

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von Fluka, Buchs, Schweiz bezogen.

Acrylamid PAGE 20%	Plus One (Pharmacia Biotech), Dübendorf, Schweiz
Agarose	GibcoBRL (Invitrogen), Basel, Schweiz
Ammoniumacetat	J. T. Baker (P. H. Stehelin & Cie AG), Basel, Schweiz
Ammoniumchlorid	Merck, Luzern, Schweiz
Ampicillin	
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, Reinach, Schweiz
Bakto-Agar	Difco-Laboratories, Augsburg, Deutschland
Bakto-Pepton	Difco-Laboratories, Augsburg, Deutschland
Benzamidin	Sigma, Buchs, Schweiz
"Bovine Serum Albumine" (BSA)	
BenchMark "Pre-Stained Protein Ladder"	Invitrogen, Basel, Schweiz
Benzamidin	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
beta-Mercaptoethanol	
Kalziumchlorid	
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
Dextrose	Difco-Laboratories, Augsburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
EDTA	
Ethanol	
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
Galaktose	Difco-Laboratories, Augsburg, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz

---

IGF-1	Calbiochem, Luzern, Schweiz
Isopropanol	
Kanamycin Sulfat	
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
Lipofektin	Invitrogen, Basel, Schweiz
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
Magnesiumchlorid	
Methanol	Kantonsapotheke Zürich
Methylbisacrylamid 2%	Plus One (Pharmacia Biotech), Dübendorf, Schweiz
Mineralöl	Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz
Mowiol	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
NP-40	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka, Buchs, Schweiz
Penicillin / Streptomycin	GibcoBRL (Invitrogen), Basel
PMSF	Amersham, Dübendorf, Schweiz
"Sodium Dodecylsulfate" (SDS)	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
"Sodium Chloride"	J. T. Baker (P. H. Stehelin & Cie AG), Basel, Schweiz
TEMED	BioRad, Reinach, Schweiz
Trasyolol	Bayer, Zürich, Schweiz
Triton X-100	
Trypsin-EDTA	Biological Industries (Inotech), Dottikon, Schweiz
X-Gal	Quantum Biotechnologies, Kanada

### 3.1.2 Antikörper

Wenn nicht anders angegeben wurden die verwendeten Antikörper von Santa Cruz Biotechnology (LabForce), Nunningen, Schweiz bezogen.

anti-Abl (24-11)

anti-Aktin (I-19)

anti-APC (N-15)

anti-beta-Catenin (E-5)

anti-Bcr (C-20)

anti-Bcr (N-20)

anti-ErbB2 (C-18)	
anti-HA (Y-11)	
anti-Myc (A-14)	
anti-Tcf-1 (H-18)	
anti-Lef1 (C-20)	
anti-Maus HRP	Amersham, Dübendorf, Schweiz
anti-Ratte HRP	Amersham, Dübendorf, Schweiz
anti-Ziege HRP	Amersham, Dübendorf, Schweiz
anti-Erbin-PDZ	Peptid-Antikörper; Peptid kodiert für die PDZ-Domäne; Medizinische Virologie der Universität Zürich
anti-Rel	Upstate (LuzernaChem), Luzern, Schweiz
anti-Maus IgG Fluorescein (FI-2001)	Exalpha, Basel, Schweiz

### 3.1.3 Kits

#### für Hefearbeiten:

Qiaquick, PCR-Produkt Aufreinigung	Qiagen, Basel, Schweiz
FastDNA Präparation	Bio 101 (LuzernaChem), Luzern, Schweiz

#### sonstige:

Dual-Luziferase Reporterassay	Promega, Mannheim, Deutschland
ECL <sup>TM</sup> Western blot Detektion	Amersham Pharmacia Biotech
Mutagenese	Stratagene
Plasmid Midi-, Maxi-, Giga- Präparation	QIAGEN, Basel, Schweiz
QIAquick Gelextraktion	QIAGEN, Basel, Schweiz
"Rapid" Ligation	Roche, Mannheim, Deutschland
BrdU-Proliferationstest	Roche, Mannheim, Deutschland

### 3.1.4 cDNA-Bibliotheken

#### für Heferversuche:

"Pretransformed MATCHMAKER Library"	
PJ69-2A, humane Gehirnzellen-cDNA-Bibliothek in pACT2	Clontech, Heidelberg, Deutschland

**B-Zell-Bibliothek, humane periphere Lymphozyten-cDNA in pACT**

Die cDNA-Bibliothek wurde aus mRNA von mit Epstein-Barr-Virus (EBCV) transformierten humanen, peripheren Lymphozyten hergestellt, über die BglII-Schnittstelle in pACT kloniert und amplifiziert. Die Bibliothek wurde von Stephen J. Elledge, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA zur Verfügung gestellt (*Durfee et al., 1993*).

**T-Zell-Bibliothek, humane T-Zell-Bibliothek in pGAD10**

Die cDNA-Bibliothek wurde unter Verwendung von mRNA aus Jurkat-Zellen hergestellt und über EcoRI-Schnittstellen in pGAD10 kloniert ("humane leukemia MATCHMAKER cDNA library"; Clontech, Heidelberg, Deutschland)

**für PCRs:**

Gehirnzellen-cDNA-Bibliothek ("Marathon-Ready", Clontech, Heidelberg, Deutschland)

**3.1.5 Plasmide**

pGAD10	Plasmid für Hefe Zwei-Hybrid Versuche, <i>leu2</i> , ADH Promotor, Gal4AD, Amp <sup>R</sup> , Col E1, tADH1, Col E1 ori (Clontech)
pGAD424	Plasmid für Hefe Zwei-Hybrid Versuche, <i>leu2</i> , ADH Promotor, Gal4AD, Amp <sup>R</sup> , tADH1, Col E1 ori (Clontech)
pACT	Plasmid für Hefe Zwei-Hybrid Versuche, <i>leu2</i> , ADH Promotor, Gal4AD, Amp <sup>R</sup> , Col E1, tADH1 (Clontech)
pACT2	Plasmid für Hefe Zwei-Hybrid Versuche, Derivat von pACT, besitzt erweiterte MCS, <i>leu2</i> , ADH Promotor, Gal4AD, Amp <sup>R</sup> , Col E1, tADH1 (Clontech)
pGBT9PheS	Plasmid für Hefe Zwei-Hybrid Versuche, Derivat von pGBT9, kodiert für PheS (DL-4-Chlorphenylalanin) ( <i>Kast et al., 1991; Kast., 1991; Kast, 1994; Schneider et al., 1997</i> ), pADH1, Gal4DBD, tADH1, TRP1, <i>PheS</i> -Gen, Col E1 ori, Amp <sup>R</sup>
pGAD424-ErbinCT	A. Reß, Medizinische Virologie der Universität Zürich
pGAD424-KIAA1225 (PDZ: 1-4)	A. Reß und N. Hardel, Medizinische Virologie der Universität Zürich

pGBT9PheS-ProteinCT von:

