

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien stammen von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt).

2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, nach dem Handbuch *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) hergestellt.

2.1.3 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme (Restriktionsenzyme, Ligasen, Polymerasen etc.) wurden von den Firmen New England Biolabs (Frankfurt a.M.) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

2.1.4 Vektoren

Hefe-Plasmide: pBTM116 , pVP16 (beide von Dr. U Schaeper, Berlin), pBTM117c (von AG Wanker, Berlin), pBridge mit konstitutiv aktiver Src-Kinase (Dr. M Rosario, Berlin)

Eukaryotische Expressionsvektoren:

pcDNA3-Flag (Flag liegt N-terminal), pcDNA3-HA (HA liegt N-terminal; beide von Dr. U Schaeper, Berlin)

Ror2-Flag in pcDNA (von Prof. Minami, Japan, Flag ist C-terminal an die Ror2-Sequenz fusioniert)

Ror2-CP Δ 745-Flag (Dr. S. Stricker, Berlin, Flag ist C-terminal an die Ror2-Sequenz fusioniert)

Ror2-HA und Ror2-CP Δ 745-HA in pcDNA3 (Dr. S. Stricker, Berlin, HA ist C-terminal an die Ror2-Sequenz fusioniert)

Sonstige Plasmide: pCRII TOPO (Klonierung von PCR-Fragmenten)

2.2. Methoden

Nicht gesondert aufgeführte Methoden, wie z.B. die nicht-denaturierende und denaturierende Gelelektrophorese, wurden nach Protokollen aus dem Handbuch *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

2.2.1 Allgemein molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Plasmid-Isolierung

Plasmid-Isolierung wurde im Mini-Format mit einem Kit von A&A Biotechnology, und im Midi-, bzw. Maxi-Format mit einem Kit von Macherey & Nagel durchgeführt. Dabei erfolgte die Durchführung nach Herstellerangaben.

2.2.1.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit dem "*Gel Out*" Kit (A&A Biotechnology) geleluert oder nach einer PCR mit dem "*PCR Purification*" Kit von Invisorb nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.1.3 Isolierung von Total RNA

Zur Isolierung von Total RNA aus Maus-Embryonen wurde das Gewebe in *peqGOLD TriFast* (peq-Lab) mit dem Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik) homogenisiert. Nach einer Chloroform-Extraktion wurde die RNA durch Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt, danach mit 70% Ethanol gewaschen und in 50-100 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.2.1.4 Reverse Transkription

Das Umschreiben von RNA in cDNA wurde mit Hilfe des "*Superscript II*" Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden standardmäßig 2 µg Total RNA in die Reaktion eingesetzt.

2.2.1.5 Sequenzierung

Sequenzierung von DNA erfolgte mit Hilfe des "*Big Dye Terminator Sequencing*" Kits von Perkin Elmer.

2.2.2 Klonierung von Expressionskonstrukten

Alle im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Expressionskonstrukte enthalten Sequenzen aus der Maus. Nach der Klonierung wurden alle Konstrukte durch Sequenzierung überprüft.

2.2.2.1 Köderproteine für “*Yeast Two Hybrid*”- und “*Yeast Three Hybrid*”-Analysen

Mit Hilfe von Köderproteinen wird in den “*Yeast Two Hybrid*”- und “*Yeast Three Hybrid*”-Analysen eine cDNA-Bibliothek nach Interaktionspartnern durchsucht. Das Prinzip dieser Experimente wird im Ergebnisteil (3.1 und Abb. 7) ausführlich beschrieben.

LexA-Ror2-CP: Dieses Konstrukt besteht aus der Fusion der LexA DNA-bindenden Domäne und dem intrazellulären Teil von Ror2 (nt 1288-2835) im Vektor pBTM116. Die Expression dieses Köderproteins steht unter der Kontrolle des ADH1 Promotors.

LexA-Ror2-CP Δ 745: Wie LexA-Ror2-CP, enthält jedoch die Ror2 Sequenz nur bis nt 2241. Dies entspricht einer distalen Trunkierung des Proteins, die im Menschen zur Brachydaktylie Typ B führt.

LexA-Tpr-Ror2-CP: Dieses Konstrukt entspricht im wesentlichen dem eben beschriebenen Konstrukt, jedoch wurde zusätzlich eine Tpr-Dimerisierungsdomäne zwischen die LexA Domäne und den intrazellulären Teil von Ror2 kloniert.

LexA-Tpr-Ror2-CP Δ 745: Wie LexA-Tpr-Ror2-CP, enthält jedoch die Ror2 Sequenz nur bis nt 2241.

Gal4-Ror2-CP: Für dieses Konstrukt wurde der intrazelluläre Teil von Ror2 (nt 1288-2835) in den Vektor pBridge inkloniert, in den zuvor eine konstitutiv aktive Src-Kinase in einer zweiten Multiple Cloning Site (MCS II) eingebracht worden war (freundliche Gabe von Dr. M. Rosario, Berlin). Die Fusion aus Gal4 DNA-bindender Domäne und Ror2 steht unter der Kontrolle des ADH1-Promotors, die Src-Kinase unter der Kontrolle des Met25-Promotors, der durch Methionin reprimierbar ist. Dieses Konstrukt wurde im “*Yeast Three Hybrid*”-Experiment eingesetzt.

Konstrukte für den automatisierten Y2H (MDC, Berlin)

Für den automatisierten “*Yeast Two Hybrid*”-Screen wurden alle Wtip-Konstrukte in den Hefe Expressionsvektor pBTM117c (von AG Wanker, Berlin) kloniert, so daß LexA-Wtip Köderproteine entstanden. Die Expression der Köderkonstrukte steht in diesem Vektor unter der Kontrolle des ADH1 Promotors. Die Köderkonstrukte sind schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

Wtip “volle Länge”: Fusion aus der LexA Domäne und der gesamten codierenden Sequenz von Wtip

Wtip Δ N-Terminus. Fusion aus LexA und der Sequenz von Wtip ab nt 552; enthält alle 3 LIM Domänen, aber nicht den N-Terminus von Wtip.

