Nach Überführung in ein 15 ml Reaktionsgefäß erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und 250 rpm im Schüttler. Anschließend wurden 25 und 75 μ l des Ansatzes auf antibiotikahaltige Agarplatten (\varnothing 10 cm) verteilt.

2.5.9. Transfektion

Die transiente Transfektion von HEK 293T- und Cos7-Zellen mit den pcDNA3/V5- und den HS1-Plasmiden fand mit Hilfe des Polyfect® oder Effectene® Transfection Reagent (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers statt. Die Zellen wurden in Petrischalen (\varnothing 10 cm) in 10 ml Medium kultiviert und mit einer Mischung aus 1 μ g Plasmid-DNA, 8 μ l Enhancer und 12 μ l Effectene® 6 h bei 37°C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchte inkubiert. Danach wurde mit 5 ml PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und in frischem Medium 48 - 72 h weiterinkubiert. Die transfizierten Zellen wurden anschließend im Western Blot und in den verschiedenen Kolokalisationsexperimenten eingesetzt.

2.5.10. Plasmidisolierung

Plasmidisolierungen aus *E. coli* fanden nach Angaben des Herstellers mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit oder dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) statt. Hierbei werden die Bakterien über eine alkalische Lyse aufgeschlossen, die DNA an eine Silikagelmembran (Spin Miniprep) oder eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden, gereinigt und mit Aqua dest. eluiert.

Zur Plasmidisolierung aus Hefen wurde der QIAprep® Spin Miniprep Kit verwendet, wobei die Hefen zum Aufschluss zunächst mit 800 μ l Y-PER® Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce) suspendiert und 10 min bei 65°C im Thermoblock inkubiert wurden. Anschließend wurde für 5 min bei 10 000 g und RT

zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Hefepellet nach Herstellerangaben weiterbehandelt.

2.6. Yeast Two-Hybrid-System

Entwickelt wurde das Prinzip des Two-Hybrid von Fields und Song (Fields and Song, 1989) durch die Kenntnisse der Arbeiten über Hybrid-Transkriptionsaktivatoren aus LexA-Repressor (*E. coli*) und Gal4-Protein (Hefe) (Brent and Ptashne, 1985). Es beruht auf der Funktionsweise eukaryontischer Transkriptionsfaktoren, die aus zwei Domänen aufgebaut sind. Die DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) positioniert den Transkriptionsfaktor in räumlicher Nähe zur Transkriptionseinheit, während die Aktivierungsdomäne (AD) durch Wechselwirkung mit dem basalen Transkriptionsapparat die Transkription von Genen initiiert. Als Weiterentwicklung des klassischen Yeast Two-Hybrid-Systems, das die Gal4-DNA-BD verwendet, gilt das LexA-basierte System (Gyuris *et al.*, 1993), welches auch als Interaction Trap bezeichnet wird. Die Vorteile gegenüber dem Gal4-System liegen in der Wahl der Selektionsmarker, der Galaktose-abhängigen Expression des AD-Fusionsproteins, der schwächeren synthetischen AD B42 (Ma and Ptashne, 1987) und der Tatsache, dass LexA ein bakterielles Protein ist und so eine Aktivierung durch die Hefe ausgeschlossen wird.

2.6.1. Yeast Two-Hybrid Assays

Die Yeast Two-Hybrid Untersuchungen wurden mit dem DupLEX-A[®] Yeast Two-Hybrid System (OriGene) durchgeführt. Untersucht wurden zwei kommerzielle cDNA-Bibliotheken, eine oligo-d(T)-geprimte Bibliothek humaner Leukozyten (PBL, OriGene) und eine random geprimte Milz Bibliothek (Invitrogen).

Hefemedien

Es sind die vorgeschriebenen Minimal- und Dropout-Medien (DO-Medien, BD Clontech, Tab. 9) nach Anleitung des Herstellers hergestellt worden, wobei für die DO-Medien 10x-Stocks und für die Minimal SD Base-Medien 5x-Stocks eingesetzt wurden.