APC, BcrWT, c-Rel, ErbB2, ErbB4  
ErbinCT, Kv4.2, Kv4.3, Ryk, Pmel,  
Bax, BAI-1, MAGE-1, EphB2, Let23,  
EphrinB1-3, HTLV1-Tax,  
HPV16, 18, 68, 70-E6

A. Reß, Medizinische Virologie der  
Universität Zürich (siehe Tabelle 4.2,  
Kapitel 4.1.2)

pGAD424-Jab1 partiell

A. Reß, Medizinische Virologie der  
Universität Zürich

pcDNA3

Expressionsvektor,  
CMV Promotor, Neo<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>, Col E1 ori,  
(Invitrogen)

p<sup>45</sup> TCF-1B in pcDNA3,  
myc-beta-Catenin in cDNAI,  
flag-beta-Catenin(K435A) in pcDNA3

Prof. Dr. H. C. Clevers,  
University Medical Center, Utrecht

myc-beta-Catenin(K435A) in pcDNA3

A. Reß, Medizinische Virologie der  
Universität Zürich

myc-ErbinWT in pcDNA3

Prof. Dr. L. Mei, University of Alabama,  
Birmingham

myc-ErbinCT (1005-1371 AS) in pcDNA3

A. Reß, Medizinische Virologie der  
Universität Zürich

HA-BcrWT, HA-BcrVA, HA-BcrNT,  
BcrΔNT in pcDNA3

Dr. G. Radziwill, Medizinische Virologie  
der Universität Zürich

Bcr-Abl<sup>p210</sup> in pUCSV(B2)

Prof. Dr. Daley, Cambridge, Whitehead  
Institute for Biomedical Research

myc-ErbB2 in pSV2

Prof. N. E. Hynes, Friedrich Miescher  
Institut, Basel

Tax in pSG5

Prof. Dr. Jalimot, Institut National de la  
Recherche Scientifique, Lyon, Frankreich

APC in pQBI25

Prof. Dr. Yuko Mimori-Kiyosue, Science  
Center Building, Kyoto, Japan

benötigte Plasmide für TOPflash/FOPflash-  
Luziferaseassays, siehe Kapitel 3.2.6

### 3.1.6 Primer

Zur Identifikation der "full-length" cDNA von Klon1b (ErbinCT) wurden PCRs ausgeführt. Als Template für Primer wurde die cDNA von KIAA1225 genutzt. KIAA1225 weist die Sequenz vom Klon1b auf, einschließlich einem längeren, aber (damals !) nicht vollständigen N-Terminus. Als "forward" Primer, als Ergänzung zu dem "Adaptor"- und "Nested"-Primer vom "Marathon-Ready" cDNA Kit (Clontech) wurden die Primer 5` CGGAAGTGCCTGAAGTACTTG 3` ("Adaptor"-Primer) und 5`ACTATGAATAGACTGACC 3` ("Nested"-Primer) eingesetzt. In Datenbanken wurde nach ähnlichen DNA-Sequenzen gesucht, es konnten später (2001) signifikant ähnliche Sequenzabschnitte mit Erbin identifiziert werden.

### 3.1.7 Medien

#### Medien-Komponenten für die Bakterien-Zellkultur:

LB (Luria-Bertani)	Scharlau Chemie AG (EGT Chemie AG), Schweiz
LB-Agar	Scharlau Chemie AG (EGT Chemie AG), Schweiz

Zusammensetzung des Mediums (+/- Agar) für Bakterien:

40 g LB-Agar / 1 l Bidest  
25 g LB / 1 l Bidest

#### Medien-Komponenten für die eukaryontische Zellkultur:

DMEM (Dulbecco`s mod. eagle medium)-Medium	Invitrogen, Basel, Schweiz
RPMI (Roswell Park Memorial Institut) 1640-Medium mit L-Glutamin	Invitrogen, Basel, Schweiz
"fetal calf serum" (FCS, EuroBio)	Chemie Brunschwig, Basel, Schweiz
Penicillin-Streptomycin	GibcoBRL (Invitrogen), Basel, Schweiz
Trypsin-EDTA	Biological Industries, Inotech, Basel, Schweiz

Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums:

500 ml RPMI- bzw. DMEM-Medium  
1% Penicillin-Streptomycin  
5% FCS

### **Medien-Komponenten/Zusammensetzung für die Hefe-Zellkultur:**

Minimalmedium (für Selektion)

26,7 g Minimal SD Base (Clontech)  
2g "Droup-Out-Mix"  
auf 1 l dH<sub>2</sub>O

## **3.1.8 Puffer und Lösungen**

### ***Ampicillin-Stammlösung***

50 mg/ml in dH<sub>2</sub>O,  
sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert

### ***NETN-Lysepuffer***

20 mM Tris-HCl, pH: 7,5  
100 mM NaCl  
1 mM EDTA  
0,5% NP-40

### ***Eisenmann-Lysepuffer***

0,5% SDS  
0,5% NP-40  
0,5% DOC  
50 mM NaCl  
50 mM Tris-HCl, pH: 7,5

Kurz vor Gebrauch wurde zu beiden Lysepuffern auf 10 ml zugegeben:  
10 µl Trasyol, 100 µl PMSF (100mM), 10 µl Leupeptin, 200 µl beta-Glycerol-PO<sub>4</sub> (1M)

### ***"Droup-Out-Mix"***

26,7 g SD Minimal Base  
2g DO-Mix (z.B. Ura<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>-Medium)  
auf 1 l dH<sub>2</sub>O

### ***3-AT***

26,55 g 3-AT wurden mit dH<sub>2</sub>O in 100 ml gelöst, sterilfiltriert, bei -20°C gelagert

### ***Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Puffer (1 M)***

142 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> wasserfrei (Fluka)  
auf 1 l dH<sub>2</sub>O

### ***NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer (1 M)***

138 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \* H<sub>2</sub>O (Merck)  
auf 1 l dH<sub>2</sub>O

### ***LiAc-Puffer (3M)***

10,2 g LiAc  
auf 100 ml dH<sub>2</sub>O

### ***PEG-Lösung***

25 g PEG 4000  
auf 50 ml dH<sub>2</sub>O

***X-Gal-Färbelösung***

50 mg X-Gal wurden in 1 ml DMSO gelöst  
und zu 100 ml Phosphatpuffer\* pipettiert

***TE-Puffer (10x)***

10 mM Tris-HCl, pH: 7,5  
1 mM EDTA, pH: 8,0

**Trenngel und Sammelgel für 4 kleine SDS-Gele:*****SDS-Trenngel (10 %)***

7,1 ml dH<sub>2</sub>O  
5,0 ml 1,5 M HCl, pH: 8,8  
2,6 ml 2%iges Bisacrylamid  
5,0 ml 20%iges Acrylamid  
100 µl 20%iges SDS  
200 µl APS  
10 µl TEMED

***SDS-Proteingel-Laufpuffer (5x)***

192 mM Tris-HCl  
20% Glycerin  
0,5% SDS  
10% beta-Mercaptoethanol  
0,02% Bromphenolblau