Wtip Δ LIM Domäne 2,3: Fusion aus LexA und der codierenden Sequenz von Wtip bis nt 768. Enthält den N-Terminus und LIM Domäne 1.

Wtip Δ LIM Domäne 1,3: Fusion aus LexA und der codierenden Sequenz von Wtip bis nt 573 und von nt 769 bis 984. Enthält den N-Terminus und LIM Domäne 2.

Wtip Δ LIM Domäne 3: Fusion aus LexA und der codierenden Sequenz von Wtip bis nt 948. Enthält den N-Terminus und die LIM Domänen 1 und 2.

Wtip Δ LIM Domäne 1: Fusion aus LexA und der codierenden Sequenz von Wtip bis nt 573 und von nt 769 bis zum Stop. Enthält den N-Terminus und die LIM Domänen 2 und 3, aber nicht LIM Domäne 1.

Wtip Δ LIM Domäne 2: Fusion aus LexA und der codierenden Sequenz von Wtip bis nt 789 und von nt 949 bis zum Stop. Enthält den N-Terminus und die LIM Domänen 1 und 3, aber nicht LIM Domäne 2.

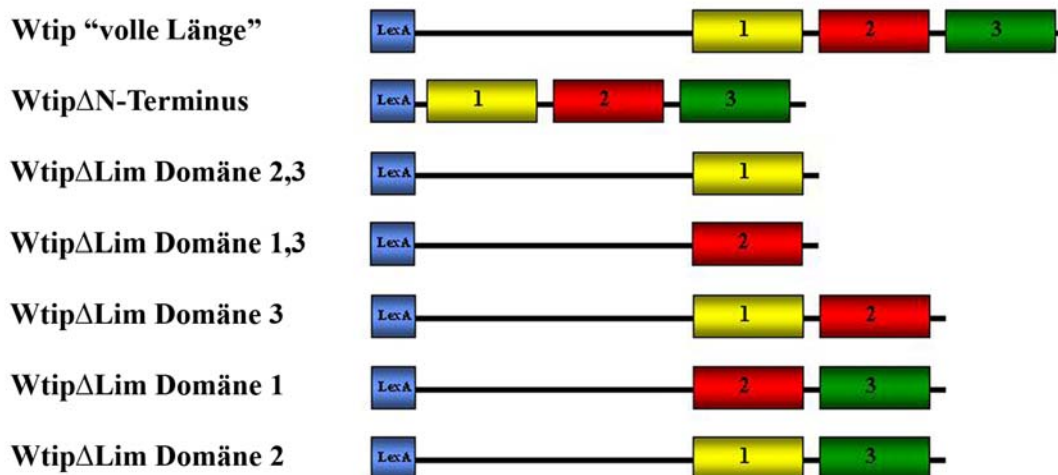


Abbildung 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Wtip-Köderproteine für den automatisierten "Yeast Two Hybrid"-Screen

2.2.2.2 Expressionskonstrukte für Säugerzellen

Ror2 ohne Tag: Aus Ror2 in pCRII-TOPO (freundliche Gabe von Dr. S. Stricker, Berlin) und Ror2-Flag in pcDNA3 (freundliche Gabe von Prof. Y. Minami, Japan) wurde ein Expressionskonstrukt erzeugt, in dem die codierende Sequenz von Ror2 ohne Tag im pcDNA3 Vektor vorliegt. Die Expression steht unter der Kontrolle des CMV Promotors.

Ror2-CPA745 ohne Tag: Siehe Ror2 ohne Tag, enthält die Ror2 Sequenz bis nt 2241.

Wtip(Y2H)-Flag: Das im "Yeast Two Hybrid"-Experiment isolierte Wtip-Fragment wurde mit NotI aus dem Beuteplasmid (VP16) herausgeschnitten und über NotI im richtigen Leseraster in einen modifizierten pcDNA3-Vektor inkloniert, der 5' der MCS ein Flag-Tag besitzt (freundliche Gabe von Dr. U. Schaeper, Berlin). Die Expression steht unter der Kontrolle eines CMV Promotors.

"Volle Länge" Wtip-Flag: Da die ersten 500 Basen der codierenden Sequenz von Wtip sehr GC-reich sind, ließ sich das gesamte Fragment nicht in einem Stück aus cDNA (Maus E 13,5) amplifizieren. Daher wurden Oligonucleotide über eine Restriktionsschnittstelle (StuI), die nur einmal im codierenden Bereich vorkommt, gelegt, um eine getrennte Amplifikation eines 5' und 3' Fragmentes zu ermöglichen. Der 5' Bereich wurde mit Einsatz von PCRx Enhancer-Lösung (Invitrogen) amplifiziert. Durch anschließende Ligation der beiden amplifizierten Fragmente in den gewählten Expressionsvektor (siehe Wtip(Y2H)-Flag) konnte das "volle Länge" Wtip über NotI und XbaI kloniert werden. Das Flag-Tag liegt dabei N-terminal der Wtip-Sequenz.

Oligonucleotide (5'Fragment):

tata**GCGGCCGCTCGGAATGCAGCGCTCGCGGAC/**
 CCCACGTTATAGA**AAGGCCTTCCCACGGAGCCG**

Oligonucleotide (3'Fragment):

GCTCCGTGGGA**AAGGCCTTCTATAACGTG/**
 tagc**TCTAGACACTCCTCTCTCTGTGACCGCTGCTTC**

Beide Fragmente wurden nach Angaben des PCRx Enhancer Systems von Invitrogen amplifiziert, wobei der 5' Reaktion 2x PCRx Lösung zugegeben wurde.

