

4. Material & Methoden

4.1. Material

Chemikalien & Reagenzien

Es wurden nur Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades (p.a.) von folgenden Herstellern verwendet: Fluka (Neu-Ulm), GIBCO Life Technologies (Rockville), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen). Reagenzien wie radioaktive Nukleotide, Antikörper, Enzyme, Oligonukleotide etc. wurden von folgenden Herstellern bezogen: Amersham-Buchler (Braunschweig), Roche (Basel/Mannheim), Transduction Laboratories (USA), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus), BioTeZ (Berlin), Stratagene, Promega, GIBCO Life Technologies, Invitrogen, Genomed, Quiagen. Verwendete Geräte: Luminometer (Lumat LB9507, Berthold), ELISA-Reader (BioRad), DNA-Sequencer 4000L (MWG-Biotech), Centrifuge 5402 (Eppendorf), Centrifuge J2-21 (Beckman) mit Rotoren JA 10 und JA 20 und Ultracentrifuge TL-100 (Beckman) mit Rotoren TLA 100.3 und TLV 100.

Bakterienstämme:

Es wurden ausschließlich konjugationsdefiziente K12-Sicherheitsstämme von E.coli verwendet.

- JM 109: *F'*, *proAB*⁺, *lacI*^f, $\Delta(lacZ)M15$, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*, *gyrA96*
 XL1 Blue: *F'*, *Tn10* (*tet*^r), *proAB*⁺, *lacI*^f, $\Delta(lacZ)M15$, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*, *gyrA96*
 HB 101: *F*, *D(gpt-proA)62*, *leuB6*, *ara-14*, *galK2*, *lacY1*, *rpsL20* (*Str*^r), *xyl5*, *mtl-1*, *supE44*, *hsdR17*, *recA13*

Hefestämme:

- Saccharomyces cerevisiae* L40: MATa, *his3*, *trp-901*, *leu2-3,112*, *ade2*, *LYS::(lexAop)4-HIS3*, *URA::(lexAop)8*, *lacZ*, *gal4*, *gal80*

Säuger-Zelllinien:

- SW 480 (ATCC-Nr. CCL 228): humane Adenokarzinomzellen des Kolons.
 HEK 293 (ATCC-Nr. CRL 1573): humane, embryonale Nierenepithelzelllinie, transformiert mit Adenovirus 5.
 Neuro2A (ATCC-Nr. CCL 131): murine Neuroblastomzelllinie

Alle Zelllinien wurden in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% foetalem Kälberserum (Sigma) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte kultiviert und transfiziert.

Vektoren:

pBTM116 (Bartel & Fields, 1995) wurde als „bait“-Vektor im Hefe-2-Hybrid-System eingesetzt. Er enthält 5' der Klonierungsstelle eine LexA-DNA-Bindungsdomäne und trägt ein Tryptophan-Auxotrophie-Markergen.

pVP16 enthält stromaufwärts der multiplen Klonierungsstelle eine Kern-Lokalisationssequenz und die VP16-Aktivierungsdomäne. Er trägt außerdem ein Leucin-Auxotrophie-Gen. pVP16 wurde als cDNA-Bibliotheksvektor im Hefe-2-Hybrid-System eingesetzt.

pGAD424 (Clontech) ist wie pVP16 ein „Beute“-Vektor im Hefe-2-Hybrid System, jedoch mit einer Gal4-Transaktivierungsdomäne.

pcDNA3.1(+) (Invitrogen) ist ein Expressionsvektor mit Zytomegalievirus (CMV) Promotor.

pcDNA-FLAG/HA ist ein modifizierter pcDNA3.1-Vektor, bei dem ein FLAG- bzw. Hemagglutinin (HA)-Epitop 5' der Klonierungsstelle inseriert wurde.

pCS2+ (Weintraub et al., 1991) ist ein weiterer Expressionsvektor, der zu Expression der verschiedenen I-mf-Isoformen verwendet wurde.

pBluescript II SK⁺ (Stratagene) wurde für DNA-Klonierungen im bakteriellen System eingesetzt.

pSP64 (Krieg & Melton, 1984) wurde zur Herstellung der synthetischen Frat-1 RNA verwendet.

4.2. Methoden

4.2.1. Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden werden im Folgenden nicht näher beschrieben und basieren auf den Laborhandbüchern von Sambrook et al., 1989, und Ausubel et al., 1987. Dazu gehören unter Anderem: analytische Plasmid-Präparation, Restriktionsverdau, Dephosphorylierung, Ligation und anderweitige enzymatische Manipulation von DNA, Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen, Durchmustern von Phagenbibliotheken, Hybridisierung mit radioaktiven DNA-Sonden etc.

Mit Kits nach Herstellerangaben wurde durchgeführt: Plasmid-Präparationen in quantitativem Maßstab (Qiagen), Reinigung von DNA aus Agarosegelen (Jetsorb, Genomed), radioaktive Markierung von DNA (Megaprime DNA labelling system, Amersham), Chemolumi-

neszenzreaktion (ECL-Detection-Kit, NEN Dupont) und DNA-Sequenzierung (Thermo-sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit, Amersham).