***DNA-Probenpuffer (6x)***

0,25% Bromphenolblaulösung  
0,25% Xylencyanol  
30% Glycerin

***PDM-Puffer (2x)***

5 g PEG 6000  
2,5 ml DMSO  
0,5 g MgCl<sub>2</sub> (Fluka)  
gelöst in 25 ml LB, pH: 7,0

***Phosphatpuffer\****

5,77 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
4,23 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in 100 ml Bidest lösen

***TBE-Puffer (10x)***

1 M Tris-HCl  
0,5 M Borsäure  
40 ml 0,5 M EDTA  
auf 1 l dH<sub>2</sub>O

***SDS-Sammelgel***

5,6 ml dH<sub>2</sub>O  
2,3 ml 0,5 M HCl, pH: 8,8  
0,68 ml 2%iges Bisacrylamid  
1,28 ml 20%iges Acrylamid  
50 µl 20%iges SDS  
100 µl APS  
5 µl TEMED

***SDS-Proteingel-Transferpuffer***

200 ml Methanol  
100 ml 5x SDS-Proteingel-Laufpuffer  
700 ml dH<sub>2</sub>O

***TAE-Puffer (50x)***

242 g Tris-HCl  
57,1 ml Essigsäure  
100 ml 0,5 M EDTA, pH: 8,0  
auf 1 l dH<sub>2</sub>O

### 3.1.9 Zelllinien und ihre Haltung

HEK293-Zellen:	humane embryonale Nierenzelllinie (human epithelial kidney cells 293), immortalisiert durch Transformation mit Adenovirus 5; bezogen von ATCC
HEK293T-Zellen:	humane embryonale Nierenzelllinie (human epithelial kidney cells 293T); immortalisiert durch Transformation mit Adenovirus 5 und SV40 T-Antigen; bezogen von ATCC
MKN-7-Zellen:	humane Magenkarzinom-Zelllinie, aus dem Institutsbestand Medizinischen Virologie der Universität Zürich
HCT116-Zellen:	humane Kolonkarzinom-Zelllinie (human colon tumor cell linie 116) Expression von S45 beta-Catenin-Mutante (3 bp Deletion); induzierte Tcf-abhängige Genexpression; starke Expression von c-Myc; bezogen von ATCC
Hela-Zellen	humane Zervix-Adenokarzinom-Zelllinie (" <u>H</u> enrietta <u>L</u> acks"), aus dem Institutsbestand der Medizinischen Virologie der Universität Zürich
m Kü-, M279-Zellen	aus Tumoren etablierte humane Melanomzelllinien, aus dem Institutsbestand der Medizinischen Virologie der Universität Zürich
IK-21-11-99	etablierte humane leukämische T-Zelllinie, aus dem Institutsbestand der Medizinischen Virologie der Universität Zürich

**293-, 293T und MKN-7-Zellen:** Die Zellen wurden bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit in einem mit 5% CO<sub>2</sub> begasten Brutschrank gehalten. Als Medium diente DMEM (+ 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin). Die Zellen wurden bei 60 bis 80% Konfluenz gesplittet. Das Kulturmedium wurde dafür abgesaugt und für ca. 30 Sek. lang 2 ml Trypsin (+ 0,5% EDTA) auf die Zellen gegeben, welche anschließend für 5 Min. im Brutschrank inkubiert wurden. Die trypsinierten Zellen wurden dann auf die benötigten Zellkulturschalen verteilt.

**HCT116-, Hela-, mKü-, M279-Zellen:** Diese Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt, bis auf das hier verwendete RPMI-Medium.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Liposomale Transfektion von pDNA und RNA-Oligonukleotide

**Liposomale Transfektion von pDNA:** Für den liposomalen Gentransfer in HEK293-, HEK293T- und HCT116-Zellen wurde Lipofektin (Invitrogen) verwendet und nach Protokollvorschrift von Invitrogen angewendet.

**Liposomale Transfektion von siRNA:** Die siRNA-Duplexe wurden von "Dharmacon Research" bezogen. Die Transfektion von pDNA vermittelt durch Oligofektamin wurde nach Protokollvorschriften von "Dharmacon Research" durchgeführt. Die Transfektion erfolgte am ersten und zweiten Tag des Experiments. Lysiert wurden die Zellen nach vier Tagen. Verwendet wurden u.a. die folgenden RNA-Duplexe:

- siRNA Bcr (2741-2762 Nukleotide (N) der vollständigen cDNA 1-3683 N)

```
(1)  5` UGU CAU CGU CCA CUC AGC CTT 3`
(2)  3` GGC UGA GUG GAC GAU GAC ATT 5`
```

komplementärer Bcr siRNA-Duplex:

```
      UGU CAU CGU CCA CUC AGC CTT
TT ACA GUA GCA GGU GAG UCG G
```

- siRNA IL12 (Kontrolle)

```
(1)  5`AGG UCC AGG UGA UGU CAU CTT 3`
(2)  3`GAU GAC AUC ACC UGG ACC UTT 5`
```

komplementärer IL12 siRNA-Duplex:

```
      AGG UCC AGG UGA UGU CAU CTT
TT UCC AGG UCC ACU ACA GUA G
```

Mit der "NukleotidBlast"-Suche wurde für beide siRNA-Duplexe nach signifikant ähnlichen humanen DNA-Sequenzen gesucht und eine überlappende Komplementation mit anderen RNAs ausgeschlossen.

### 3.2.2 Zellyse

Für eine milde Lyse wurden 300 µl 1x NETN-Puffer bzw. 300 µl Eisenmann-Puffer für eine stringente Lyse auf die Zellkulturschale gegeben und 10 Min. auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde mit einem Zellschaber abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 15 Min. bei 4°C gerüttelt. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (10 Min., 14000 rpm, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Davon wurde ein 20 µl Aliquot als Direktlysat abgenommen, mit 20 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Min. bei 95°C inkubiert.

### 3.2.3 Nukleinsäuretechniken

Für die Plasmid-DNA-Präparation und -Aufreinigung wurden die Kits für die DNA-Mini-, Maxi-, Mega- und Gigapräparation, DNA-Gelextraktion, PCR-Reinigung und Nukleotidentfernung von Qiagen genutzt und nach Protokoll des Herstellers angewendet.

**Restriktionsverdau:** Restriktionsendonukleasen des Typs II schneiden dsDNA an spezifischen 4 bis 8 bp langen Erkennungsstellen und erzeugen dabei entweder überhängende ("sticky") 5'- oder 3'- Enden oder stumpfe ("blunt") Enden. Es wurden 2 Units Restriktionsenzym für 1 Schnitt pro 1 µg DNA eingesetzt. Die Restriktionsverdau wurden in einem Volumen von 20 bis 30 µl angesetzt, mit der entsprechenden Menge an 10x Reaktionspuffer. Der Restriktionsverdau wurde unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen (Puffer- und Temperaturwahl) durchgeführt. Mußte ein Restriktionsverdau mit zwei Enzymen durchgeführt werden, für die kein geeigneter gemeinsamer Reaktionspuffer existierte, wurde die pDNA in zwei Arbeitsschritten verdaut. Der erste Reaktionspuffer wurde durch Aufreinigung der pDNA mit dem QIAGEN PCR "Purification" Kit entfernt.