Temperaturprofil:	Initial:	95° C	3 min	
	Cyclus 1:	95° C	45 s	
		56° C	30 s	Cyclus1: 5x
		72° C	2 min	
	Cyclus 2:	95° C	30 s	
		54° C	30 s	Cyclus2: 30x
		72° C	2 min	
	Final:	72° C	7 min	
		4° C		

"Volle Länge" Wtip-HA: Das NotI/XbaI "volle Länge" Wtip-Fragment wurde dem Leseraster folgend in einen modifizierten pcDNA3 Vektor einkloniert, der 5' der NotI-Schnittstelle ein HA-Tag trägt (freundliche Gabe von Dr. U. Schaeper).

2.2.3 Hefearbeit

Im Rahmen dieser Studie wurde mit den Hefestämmen L40 (Invitrogen) und AH109 (Clontech) gearbeitet. Alle Hefemedien wurden vor der Verwendung frisch mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt, um bakterielle Kontamination zu vermeiden. Platten wurden aus dem jeweiligen Medium plus 20g/l Agar hergestellt.

2.2.3.1 Hefen kompetent machen

Um Hefezellen transformieren zu können, müssen die Zellen vorher kompetent gemacht werden. Dazu werden 300 ml vorgewärmtes Medium (YPD/YPAD) mit 20 ml einer Übernachtskultur angeimpft, so daß die OD₆₀₀ etwa 0,25 beträgt. Diese Kultur wird ca. 3-5h bei 30° C geschüttelt, bis die OD₆₀₀ etwa 0,5-0,7 erreicht hat. Durch anschließende Zentrifugation bei 1000g werden die Hefen für 5 min bei RT pelletiert. Der Überstand wird verworfen, die Hefen in einem Waschschrift in etwa 40 ml H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Hefen in 1,5 ml 1xLiAc durch vortexen resuspendiert. Die Zellen können bis zur Verwendung etwa 1 Woche bei 4° C gelagert werden.

2.2.3.2 Hefetransformation

50 µl der kompetenten Hefen wurden mit 0,2 µg Plasmid, 50 µg Lachssperma-DNA und 300 µl 40% PEG/1xLiAc gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 35 µl DMSO zugegeben und die Zellen für 15 min bei 42° C leicht schüttelnd inkubiert (Hitzeschock). Nach kurzer Abkühlung der Hefen auf Eis wurden die Zellen pelletiert, in 100 µl H₂O resuspendiert und auf entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen. Wurde nur ein Plasmid transformiert, wurden die Hefen auf SD-T (Köderplasmid) oder SD-L-Medium (Beuteplasmid) ausgestrichen, bei gleichzeitiger Transformation beider Plasmide wurden SD-TL-Platten verwendet.

2.2.3.3 Herstellung von Protein-Lysaten aus Hefe

10 ml Selektionsmedium (SD-T, SD-TM, SD-T +1 mM M) wurden mit der zu untersuchenden transformierten Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 30° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD₆₀₀ dieser Kultur bestimmt und die Menge Kultur, die einer

OD₆₀₀ = 1 entsprach, abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2x Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 96° C denaturiert, auf Eis abgekühlt und bis zur Western Blot-Analyse bei -20° C aufbewahrt.

2.2.3.4 "*Yeast Two Hybrid*"- und "*Yeast Three Hybrid*"-Screen

"*Yeast Two Hybrid*"-Screen:

5 ml -SD-T Medium wurden mit einer Tpr-Ror2-positiven Hefekultur angeimpft und über Nacht bei 30° C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 100 ml SD-T überführt und eine weitere Nacht inkubiert. Am dritten Tag wurden 300 ml YPD mit der Über Nacht-Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,2-0,25 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 herangezogen und dann abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml 1xLiAc resuspendiert, erneut zentrifugiert und in 2 ml LiAc aufgenommen. Die Hefesuspension wurde mit 200 µg cDNA (Hollenberg cDNA-Bibliothek aus Maus-Embryonalstadium E9,5-10,5; Hollenberg et al., 1995), 3 mg denaturierter Lachsperma-DNA versetzt und für 2 min inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml 40% PEG/1xLiAc wurden die Hefen für 30 min bei RT inkubiert, dann erfolgte die Zugabe von 2 ml DMSO und der anschließende Hitzeschock (15 min, 42° C) unter leichter Bewegung. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde die Kultur in 400 ml vorgewärmtes YPD überführt und für 1 h bei 30° C im Schüttelinkubator inkubiert. Durch Zentrifugation (1000g) wurden die Zellen pelletiert, mit 40 ml H₂O gewaschen, und wieder pelletiert. Die Aufnahme des Pellets erfolgt in 5 ml H₂O. Aus dieser Lösung wurden 5 µl (entspricht 1:1000) entnommen, die wiederum in zwei 10-fach Verdünnungen auf 1:100.000 verdünnt und anschließend auf -TL-Platten ausgestrichen wurden, um die Transformationseffizienz zu bestimmen. Die restlichen Hefen wurden auf -THULL-Platten (+ 10 mM 3-AT) ausgestrichen, um Protein-Protein Interaktionen zu detektieren. Nach 3 Tagen wurde mit dem Sammeln der gewachsenen Hefekolonien begonnen. Diese wurden bis Tag 7 gepickt und danach 3x auf frische -THULL-Platten übergestrichen, um falsch-positive Interaktionen zu minimieren.

Der schematische Ablauf der "*Yeast Two Hybrid*"- und "*Yeast Three Hybrid*"-Analysen ist in Abbildung 6 dargestellt.

"*Yeast Three Hybrid*"-Screen:

Dieses Hefeexperiment läuft im wesentlichen wie der "*Yeast Two Hybrid*"-Screen ab. Jedoch wird aufgrund der Verwendung des pBridge Vektors, der eine Gal4 DNA-bindende Domäne besitzt, ein Hefestamm (AH109) verwendet, bei dem die Selektionsmarker unter der Kontrolle

eines GAL4 Promotors stehen. Da die Expression der konstitutiv aktiven Src-Kinase durch den Zusatz von Methionin reprimiert werden kann, wurden entsprechend andere Selektionsmedien verwendet.