Tab. 9: Für den Yeast Two-Hybrid Assay verwendete Dropout-Medien

Plasmid	LexA-System
-	YPD
Reporter	Ura ⁻
Bait	His ⁻
Target	Trp ⁻

Hefestämme

Zur Selektion von Targetvektoren nach der Plasmidisolierung aus den Hefen im LexA-System sind die vorgeschriebenen elektrokompetenten KC8-Zellen (BD Clontech) eingesetzt worden. Im DupLexA-System wurde der Hefestamm EGY48 verwendet. Er enthält sechs *lexA*-Operatoren vor dem *Leu2*-Gen, was die größtmögliche Sensitivität gewährleistet.

Vektoren

Für die Hefearbeiten wurden die Vektoren des kommerziell erhältlichen Systems DupLEX-A[®] Yeast Two-Hybrid System (OriGene) verwendet.

Transformation von Hefen

Für das LexA-Hefesystem wurde ein Transformationsprotokoll nach der Lithiumacetat-Methode (Gietz *et al.*, 1992; Schiestl and Gietz, 1989) verwendet. Die DNA-Aufnahme in die Hefezellen erfolgt in Anwesenheit von Carrier-DNA, Lithiumionen, Polyethylenglykol (PEG) und DMSO mittels Hitzeschock.

Die Transformation der Hefen erfolgte nach den *Yeast Transformation Protocols* (BD Clontech), wobei nach der *small scale*-Version vorgegangen worden ist. Die Transformation der cDNA-Bibliotheken fand nach dem *large scale*-Protokoll statt, wobei die Mengen auf zehn getrennte Ansätze aufgeteilt wurden. Abweichend vom Protokoll wurde der Hitzeschock statt 15 min bei 42°C auf zweimal 8 min bei 42°C geteilt, wobei eine Zwischeninkubation von 8 min auf Eis eingeschoben wurde. Außerdem wurde nach dem Zentrifugationsschritt vor dem Ausplattieren 1 h bei Hefewachstumstemperatur (30°C) im DO-Medium bei 225 rpm geschüttelt

(5 ml bzw. 50 ml bei Bibliothek-Transformation), erneut zentrifugiert und in TE-Puffer resuspendiert.

2.6.2. Yeast Two-Hybrid Analyse

Es wurde das Lex-A Yeast Two-Hybrid System (Origen) verwendet. Zunächst fand die Klonierung der Köder mittels PCR, Restriktionsverdau und Ligation in die entsprechenden Vektoren statt. Neben den Tests auf Autoaktivierung erfolgten die Transformation, der Bibliotheken-Screen und die Untersuchungen zur Spezifität der Wechselwirkung nach den Herstellerangaben. Evtl. Abweichungen sind in den entsprechenden Methodenabschnitten erwähnt.

Repressions-Assay

Dieser Test dient dem Nachweis der Fusionsproteine im Zellkern, was eine zwingende Voraussetzung zur Funktionsweise dieses Systems ist. Dazu wird eine Kotransformation des Hefestamms EGY48 mit dem jeweiligen Bait-Konstrukt im Vektor pEG202, zusammen mit dem Vektor pJK101, der zwischen dem Operator zur Reporterogenaktivierung einen *lexA*-Operator enthält, durchgeführt. Gelangt das Köderfusionsprotein in den Zellkern und kann an den *lexA*-Operator binden, so wird die Transkription des Reportergens gehemmt bzw. völlig unterdrückt.

Interaktionstest

Da die Targetproteine auf Grund eines *Gal1*-Promotors auf dem Plasmid nur mit Galaktose, und nicht mit Glukose, gebildet werden, erfolgt der Interaktionstest auf X-Gal-haltigen Platten, die entweder Glukose oder Galaktose als Kohlenstoffquelle enthalten. Eine wirkliche Interaktion ermöglicht den Hefen ein Galaktose-abhängiges Wachstum in Abwesenheit von Leucin und eine Blaufärbung mit X-Gal.

Spezifitätstest

Um eine spezifische Interaktion mit dem Köder nachzuweisen, werden die Hefen mit den Targetplasmiden transformiert, die entweder das zu testende Protein oder ein Kontroll-Bait (pBait, leerer Vektor) als Köder enthalten. Eine Interaktion ist unspezifisch, wenn der Interaktionstest auch mit dem Kontroll-Bait positiv verläuft.

Auch hierbei ist eine Interaktion durch Galaktose-abhängiges Wachstum in Abwesenheit von Leucin und eine Blaufärbung mit X-Gal nachweisbar.