Nach Durchführung des Restriktionsverdaus wurden die DNA-Fragmente nach Zugabe von 0.1 Volumen 10x Probenpuffer auf einem 1% Agarose-Gel (0.5 µg/1 ml Ethidiumbromid) elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (366 nm) aus dem Gel geschnitten und mit dem QIAGEN Gel Extraktions Kit gemäß dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

**Dephosphorylierung von pDNA mit Alkalischer Phosphatase:** 0,5 Units Alkalische Phosphatase (AP) wurden pro µg DNA dem Restriktionsansatz zugefügt, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Inkubation erfolgte für 1 Std. bei 37°C. Die anschließende Inaktivierung der "calf intestinal phosphatase" (CIP) wurde 15 Min. bei 68°C durchgeführt.

**Klenow-DNA-Auffüllreaktion:** Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Nach dem Restriktionsverdau wurden dem Ansatz dNTPs (Endkonzentration 25 µM) und pro 1 µg pDNA 1,5 Units Klenowenzym hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 15 Min. bei 30°C. Abschließend wurde diese Reaktion 10 Min. bei 75°C gestoppt.

**Oligodesoxyribonukleotid-Hybridisierung:** Die lyophilisierten Oligonukleotide (Microsynth, Balgach, Schweiz) wurden zunächst mit dH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt und 30 Min. bei 65°C im Schüttler resuspendiert. Anschließend wurden je 1 µl "sense und anti-sense" Oligonukleotide in 20 µl 1x "Annealingpuffer" 3 Min. in 90°C heißem Wasser inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzubrechen. Während das Wasser danach langsam auf RT abgekühlt wurde, hybridisierten die beiden Oligonukleotidstränge.

**Ligation (Qiagen):** Gel-extrahierte dephosphorylierte Vektor-DNA und Insert-DNA, wurden in T4-Ligasepuffer aufgenommen. Die DNA wurde in den Verhältnissen von 1:3 (Vektor + Insert) bis 1:6 die DNA gemischt. Anschließend wurde 1 µl T4-DNA-Ligase dazugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C. Die DNA für die Transformation von kompetenten Zellen wurde direkt dem Ligationsansatz entnommen.

**"Rapid" Ligation (Roche):** Es erfolgte eine identische Aufbereitung der DNA. Die Ligationszeit beträgt fünf Min. bei RT (15 bis 25 C°).

### 3.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

3 ml LB Medium wurden mit einer Bakterienkultur angeimpft und bis zum Erreichen der stationären Phase bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in 300 ml LB Medium überführt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 wachsen gelassen. Diese Kultur wurde 10 Min. bei 2500 rpm (4°C) zentrifugiert und in 15 ml LB-Medium resuspendiert. Danach wurden 15 ml gekühltes

2x PDM (PEG, DMSO, MgCl<sub>2</sub>) dazugegeben und die Aliquots von 410 µl sofort bei -80°C gelagert.

### 3.2.4.1 Transformation von kompetenten Zellen

Aliquots von 50 µl kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und ca. 0,1 µg pDNA hinzugefügt. Die Zellen wurden für 30 Min. auf Eis und anschließend für 90 Sek. bei 42°C inkubiert. 1 ml LB Medium, ohne Antibiotikum, wurden dem Reaktionsansatz hinzugefügt, welcher für 1 Std. bei 37°C schüttelte. Die Zellen wurden auf selektiven Agarplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden 500 µl einer ÜN Bakterienkultur in einem "Cryo Tube" (Nunc, Brand Products) mit 300 µl Glycerol (100%) versetzt, gut gevortext und bei -80°C aufbewahrt.

### 3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

Direktlysate und Koimmunpräzipitate wurden auf Proteingelen aufgetrennt und analysiert. Dazu wurden 10 %ige SDS-Gele verwendet.

#### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:**

Es wurden 10%ige SDS-Sammelgele mit darübergeschichtetem Trenngel verwendet.

**Immunblot:** Der Proteintransfer erfolgte im Tank-Blot-Verfahren (2 Std., 200 mA oder ÜN 40 mA) in Transferpuffer auf Hybond-ECL-Nitrocellulosemembran. Die Membran wurde danach 1 Std. bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran (1:1000 bis 1:10000 in Blockierungspuffer) 2 Std. bei RT oder ÜN bei 4°C mit dem Primäantikörper inkubiert, danach 3x 15 Min. mit Blockierpuffer gewaschen und 2 Std. mit dem Sekundärantikörper (HRP-markiert) inkubiert. Erneut wurde 3x 15 Min. gewaschen und danach die Membran 1 Min. bei RT mit einer 1:1 Mischung aus den ECL-Reagenzien I und II inkubiert. Für die Detektion wurde die Membran auf Hybond-ECL-Film exponiert.

### 3.2.6 TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay

Mittels des kommerziell erhältlichen TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay Kits (Promega) wurde die Tcf-abhängige Promotoraktivität mit Hilfe des "*firefly*"-Luziferasegens gemessen.

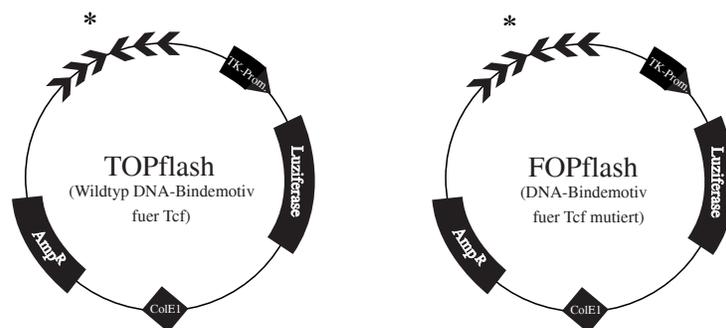
**Zellpräparation und Transfektion:** HEK293-Zellen oder HCT116-Zellen wurden in 6 Loch-Platten ausgesät. Nach Erreichen einer 70%igen Konfluenz, wurden die Zellen wie folgt transfiziert:

pRL-TK:	80	ng/Loch
TOPflash oder FOPflash:	0,5	µg/Loch
beta-Catenin:	1	µg/Loch
Bcr-Konstrukte:	1 - 7	µg/Loch.

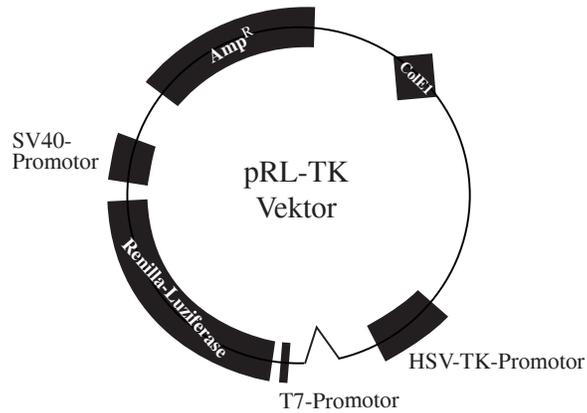
Jeder Meßwert wurde als Dreifach-Wert pipettiert.