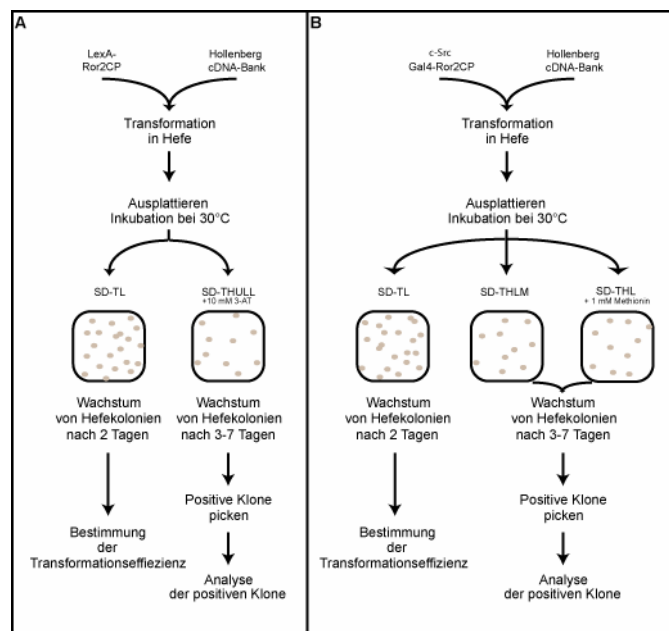


Abbildung 6: Schematischer Ablauf der "Yeast Two Hybrid"- und "Yeast Three Hybrid"-Experimente **A:** Für den "Yeast Two Hybrid"-Assay wurden Köder- und Beutekonstrukte in den Hefestamm L40 transformiert. Nach 3-7 tägiger Inkubation auf -THULL-Selektionsplatten bei 30 °C wurden gewachsene Hefekolonien gepickt und für die weitere Analyse auf frische -THULL-Platten übergestrichen. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde 1/100.000 des Gesamt-Transformationsansatzes auf -TL-Platten ausgestrichen. Nach 2 tägiger Inkubation wurden die Hefekolonien ausgezählt und daraus die Transformationseffizienz errechnet. **B:** Für den "Yeast Three Hybrid"-Screen wurden Köder- und Beuteproteine in den Hefestamm AH109 transformiert. Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte wie im "Yeast Two Hybrid"-Experiment. Der restliche Transformationsansatz wurde halbiert und auf 2 verschiedenen Selektionsplatten (-THLM und -THL+1 mM Methionin) ausgestrichen. Die Zugabe von Methionin zum Selektionsmedium reprimiert die Expression der konstitutiv aktiven Src-Kinase und verringert so die Phosphorylierung des Ror2-CP-Köderproteins. Nach 3-7 tägiger Inkubation wurden die Hefekolonien gepickt und auf frische Selektionsplatten übertragen, woraufhin die weitere Analyse erfolgte.

Die Über Nacht-Kulturen wurden in SD-TM angesetzt. Am dritten Tag wurde die Kultur für den eigentlichen Screen in 300 ml YPAD verdünnt. Die Transformationseffizienz wurde sowohl auf SD-TLM- als auch auf SD-TL+1 mM M -Platten bestimmt. Da die Zahl der gewachsenen Klone vergleichbar war, wurde der Mittelwert als Transformationseffizienz gewertet. Die Expression der Src-Kinase führte demnach nicht zu Selektionsnachteilen. Eine Hälfte des restlichen Hefeansatzes wurde zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen auf -THLM-, die andere Hälfte auf -THL +1 mM M-Platten ausgestrichen.

Bei beiden Hefeexperimenten wurden vor der Transformation der cDNA-Bank je 50 µl der kompetenten, mit dem jeweiligen Köderprotein prätransformierten, Hefelösung abgenommen und als Kontrolle mit dem leeren Beutevektor (pVP16) transformiert. Diese Transformation

war in beiden Fällen negativ, so daß eine Kontamination und eine unspezifische Interaktion zwischen der Aktivierungsdomäne und dem Köderprotein ausgeschlossen werden konnte.

2.2.3.5 LacZ Filter Lift

Um positive Protein-Protein Interaktionen zu bestätigen, wurde ein β -Galaktosidase-Assay durchgeführt. Dazu wurde *Whatman* Papier auf bewachsene -TL, -TLM, bzw. -TL+M-Platten gelegt und die Hefekolonien so auf das Filterpapier überführt. Die Hefezellen wurden durch 3-maliges Wiederholen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei RT aufgeschlossen. Danach wurden die Filter luftblasenfrei auf 2 in einer Petrischale übereinander liegende 3 MM *Whatman*-Papiere, die mit X-Gal Lösung getränkt waren, gelegt. Die Petrischalen mit den Membranen wurden bei 37 °C inkubiert. Innerhalb von 1-8 h färbten sich die Hefezellen, die die vom Reporter gen LacZ kodierte β -Galaktosidase exprimieren, blau.