**Passive Lyse:** 500 µl Lysepuffer/Loch wird pipettiert. Die 6 Loch-Platten wurden bei RT für 20 Min. auf eine Wippvorrichtung gestellt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Zellschaber gelöst und die Lysate in Eppendorfgefäße pipettiert.

**Luziferasemessung (Abb. 3.3):** Ein 500 µl Eppendorfgefäß wird vor jeder Messung im Lumino-  
meter plaziert, 100 µl Luziferase Assay Reagenz (Promega) hineinpipettiert, anschließend 20 µl  
Lysat hinzugegeben und die erste Messung ("*firefly*"-Luziferasegen, **Abb. 3.1**) gestartet. Nach 10  
Sek. wurde der Meßwert abgelesen und 100 µl Stop & Glo Reagenz hinzupipettiert. Sofort erfolgt  
die zweite Messung ("*renilla*"-Luziferasegen, **Abb. 3.2**). Dieser Meßwert wurde ebenfalls nach  
10 Sek. abgelesen.



**Abb. 3.1: TOPflash/FOPflash: die Reporterplasmide des Luziferaseassays.** TOPflash weist 6x (3x "reverse") das Wildtyp DNA-Bindemotiv für die Transkriptionsfaktoren Tcf/Lef1 auf. FOPflash weist 6x (3x "reverse") mutierte DNA-Bindemotive für Tcf/Lef1 auf (\*). Das Reporterogen ist "upstream" fusioniert mit dem Thymidinkinase Promotor. Das Reporterogen beider Plasmide kodiert für die ("*firefly*"-Luziferase. Amp<sup>R</sup>: vermittelt Ampicillin Resistenz, Col E1: Replikationsursprung



**Abb. 3.2: Die *Renilla*-Luziferase im TOPflash/FOPflash-Luziferaseassay.** Der pRL-TK-Vektor (RL: "*renilla*"-Luziferase; TK: Thymidinkinase-Promotor) wurde als interne Transfektionskontrolle für die TOPflash/FOPflash-Luziferaseassays genutzt. Amp<sup>R</sup>: vermittelt Ampicillin Resistenz, Col E1: Replikationsursprung, HSV: Herpes Simplex Virus, SV: Simian Virus, T7: T7 Bakteriophage

A.

B.

C.

D.

**Abb. 3.3: Ablauf des Dual-Luziferaseassay.** Darstellung der essentiellen Schritte des Luziferaseassays: (A.) Transfektion, (B.) Lyse der Zellen, (C.) Messung der "*firefly*"-Luziferaseaktivität, (D.) Messung der "*renilla*"-Luziferase-aktivität. Die verwendeten Lösungen wie Lysepuffer, Stoppreagenz wurden dem BrdU-Proliferationstest von Roche entnommen.

---

### 3.2.7 Konfokale Laserscanmikroskopie

Die Präparate für die Immunfluoreszenz wurden an einem konfokalem Laserscanmikroskop ausgewertet (LEICA-SP2, Elektronenmikroskopisches Zentrallabor der Universität Zürich, Prof. Dr. Th. Bächli). Es wurden FITC (fluorescein isothiocyanat)- und TRITC (tetramethyl rhodamine isothiocyanate)-konjugierte sekundäre Antikörper verwendet. Zur besseren Darstellung zellulärer Strukturen wurde die Phasenkontrastdarstellung DIC (differentiell interference contrast) genutzt.

#### 3.2.7.1 Immunfluoreszenz zwecks Lokalisation von Proteinen

HEK293- oder HEK293T-Zellen wurden in 24 Loch-Platten auf Poly-D-Lysin beschichteten 12 mm Deckgläschen (Becton Dickinson) ausgesät. Mit dem Erreichen einer 60 bis 80%igen Konfluenz der Zellen, wurde nach Protokoll transfiziert. Nachfolgend wurde wie im Protokoll 3.2 beschrieben die Zellen für die Immunfluoreszenz aufbereitet.

Vor Beginn der Immunfluoreszenz wurden die notwendigen Antikörper verdünnt:

polyklonale Antikörper: 1 µl Antikörper zu 100 µl PBS (+ 5% FCS)  
monoklonale Antikörper: 1 µl Antikörper zu 1000 µl PBS (+ 5% FCS).

---

#### Protokoll 3.1: Präparataufbereitung für die Immunfluoreszenz

---

- 1 2x mit PBS waschen
  - 2 15 Min. Fixierung der Zellen mit 3% Paraformaldehyd
  - 3 2x mit PBS waschen
  - 4 2 1/2 Min. Permeabilisierung mit 0,5% Triton X-100 / PBS
  - 5 2x mit PBS waschen
  - 6 1 Std. Inkubation im Brutschank (siehe 3.1.9) mit dem 1. Antikörper
  - 7 2x mit PBS waschen
  - 8 1 Std. Inkubation im Brutschank (siehe 3.1.9) bei 37°C mit dem 2. Antikörper
  - 9 2x mit PBS waschen
  - 10 Präparate mit Mowiol auf Glasplatten "eindeckeln"
- 

#### 3.2.7.2 BrdU-Proliferationstest

---

Der Nachweis von DNA-Synthese bzw. Proliferation spielt in der Zellbiologie eine wichtige Rolle und kann genutzt werden um den Einfluß von Proteinen auf die Proliferation einzuschätzen. Bei 5-Brom-2'-desoxy-Uridin (BrdU) handelt es sich um modifiziertes Uridin, das während der DNA-Synthese inkorporiert wird und anschließend während der Immunfluoreszenz mittels eines monoklonalen Antikörpers nachgewiesen werden kann.

---

### Protokoll 3.2: **BrdU-Proliferationstest**

---

- 1 Die Zellen werden auf Deckgläsern kultiviert bis eine Zellkonfluenz von 50% erreicht ist.
- 2 Das Zellkulturmedium wird abgesaugt und BrdU-Markierungsmedium hinzugegeben. Das BrdU-Markierungsmedium verbleibt 60 Min. auf den Zellen.
- 3 Das Markierungsmediums wird abgesaugt und 3x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit einem Ethanol-Fixans mindestens 30 Min. bei -20°C fixiert.
- 4 Das Ethanol-Fixans wird abgesaugt und die Zellen 3x mit Waschpuffer gewaschen.
- 5 Die Zellen werden mit einer ausreichenden Menge an BrdU-Arbeitslösung überschichtet und 30 Min. bei 37°C inkubiert.
- 6 Die BrdU-Arbeitslösung wird abgesaugt und die Zellen 3x mit Waschpuffer gewaschen.
- 7 Anschließend werden die Zellen mit ausreichend anti-Maus-IgG-Fluorescein Arbeitslösung überschichtet und 30 Min. bei 37°C inkubiert.
- 8 Die Zellen werden 3x mit Waschpuffer gewaschen.
- 9 Die Zellen werden mit Mowiol eingedeckelt.

---

In Anlehnung an die Protokollvorschrift zum BrdU-Proliferationstest von Roche

### 3.2.8 Hefe Zwei-Hybrid Versuche

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zwei-Hybrid Methode in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) genutzt, um Protein-Proteininteraktionen zu identifizieren. Das Ziel der beiden in dieser Arbeit genutzten Protokolle beruht auf der Identifikation eines Hybridproteins (fusioniert mit einer die Gal4-abhängige Transkription aktivierenden Domäne), das einen Komplex bildet mit einem weiteren Hybridprotein (fusioniert mit einer DNA-bindenden Region) welches als Köderprotein eingesetzt wird (**Abb. 3.3**, 1A und 1B). Die durch die Proteininteraktion herbeigeführte Rekrutierung der aktivierenden Domäne an die stromaufwärts liegende Aktivierungssequenz UAS (upstream activating sequence), in den dann transkriptionell aktiven Komplex, führt zur Expression von Gal4-regulierten Indikatorgenen wie *lacZ*, *HIS3*. Mit den Köderproteinkonstrukten wurden verschiedene cDNA-Expressionsbibliotheken (B-, T-Zell-cDNA-Bibliothek) getestet. Für die Hefeversuche wurden verschiedene Hefestämme verwendet (**Tabelle 3.1**). Die Hefestämme unterscheiden sich in "mating type"  $\alpha$  und  $a$ . Hefestämme vom "mating type"  $a$  und  $\alpha$  können miteinander fusionieren. Weiterhin weisen die Hefestämme chromosomale Deletionen auf wie *leu2-3*, die die Expression des entsprechenden Proteins in der Zelle durch Transformation eines Plasmids kodierend für dieses Protein notwendig machen. Chromosomal integriert weisen diese Hefestämme Indikatorgene auf (*lacZ*, *his*, *ade*) die induziert werden können.

---

**Tabelle 3.1: Verwendete Hefestämme**

---

Y153:	<i>Mat<math>\alpha</math></i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>ura3-52</i> , <i>trp1-901</i> , <i>his3-D200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>gal4D</i> , <i>gal80D</i> , <i>URA::GAL-lacZ</i> , <i>LYS2::GAL-HIS3</i>
PJ69-2A:	<i>Mat<math>\alpha</math></i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>LYS::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3</i> , <i>GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2</i>
Y187:	<i>Mat<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , 112, <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>met<sup>-</sup></i> , <i>URA::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>

---

Hefe Protokoll Handbuch von Clontech

Für die Hefe Zwei-Hybrid Methode in **Abbildung 3.3** (1A), Protokoll 3.4 wurde der Hefestamm Y153 (yeast 153) von Stephen J. Elledge verwendet (*Durfee et al., 1993*). Dieser Stamm bietet ein doppeltes Selektionssystem, da er zwei chromosomale Indikatorgene (*lacZ*, *his*; **Tabelle 3.2**) besitzt, die durch Gal4 reguliert werden. Das *E. coli lacZ*-Gen, das in der Lage ist X-Gal

(5-Brom-4-Chlor-3-indolyl beta-D-Galaktopyranosid) umzusetzen (resultierend ist eine Blaufärbung), steht unter der Kontrolle des Gal1 Promotors. Die Anwendung dieses Indikatorgens ist schon bei Fields und Song (1989) beschrieben worden. Das zweite Indikatorgen, *his*, wurde genutzt, da sehr niedrige Konzentrationen des entsprechenden Enzyms (Imidazol Glycerol Phosphat Dehydratase) für eine Histidin-Phototrophie benötigt werden. Der geringe Bedarf an His3-200-Proteinen macht die Vorselektion sehr sensitiv und auch Proteine, die nur schwach interagieren, können identifiziert werden. Um auf stringente Proteininteraktionen zu selektieren kann dem Hefemedium 3-Aminotriazol (3-AT) (3 M) hinzugefügt werden. 3-AT ist ein kompetitiver Inhibitor der *his*-Genprodukte.

Das GBT-Plasmid kodiert für eine Phenylalanyl-tRNA Synthetase die mit einer freizügigen Substratspezifität auch modifiziertes Phenylalanin (DL-4-Chlorphenylalanin) für die Proteinbiosynthese nutzen kann. Somit ist eine weitere Selektion für pGBT-transformierte Hefezellen möglich.

Im Y153 Hefestamm sind die kodierenden Sequenzen für Gal4 und seinen Negativregulator Gal80 entfernt.