2.2.3.6 Isolierung von DNA aus Hefe

Zur weiteren Analyse der Beuteproteine, mußte der Beutevektor aus den Hefen isoliert werden. Dazu wurden His3/LacZ-positive Hefekolonien über Nacht in 5 ml SD-L kultiviert. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml dieser Kultur pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 μ l *Yeast Lysis Buffer* resuspendiert. Dann wurden 200 μ l Phenol/Chloroform (1:1) und etwa 0,3 g *Glass Beads* (Sigma, 425-600 μ m Durchmesser) zugegeben und alles 2 min gevortext. Nach Zentrifugation in der Tischzentrifuge wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 4,0) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol und anschließender Zentrifugation gefällt. Das Pellet wurde 2x mit 70% Ethanol gewaschen und dann in 15 μ l H₂O gelöst

2.2.3.7 Herstellung elektrokompenter HB101 Zellen und Elektroporation

Die isolierten Beuteplasmide mußten zur weiteren Analyse (Restriktion, Sequenzierung) in Bakterienzellen eingebracht werden. Dazu wurde die Elektroporation in den *E. coli* Stamm HB101 gewählt, da HB101 Bakterien eine Leucin-Defizienz haben, so daß nur Zellen, die das Beuteplasmid aufgenommen haben, auf Medien ohne Leucin (M9-L) wachsen können. Im allgemeinen werden *E. coli* Zellen durch mehrmaliges Waschen in eiskaltem 10%igen Glycerin elektrokompent gemacht. Dabei werden die bei der Elektroporation störenden Elektrolyte aus dem Medium ausgewaschen. Eine Einzelkolonie wurde in 10 ml LB-Medium

überimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur in 1l vorgewärmtes LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 +/- 0,03 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 20 min auf Eis abgekühlt und dann in vorgekühlten Stahlbechern abzentrifugiert (4000g, 15 min). Das Pellet wurde dreimal mit eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen (1l, 0,5 l und 0,2 l) und anschließend in 2 ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die Transformation wurden 40 µl elektrokompente Zellen mit 1 µl Hefe DNA-Lösung auf Eis vermischt und in eine vorgekühlte Küvette (0,1 cm, BioRad) überführt. Mit einem Genepulser (BioRad) wurden die Zellen bei 2,5 kV, 25 µF und 200Ω elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1h bei 37° C schüttelnd inkubiert. Die Ansätze wurden zentrifugiert, in 1 ml Selektionsmedium (M9-L) resuspendiert und dann auf M9-L-Platten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für 1-2 Tage bei 37° C.

2.2.3.8 Kolonie PCR mit Hefezellen

Da im "*Yeast Three Hybrid*"-Experiment sehr viele positive Hefekolonien auftraten, wurden diese per Hefe-Kolonie PCR analysiert. Dazu wurde eine Hefekolonie in 20 µl 0,25%igem SDS durch vortexen resuspendiert und anschließend kurz zentrifugiert. Vom Überstand wurde 1 µl zu folgendem PCR-Ansatz pipettiert: 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Primer F (10 mM), 1 µl Primer R (10 mM), 1,25 µl Triton X-100 (20%), 0,25 µl Taq Polymerase, H₂O ad 24 µl.

Temperaturprofil:	Initial:	95° C	2 min	
	Cyclus 1:	95° C	1 min	
		55° C	1 min	Cyclus1: 30x
		72° C	2 min	
	Final:	72° C	5 min	
		4° C		

Entweder wurden VP16-Oligonucleotide verwendet, mit denen das ganze Insert amplifiziert wurde (dann wurden die PCR-Fragmente anschließend aufgereinigt und sequenziert), oder es kamen Dlxin-1 Primer zum Einsatz, um alle Dlxin-1-positiven Kolonien vor der Sequenzierung zu identifizieren und so die Analyse zu erleichtern.

(VP16-F1: GGATTTACCCCCACGACTCC, VP16-R1: AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT)

2.2.3.9 Medien und Lösungen für die Hefearbeit

10 x Aminosäure Stammlösung (AS): (w/v) 0,03% L-Isoleucine, 0,15% L-Valin, 0,02% L-Adenin Hemisulfat, 0,02% L-Arginin HCl, 0,02% L-Histidin HCl Monohydrat, 0,1% L-Leucin, 0,03% L-Lysin HCl, 0,02% L-Methionin, 0,05% L-Phenylalanin, 0,2% L-Threonin, 0,02% L-Tryptophan, 0,03% L-Tyrosin, 0,02% L-Uracil

10x LiAc: 1 M Lithiumacetat, pH 7,5

2x Probenpuffer: 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% Glycerin, 0,006% Bromphenolblau, 2% β -Mercaptoethanol

3-AT: 1 M 3-Aminotriazol in H_2O , wird -THULL-Platten zugesetzt, da der Promotor, des His3 Gens in L40 Hefen nicht 100% dicht ist.

5x M9-Salze: 30g/l $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$. 15g/l KH_2PO_4 , 5g/l NH_4Cl , 2,5g/l NaCl, 15mg/l CaCl $\times 2H_2O$

Lachssperma-DNA: einzelsträngig, denaturiert, 10 mg/ml in H_2O

M9-L-Medium: 1x M9-Salze, 1x AS ohne Leucin, 2 mM $MgSO_4$, 0,1M $CaCl_2$, 20g/l Glucose, 40mg/l Prolin, 2mg/l Thiamin

PEG: 50% PEG 3350 in H_2O

SD-Medium: 0.67% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 2% Glucose, 1x AS

SD-L: SD-Medium + 1x AS ohne Leucin

SD-T: SD-Medium + 1x AS ohne Tryptophan

SD-THL+1 mM M: SD-Medium + 1x AS ohne Tryptophan, Histidin, Leucin plus 1 mM Methionin

SD-THLM: SD-Medium + 1x AS ohne Tryptophan, Histidin, Leucin und Methionin

SD-THULL: SD-Medium + 1x AS ohne Tryptophan, Histidin, Uracil, Leucin und Lysin. Bei Platten zusätzlich + 10 mM 3-Aminotriazol (3-AT)

SD-TL: SD-Medium + 1x AS ohne Tryptophan und Leucin

SD-TLM: SD-Medium + 1x AS ohne Tryptophan, Leucin und Methionin

SD-TM: SD-Medium + 1x AS ohne Tryptophan, Methionin

SD-T+M: SD-Medium + 1x AS ohne Tryptophan + 1 mM Methionin

X-Gal Lösung: 167 μ l X-Gal (20 mg/ml X-Gal in DMF), 27 μ l β -Mercaptoethanol, 10 ml Z-Puffer

Yeast Lysis Buffer: 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)

YPD (für L40 Hefen): 2% Bacto-Peptide, 1% Hefeextrakt, 2% D-Glucose, pH 5,8.