---

**Tabelle 3.2: Auxotrophe Hefemutanten**

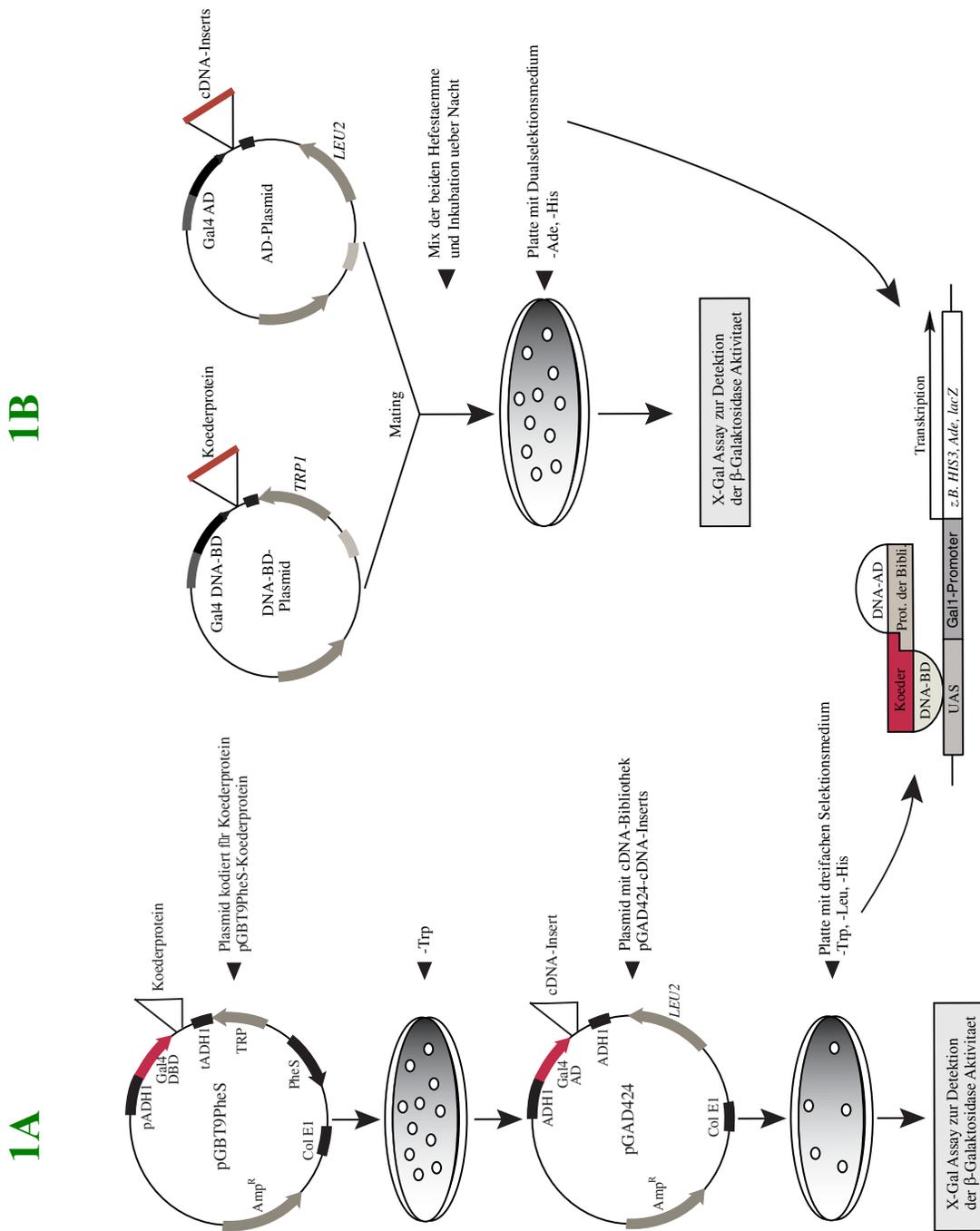
---

trp1-901	benötigt zum Wachstum Tryptophan im Medium
leu2-3, 112	benötigt zum Wachstum Leuzin im Medium
his3-200	benötigt zum Wachstum Histidin im Medium
ura 3-52	benötigt zum Wachstum Uracil im Medium
ade2-101	benötigt zum Wachstum Adenin im Medium
gal4-542	Defizient in der Gen-Regulation für den Galaktose Metabolismus
gal80-538	Defizient in der Gen-Regulation für den Galaktose Metabolismus; GAL-Gene werden konstitutiv exprimiert

---

Hefe Protokoll Handbuch von Clontech

Für die Hefe Zwei-Hybrid Methode in **Abbildung 3.3** (1B), in Protokoll 3.4 wurden die Hefestämme PJ69-2A mit einer vortransformierten Gehirnzellen-cDNA-Bibliothek und der Hefestamm Y187 genutzt. Der Hefestamm Y187 wurde mit dem DNA-BD-Plasmid, welches für das Köderprotein kodiert transformiert. Eine Beschreibung der Hefestämme ist in **Tabelle 3.1** zu sehen.



**Abb. 3.4: Hefe Zwei-Hybrid System.** Darstellung des Ablaufs der beiden in dieser Arbeit angewandten Protokolle zur Durchführung von Hefe Zwei-Hybrid Versuchen. Der genaue Ablauf ist im Protokoll 3.4 erklärt. Abkürzungen: pADH: ADH-Promotor, Leu2: notwendig für Hefestämmen mit Mutationen leu2-3, 112, TRP: notwendig für Hefestämmen mit trp1-901-Mutation, UAS: upstream activating domain, AD vector: Plasmid kodierend für die aktivierende Domäne fusioniert mit einem Insert der cDNA-Bibliothek, Prot. der Bibli.: kodiert für ein Protein der cDNA-Bibliothek, DNA-BD: Plasmid kodierend für DNA-bindende Domäne fusioniert mit dem Köderprotein, pGBT9: Plasmid kodierend für BD, pGAD424: Plasmid kodierend für AD, PheS: Phenylalanyl-tRNA Synthetase. Die in 1B beschriebenen Plasmide kodieren wie die verwendeten Plasmide in 1A für Amp<sup>R</sup> and Col EI.

Die beiden verschiedenen Protokolle der durchgeführten Heferversuche (**Abb. 3.4**, I. und II.) sind folgend näher erklärt (**Protokoll 3.4**).

---

**Protokoll 3.3: Allgemeine Arbeitsschritte während eines Heferversuches**

---

- 1A Transformation von pDNAbp-BD in Y153, anschließend  
Transformation von pDNA-Bibliothek-AD in Y153bp-BD
- 1B Transformation pDNAbp-BD in in PJ69-2A, anschließend  
Mating: PJ69-2A Mata pDNAbp-BD + Y187 Mat $\alpha$  pDNA-Bibliothek-AD
- 2 ausplattieren auf Selektionsmedium
- 3 mehrmaliger beta-Gal Liftassay eines wiederholt ausgestrichenen Hefeklons
- 4 Transformation der präparierten pDNA von LacZ(+)Klonen in kompetenten Zellen
- 5 Retransformation von pDNA-BD und pDNA-Bibliothek in Y153 zu Demonstration der spezifischen Interaktion
- 6 Sequenzierung der LacZ(+)-Klone

---

In Anlehnung an die Protokollvorschrift "Pretransformed MATCHMAKER Libraries" von Clontech; Abkürzungen: AD: aktivierende Domäne, BD: bindende Domäne, bp: "bait" protein

### 3.2.8.1 Transformation von Hefen

Die Hefen wurden mittels der LiAc-Methode kompetent für die Aufnahme der pDNA gemacht (Protokoll 3.5: 1A, 1B). ÜN inkubierte Hefe-Kulturen wurden in 50 ml Hefemedium verdünnt und bis zur OD<sub>600</sub> zwischen 0,8 und 1,0 bei 30°C geschüttelt. Die Suspension wurde auf zwei 50 ml Falcon Röhren verteilt und für 5 Min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden in 10 ml dH<sub>2</sub>O (4°C) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm für 5 Min. wurden die Pellets in je 1 ml dH<sub>2</sub>O (4°C) resuspendiert und in frische Eppendorfgläser transferiert. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert und mit 1 ml LiAc gewaschen (verwendete Stammlösungen, siehe Protokoll 3.5). Dem letzten Zentrifugationsschritt schloss sich die Resuspension der Pellets in 200 µl LiAc an. Die Hefesuspension wurde dem vorgelegten Transformationsmix hinzugefügt.

---

Transformationsmix (Reihenfolge unbedingt einhalten):

pDNA	1 µg
ss-carrierDNA	50 µg
Hefesuspension	50 µl
PEG-Lösung	300 µl

Die Eppendorfgefäße wurden gevortext und bei 30°C für 50 Min. im Thermoblock inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 15 Min.) wurden die Zellen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden nochmals abzentrifugiert und zurückgebliebene Flüssigkeit entfernt. Die Pellets wurden in 500 µl TE aufgenommen und auf vorgewärmten selektiven Agarplatten ausgestrichen.

---

### Protokoll 3.4: LiAc-Transformation

---

Zu Beginn jeder Transformation wurden die Stammlösungen mit autoklaviertem dH<sub>2</sub>O angesetzt.