YPAD (für AH109 Hefen): YPD + 0,02% Adenin-Hemisulfat, pH 5,8

Z-Puffer: 10,67 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 5,5 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

2.2.4. Zellkultur

Alle durchgeführten Zellkultur-Experimente wurden an HEK293 Zellen durchgeführt.

Die Zellen wurden in α -MEM (Cambrex) mit 10% FCS, 1 mM L-Glutamin und 1% Pen/Strep bei 37° C und 5% CO_2 gehalten und regelmäßig vor Erreichen der Konfluenz auf neue Schalen umgesetzt.

2.2.4.1 Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Methode

Zur Durchführung der Co-Präzipitations-Experimente wurden HEK293 Zellen per Calcium-Phosphat-Methode transfiziert. Dazu wurden einen Tag vor der Transfektion 1×10^6 Zellen auf Zellkulturschalen (10 cm \varnothing) ausgesät. Am nächsten Tag wurden 10 μg Gesamt DNA mit H_2O auf 450 μl aufgefüllt und mit 50 μl CaCl_2 (2,5M) versetzt. Dieser Ansatz wurde langsam in 500 μl vorgelegtes 2x HEPES getropft, wobei ständig gevortext wurde. Nach 15 minütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz vorsichtig auf die Zellen getropft und diese dann für 4-6 h bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und dann in Medium für 48 h bis zur Lyse bei 37° C inkubiert.

2x HEPES: 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mM HEPES, pH 7,05

2.2.4.2 Transfektion mit ExGene

Für die Immunocytochemie wurden 60.000 HEK293 Zellen pro 12-Loch-Platte auf Deckgläschen (15 mm \varnothing) ausgesät. Am nächsten Tag wurde 1 μg Gesamt DNA (125 ng pro Konstrukt, aufgefüllt mit Leervektor) mit 100 μl NaCl (150 mM) gemischt und anschließend unter vortexen mit 6,6 μl ExGene (MBI Fermentas) versetzt. 10 min später wurde der Ansatz auf die Zellen getropft. Nach 4-6 stündiger Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch neues Medium ersetzt.

2.2.5 Co-Immunopräzipitation

Um die Proteine für die Co-Immunopräzipitation aufzuschließen, mußten die Zellen erst lysiert werden. Dazu wurden die Zellen aus dem Inkubator auf Eis abgekühlt und 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4° C, um die Proteine vor Degradation zu schützen. Die Zellen wurden mit 1 ml Lysis Puffer plus Inhibitoren versetzt und für 1 h bei 4° C auf einer Wippe lysiert. Anschließend wurden die Lysate für 15 min bei 4° C und etwa 16.000g zentrifugiert, um den Zelldebris zu pelletieren. 5 μl des Überstandes

wurden benutzt, um die Protein-Konzentration nach der Bradford-Methode (BioRad) zu bestimmen. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. 50-100 μ l Protein-Lysat wurden zur Kontrolle der Expression der jeweiligen Proteine mit 6x Probenpuffer versetzt und anschließend denaturiert.

Pro Präzipitation wurden etwa 20 μ l Flag-*Beads* (Sigma, Anti-Flag M2 Affinity Gel) eingesetzt. Diese wurden dann 3x mit Lysis Puffer gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden 1000-1500 μ g Gesamt Protein zu den *Beads* gegeben und vorsichtig gemischt. Die Co-Präzipitation erfolgte bei 4° C unter langsamer Rotation für 2 h. Anschließend wurden die Ansätze 4x mit Lysis Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die *Beads* wurden pelletiert und der Überstand entfernt. Durch Zugabe von Probenpuffer und anschließender Denaturierung bei 95° C wurden die gebundenen Proteine freigesetzt und konnten per Western Blot analysiert werden.

Lysis Puffer: 50 mM HEPES (pH 7,5), 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10% Glycerin, 1% Triton X-100, Aufbewahrung bei 4° C

Lysis Puffer + Inhibitoren: Lysis Puffer, frisch mit 100 mM NaF, 1 mM Natrium-orthovanadat, 10 mM Natriumpyrophosphat, 1% PMSF und 0,5% Aprotinin versetzt.

6x Probenpuffer: 0,35 M Tris (pH6,8), 30% Glycerin, 10% SDS, 750 mM DTT, 0,01% Bromphenolblau

2.2.6 Northern Blot

Für Northern Blot Hybridisierungen wurden 15 μ g Total RNA, die aus Maus-Embryonen der Stadien E11,5 und E13, 5 isoliert wurden, in Formamid Ladepuffer (50% deionisiertes Formamid und 6% Formaldehyd in 1x MOPS) bei 70° C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die RNA wurde durch Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Der Transfer der RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) erfolgte durch Kapillartransfer in 20x SSC über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran 2x SSC gespült und bei 80° C für 2 h getrocknet. Die RNA wurde anschließend durch UV Crosslinking (UV-Stratalink 1800, Stratagene) fixiert und die Membran danach bei 68° C für 1 h in CHURCH-Puffer prähybridisiert. Danach erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65° C im Hybridisierungs-Ofen in 5 ml CHURCH -Puffer, dem 45 μ l radioaktiv markierte, denaturierte DNA-Sonde (ca. 50ng random markiertes PCR-Fragment: Wtip, bzw. GAPDH, Rediprime II Random Prime Labelling Kit, Amersham) zugesetzt wurden. Nach der Hybridisierung wurde die Membran kurz gespült und 3x für 10 min mit 2x SSC, 0,1% SDS bei RT gewaschen. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte mit 0,1x SSC, 0,1%

SDS bei 65° C für je 30 min. Die Membran wurde anschließend in Frischhaltefolie verpackt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels PhosphorImager und anschließender Autoradiographie.