TE 1x:	0,5 ml 10x TE wurden mit dH <sub>2</sub> O auf 5 ml verdünnt
LiAc 1x:	1 ml 10x TE und 1 ml 10x LiAc wurden mit dH <sub>2</sub> O zu 10 ml aufgefüllt und auf 4°C abgekühlt
PEG:	zu 1 ml 10x TE und 1 ml 10x LiAc wurden 8 ml 50%iges PEG hinzugefügt

---

Für Tests mit einer cDNA-Bank werden die Transformationsansätze auf einer 16x 23 cm-Platte ausgestrichen. Diese Platten werden dann 2 bis 3 Tagen bei 30°C inkubiert und anschließend wird ein Liftassay zum Test auf beta-Galaktosidaseaktivität ausgeführt.

### 3.2.8.2 Der beta-Galaktosidasetest

Für den **beta-Galaktosidasetest** werden Nitrozellulosemembranen (Amersham Biosciences) in der Größe der Platten zurechtgeschnitten. Die Membranen werden glatt auf die Hefepplatten gelegt, asymmetrisch markiert und abgezogen. Anschließend werden sie 2x in flüssigen Stickstoff eingefroren und an der Luft wieder aufgetaut. Die Membranen werden mit den Hefekolonien nach oben luftblasenfrei auf mit X-Gal-Puffer getränktes 3 MM Papier gelegt und für mehrere Stunden bis über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend werden die Membranen getrocknet und eventuell blaue Kolonien identifiziert. Die notwendigen Puffer sind im Kapitel 3.1.8 beschrieben.

Im Liftassay blau gewordene Kolonien werden von der Hefepatte gepickt, auf 10 cm-Platten ausgestrichen und ein erneuter beta-Galaktosidasetest durchgeführt.

### 3.2.8.3 Isolation von pDNA aus den Hefen

Mit dem Ziel der Identifikation eines Proteininteraktionspartners des verwendeten Köderproteins, wurde die pDNA aus Hefeklonen isoliert. Bei wiederholter Blaufärbung eines Einzelklons wird von diesem eine 15 ml-Kultur in Ura<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>-Medium angesetzt und etwa zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die Hefezellen werden pelletiert und in einem kleinstmöglichen Volumen Wasser aufgenommen, so daß die Suspension gerade pipettierbar ist. Hiervon werden 200 µl zur Plasmid-DNA Isolation mit dem "FastDNA" Kit nach Protokoll 3.5 durchgeführt. Die Homogenisation erfolgt bei Stufe 4,5 für 15 Sek. im "FastPrep Instrument". Die eluierte pDNA wird nochmals über Gel "Extraction Kit-Säulchen" aufgereinigt und in 30 µl eluiert.

---

#### Protokoll 3.5: Isolation von pDNA aus Hefen

---

- 1 ÜN-Kultur abzenrifugieren bei 2000 g
- 2 Resuspension des Pellets in CLS-Y und 200 µl PPS
- 3 davon 1 ml pipettieren in FastPrep™ tubes
- 4 20 Sek. zentrifugieren bei 4,5 (FastPrep, FP120)
- 5 Überstand in ein Eppendorfgefäß pipettieren
- 6 600 µl "binding matrix buffer" hinzupipettieren und gut mischen  
5 Min. bei RT inkubieren  
kurz zentrifugieren
- 7 Pellet in 500 µl SEW-M-Puffer vorsichtig resuspendieren  
kurz zentrifugieren
- 8 Pellet in 100 µl DES-Puffer resuspendieren  
3 Min. inkubieren  
kurz zentrifugieren
- 9 Überstand abnehmen und verarbeiten

---

Abkürzungen: CLS-Y: cell lysis solubilizing for yeast, PPS: protein precipitating, SEW: salt/ethanol wash solution, DES: DNA elution solution

---

### 3.2.8.4 Transformation der pDNA in *E. coli* und Retransformation in Hefen

Da die Plasmidausbeute nach der Isolation aus den Hefen sehr gering ist, wird das Plasmid zunächst in *E. coli* transformiert. Die Transformation erfolgt nach Protokoll 3.7.

---

#### Protokoll 3.6: Präparation der pDNA nach Isolierung aus Hefen zur Transformation in *E.coli*

---

- 1 100 µl Hefe-pDNA-Suspension + 500 µl Waschpuffer (PB)
- 2 gesamte Suspension auf die Säulen geben  
2x die Säulen 1 Min. zentrifugieren bei 13000 g
- 3 750 µl Waschpuffer (PE) auf die Säulen geben  
2x die Säulen 1 Min. zentrifugieren bei 13000 g
- 4 Säulen werden in Eppendorfgefäße plziert und 30 µl Elutionspuffer (EB) pro Säule pipettiert, 1 Min. bei RT inkubieren und 1 Min. zentrifugieren
- 5 Eluat isolieren

---

In Anlehnung an die Protokollvorschrift "QIAprep Miniprep Handbook" von Qiagen

Für die Transformation von gereinigter pDNA werden 10 µl pDNA-Lösung / 100 µl kompetente Zellen eingesetzt. Der Transformationsansatz wird auf LB/Amp-Platten mit D,L-4-Chlorphenylalanin zur Selektion von Klonen, die nur das pGBT9PheS-Plasmid enthalten, ansonsten wurden nur LB/Amp-Platten verwendet.

Die **Retransformation** in Hefen erfolgt nach demselben Protokoll wie die schon beschriebene Transformation im Test. Es werden je 1 µg des Plasmids kodierend für das Köderprotein und das angenommene identifizierte Proteinfragment eingesetzt. Als Kontrolle wird das Plasmid kodierend für das identifizierte Proteinfragment mit dem pGBT9PheS-Leervektor transformiert. Zeigt sich eine erneute Blaufärbung und bleibt die Kontrolle weiß, ist die Interaktion bestätigt. Das Plasmid kodierend für ein anzunehmenden Interaktionspartner vom Köderprotein wurde anschließend sequenziert.

---

### **3.2.8.5 Amplifikation der B- und T-Zell-c-DNA-Bibliothek**

Titration: 1  $\mu$ l und 10  $\mu$ l der jeweiligen Bibliothek wurden auf LB-Cam-Platten ausgestrichen und bei 37°C ÜN inkubiert. Zur Errechnung der koloniebildenden Einheiten pro ml wurde die Anzahl Cam-resistenter Kolonien der 1  $\mu$ l-Platte mit 1000 multipliziert, die der 10  $\mu$ l-Platte mit 100 multipliziert.

Aufreinigung: Die restliche Bibliothek wurde auf zehn 150 mm-LB-Cam-Platten ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Auf jede Platte wurden 6 ml LB-Medium gegeben, die Bakterien mit einem Spatel sanft abgekratzt und in einem Erlenmeierkolben gesammelt. Die auf den Platten hinterbliebenen Bakterien wurden nochmals in je 2 ml LB-Medium aufgenommen und ebenfalls in den Erlenmeierkolben überführt. Mit 2/3 der Suspension wurde eine DNA-Maxipräparation durchgeführt, die restlichen Bakterien wurden mit 0,2 Volumen Glycerol versetzt, durch Schwenken gemischt, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.