20xSSC: 300 mM Natrium-Citrat, 3 M NaCl, pH 7,0

CHURCH Puffer: 7% SDS, 0,5M Natriumphosphat (pH 7,2), 1% BSA (Fraktion V), 1 EDTA

2.2.7 Western Blot

Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese wurde nach Angaben im *Molecular Cloning* Handbuch (Sambrook, 1989) mit dem Hoefer-System durchgeführt. Dabei wurde je nach Größe der aufzutrennenden Proteine ein 8, 10 oder 12%iges Trenngel verwendet, das Sammelgel war stets 4%ig. Die Proben wurden in 1x Probenpuffer (mit DTT) vor dem Laden denaturiert und bei 40-80 V bis zum Herauslaufen der Bromphenolblau-Lauffront aufgetrennt. Der Transfer der Proteine auf die zuvor mit Methanol aktivierte PVDF-Membran (Immobilon, Millipore) erfolgt als Naß-Blot bei 20 V bei 4° C über Nacht. Am nächsten Tag wird die Membran in 5% Milchpulver/PBST, bzw. 10% FCS (bei anti Phosphotyrosin-Antikörpern) für mindestens eine Stunde bei RT blockiert. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit den primären Antikörpern in Blockierungslösung bei 4° C über Nacht. Am nächsten Tag wird die Membran 3x 10 min mit PBST gewaschen, bevor der 1:2000 in Blockierungslösung verdünnte sekundäre Antikörper (anti Maus, bzw. anti Kaninchen IgG-HRP gekoppelt von Oncogene, 1:2000) auf die Membran gegeben wird. Nach 1 h Inkubation bei RT wird die Membran erneut 3x 10 min mit PBST gewaschen. Die Entwicklung des Blots erfolgte durch Roti-Lumin und anschließender Exposition eines Films.

Primäre Antikörper: Maus anti HA 1:1000, Kaninchen anti Flag 1:2000 (alle Sigma); Maus anti LexA (Clontech), 1:10.000; Maus anti Gal4 (DNA-bindende Domäne) 1:1000 (Santa Cruz), Maus anti Phosphotyrosin 1:1000 (Transduction Laboratories); Kaninchen anti Met 1:200 (freundl. Gabe von Dr. U Schaeper); Kaninchen anti Ror2 (324) 1: 1000 (freundl. Gabe von Prof. P. Knaus), Kaninchen anti WTIP 1:1000 (bei Eurogentec in Auftrag gegeben, Kaninchen wurden mit GREGGPSAAERRLEAL-Peptid immunisiert).

2.2.8 Immunocytoologie

48 h nach der Transfektion der HEK293 Zellen mit ExGene wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit 4% PFA/PBS bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5-10 min mit 3% BSA/0,1% Saponin in PBS

permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei RT blockiert (3% BSA/PBS). Hinterher erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Blockierungslösung für 1h bei RT oder bei 4° C über Nacht in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und 1h mit dem sekundären Antikörper in 3% BSA/PBS bei RT (feuchte Kammer in Dunkelheit) inkubiert. Die Kerne der Zellen wurde durch Zugabe von DAPI (1 mg/ml in DMF, 1:1000) während der Inkubation mit den sekundären Antikörpern angefärbt. Nicht gebundener Antikörper wurde durch erneutes Waschen mit PBS (3x) entfernt. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences) auf Objektträgern eingedeckelt und an einem Axiovert-200 Fluoreszenz-Mikroskop von Zeiss ausgewertet.

Primäre Antikörper: Kaninchen-anti-HA, Maus anti Flag (beide von Sigma), 1:500 verdünnt. **Sekundäre Antikörper:** AlexaFluor 488 Ziege anti Maus IgG, AlexaFluor 568 Ziege anti Kaninchen IgG (beide von Molecular Probes), 1: 1000 verdünnt.

2.2.9 Immunhistologie

Maus-Gefrierschnitte wurden bei RT aufgetaut und anschließend für 15 min bei -20° C in kaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und mit einem wasserabweisenden Stift (DAKO) umrandet. Danach erfolgte die Permeabilisierung für 10 min mit 3% FCS/0,1% Saponin in PBS. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann für 30 min mit 10% FCS/PBS bei RT blockiert. Hinterher erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in Blockierungslösung (5% FCS/PBS) bei 4° C über Nacht in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Schnitte 3x 5 min mit PBS gewaschen und 1h mit dem sekundären Antikörper in 3% BSA/PBS bei RT (feuchte Kammer in Dunkelheit) inkubiert. Die Zellkerne wurde durch Zugabe von DAPI (1 mg/ml in DMF, 1:1000) während der Inkubation mit den sekundären Antikörpern angefärbt. Wurde eine Doppelfärbung mit anti Ror2 und anti Wtip durchgeführt, wurde zuerst der Esel anti Ziege Sekundärantikörper verwendet, anschließend 3x gewaschen und erst dann mit Ziege anti Kaninchen Antikörpern inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch erneutes Waschen mit PBS entfernt. Anschließend wurden die Schnitte mit Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences) eingedeckelt und an einem Axiovert-200 Fluoreszenz-Mikroskop von Zeiss ausgewertet.

Primäre Antikörper: Ziege anti Ror2 1:50 (R&D Systems), Kaninchen anti WTIP 1:25 (bei Eurogentec in Auftrag gegeben, Kaninchen wurden mit GREGGPSAAERRLEAL-Peptid

immunisiert). **Sekundäre Antikörper:** AlexaFluor 488 Esel anti Ziege IgG, AlexaFluor 568 Ziege anti Kaninchen IgG (beide von Molecular Probes), 1: 1000 verdünnt.

2.2.10 *In situ* Hybridisierung

2.2.10.1 Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Die *in vitro* Transkription und die Markierung mit Digoxigenin-UTP (DIG-UTP) erfolgte mit dem DIG-RNA-Labeling Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers.

Folgende Sonden wurden sowohl bei der *in situ* Hybridisierung (ISH) an Ganztierpräparaten als auch auf Gefrierschnitten eingesetzt: Wtip (Y2H) und Ror2 F2R2, beide in pCRII TOPO. Die Wtip-Sonde wurde im Rahmen dieser Arbeit kloniert, sie entspricht in der Sequenz dem isolierten "*Yeast Two Hybrid*"-Klon. Um eine antisense Sonde zu erzeugen, wurde das Plasmid mit XbaI linearisiert und mit SP6-Polymerase transkribiert. Die Ror2 F2/R2-Sonde wurde freundlicherweise von N. Brieske zur Verfügung gestellt.

2.2.10.2 *In situ* Hybridisierung an Ganztierpräparaten (Whole Mount)

Für die Whole Mount ISH wurden Maus-Embryonen der Stadien E9,5-E13,5 präpariert und ü. N. in 4% PFA/PBS fixiert. Die fixierten Embryonen wurden durch eine aufsteigende Methanol-Reihe dehydriert, entfettet und dann bis zur Verwendung in 100% Methanol bei -20° C gelagert. Zur Hybridisierung wurden die Embryonen in einer absteigenden Methanol-Reihe rehydriert, dann für 1 h auf Eis in 6% Wasserstoffperoxid gebleicht und für 3-8 min mit Proteinase K (10 µg/ml) bei RT verdaut. Nach gründlichem Waschen mit PBST wurden die Embryonen für 20 min in Fixierlösung (4% PFA; 0,2% Glutaraldehyd) fixiert und wiederum mehrfach in PBST gewaschen. Zur Prähybridisierung wurden die Embryonen für eine Stunde bei 65° C in Hybridisierungspuffer (50% Formamid; 5x SSC; 5% Heparin; 0,1% Tween 20) inkubiert, dann wurde die denaturierte Sonde zugegeben (Endkonzentration ca. 0,25 µg/ml). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65° C. Am nächsten Tag wurden die Embryonen zunächst 2x 30 min bei 65° C mit frischem Hybridisierungspuffer gewaschen, dann auf RT abgekühlt und anschließend mit RNase A (10 µg/ml) bei 37° C verdaut, um ungebundene Sonde zu entfernen. Danach wurde mehrfach mit Formamid-Puffer (2x SSC; 50% Formamid; 0,1% Tween 20) bei 65° C gewaschen, gefolgt von 2x Waschen in MABT (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH7,5 mit NaOH eingestellt; 0,1% Tween 20). Zur Blockierung für die nachfolgende Antikörper-Inkubation wurden die Embryonen mit 10% *Blocking Reagent* (Roche) in MABT behandelt. Die Antikörper-Inkubation erfolgte ü. N. bei 4° C (anti DIG-Fab (Roche), 1:5000 in MABT). Ungebundene Antikörper wurden durch 24-stündiges

Waschen mit 0,05% Levamisol (Sigma) in PBST mit mehrfachem Lösungswechsel ausgewaschen. Zur Signaldetektion werden die Embryonen in AP-Puffer (0,1 M NaCl; 50 mM MgCl₂; 0,1% Tween 20; 0,1 M Tris-HCl pH 9,5; 0,05% Levamisol) überführt und 3x für 20 min äquibriert und anschließend mit *BM Purple* gefärbt (Roche). Zur Konservierung der Signale wurden die Embryonen zunächst 3x mit AP-Puffer gewaschen und dann für eine Stunde in 4% PFA/0,2% Glutaraldehyd/5 mM EDTA fixiert und bei 4° C gelagert. Zur Auswertung wurden die Präparate in PBS mit 5 mM EDTA überführt und photographiert.

2.2.10.3 *In situ* Hybridisierung auf sagittalen Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden nach dem Auftauen für 10 min mit 4% PFA fixiert und dann 3x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Acetylierung der Objektträger für 10 min in einer Glasküvette in Triethanolamin-Lösung (1333 µl Triethanolamin, 166 µl konz. HCl, 250 µl Essigsäureanhydrid, H₂O ad 100 ml). Nach kurzem Waschen in PBS erfolgte die Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer (50% deionisiertes Formamid, 5x Denhardts, 5x SSC, 500 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA, 150 µg/ml Hefe-tRNA) Vor Beginn jeder Hybridisierung wurde die markierte Sonde für 5 min bei 80° C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf etwa 100-200 ng/150 µl in Hybridisierungspuffer verdünnt. Nach dem Auftragen der Sonde wurden die Schnitte mit einem Stück Plastikbeutel (aus Polypropylen-Entsorgungsbeuteln von Roth zurecht geschnitten) vorsichtig bedeckt. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 70° C in einer feuchten Kammer mit einem Kammerpuffer aus 50% Formamid und 5x SSC statt. Am nächsten Tag wurden die Plastikbeutelstücke durch 5 min Waschen in 5x SSC bei RT abgeschwemmt und die Präparate dann in 0,2x SSC bei 70° C für 2x 30 min gewaschen. Nach erneutem kurzen Waschen in 0,2x SSC bei RT wurden die Objektträger in B1 Puffer überführt (0,1 M Tris pH 7,5, 0,15 M NaCl) und 5 min inkubiert. Daraufhin erfolgten die Blockierung mit 10% Ziegen Serum in B1 Puffer für 60 min bei RT und die Inkubation mit dem anti DIG Antikörper (1:2500 in 10% Ziegen Serum/B1) ü. N. bei 4° C. Danach wurden die Objektträger 3-4x für je 10 min mit B1-Puffer gewaschen, und kurz in NTMT (0,1 M Tris pH9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween) inkubiert, bevor sie in die Färbelösung transferiert wurden (3,5 µl NBT und BCIP/1 ml NTMT im Dunkeln). Um die Farbreaktion zu stoppen, wurden die Objektträger mit H₂O gewaschen und anschließend in Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences) eingedeckelt.