4.2.2. Hefe-2-Hybrid System

Die Hefe-2-Hybrid Interaktionsstudien wurden nach der im "Matchmaker™ Two-Hybrid System" (Clontech Inc., Palo Alto) beschriebenen Lithiumacetat-Methodik durchgeführt. Zur chemischen Transformation von L40-Hefen wurde eine einzelne Hefekolonie in 20ml YPD-Medium bei 30°C geschüttelt, bis die Suspension eine OD₆₀₀ von 0,5 erreichte. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5min, 2.500×g) geerntet, in 30ml Wasser gewaschen und in 1,5ml TE-Puffer/100mM LiAc resuspendiert. 100µl dieser Hefesuspension wurden dann mit 0,1-2µg der zu transfizierenden DNA bzw. und 100µg Träger-DNA aus Heringssperma vermischt. Nach Zugabe von 600µl PEG/LiAc-Lösung und erneutem Mischen wurde dieser Ansatz für 30min bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden 70µl DMSO zugegeben und die Hefen für 15min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach Abkühlung auf Eis wurden Teile des Ansatzes auf jeweils Trp- und Leu-Mangelagarplatten (-TL-Platten) und Trp-, His-, Ura-, Lys- und Leu- Mangelagarplatten (-THULL) ausgestrichen. Wachstum auf -TL-Platten dient der Transformationskontrolle, -THULL-Platten dienen der Analyse der Protein-Protein-Interaktionen.

Das Screen-Experiment verlief prinzipiell in den selben Schritten, nur mit bereits Köder-Vektor-transformierten Hefen (pBTM-Conductin), die in -T-Selektionsmedium kultiviert wurden, und in größeren Volumina. Am Ende der Inkubation und nach Abkühlung auf Eis wurden die transformierten Hefen noch einmal mit 1000×g pelletiert, anschließend in 300ml YPD-Medium resuspendiert und für etwa 2 Stunden bei 30°C geschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Hefen in 30ml Wasser resuspendiert und auf insgesamt 30 100cm²--THULL-Platten resuspendiert. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden 1:10.000 und 1:100.000 Verdünnungen auf -TL-Platten ausgestrichen.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefen wurden einzelne Hefekolonien in 2ml -L-Medium resuspendiert und 24 h bei 30°C geschüttelt. Die Flüssigkulturen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen pelletiert und nach Zugabe von 200µl Hefe-Lysepuffer, 200µl Phenol/Chloroform (1:1) und 0,3g Säure-behandelter Glasperlen durch zweiminütiges kräftiges Schütteln lysiert. Nach Zentrifugation (5min, 15.000×g) wurde die DNA aus dem Überstand durch Präzipitation mit 1/10Vol. 3M NaAc und 2,5Vol. Ethanol isoliert. Das Pellet wurde dann mit 70% Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Zur Isolierung der Bibliothek-Plasmide wurde die isolierte Hefe-DNA in elektrokompetente HB101-Bakterien, die

Leucin-auxotroph sind, transformiert. Die Bakterien wurden für zwei Tage auf M9-Agarplatten ohne Leucin selektiert und die Plasmid-DNA aus LB-Flüssigkulturen dieser Bakterien nach Standardmethoden isoliert.

Im „Screen“-Experiment wurde eine aus E10,5 Mausembryonen hergestellte cDNA-Bank verwendet. Dabei wurden etwa $3,5 \times 10^8$ Bibliotheksklone durchsucht und von 3 unabhängigen Experimenten bis zu 100 positive Klone durch Sequenzierung identifiziert. In einem sog. Re-Screen wurde die Interaktion durch Rücktransformation der isolierten Klone mit dem Köderkonstrukt verifiziert. Zusätzlich wurde bei einigen Kandidaten die VP16-Aktivierungsdomäne durch die *lexA*-DNA-Bindedomäne ersetzt und diese Konstrukte gegen eine Conductin-GAL4-Aktivierungsdomänen-Fusion getestet.

<u>YPD-Medium:</u>	20g/l Difco Peptone, 10g/l Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose
<u>10× SD-Medium:</u>	6,7g/l Difco Yeast Nitrogen Base w/o amino acids, 2% (w/v) Glucose
<u>TE-Puffer:</u>	10mM Tris/HCl pH7,5, 1mM EDTA
<u>PEG/LiAc-Lösung:</u>	40% PEG4000 in TE, 100mM LiAc
<u>-TL-Medium</u>	1x SD, 300mg/l L-Isoleucin, 1500mg/l L-Valin, 200mg/l L-Adeninhemisulfat, 200mg/l L-Arginin, 200mg/l L-Histidin, 300mg/l L-Lysin, 200mg/l L-Methionin, 500mg/l L-Phenylalanin, 2000mg/l L-Threonin, 300mg/l L-Tyrosin, 200mg/l L-Uracil
<u>-THULL-Medium</u>	wie -TL, jedoch ohne Histidin, Uracil und Lysin
<u>Hefe-Lysepuffer</u>	2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH8, 1mM EDTA
<u>M9-Agarplatten</u>	6g/l Na ₂ HPO ₄ , 3g/l KH ₂ PO ₄ , 1g/l NH ₄ Cl, 0,5g/l NaCl, Aminosäuremischung wie in -TL, jedoch mit Trp, 2% (w/v) Glucose, 50mg/ml Ampicilin, 40µg/ml Prolin, 1mM Thiamin, 1,5% (w/v) Agar

4.2.3. Reporterassays

Für die Lef/TCF-abhängigen Reporterassays wurden die Konstrukte 3× wt-Lef/TCF-luc und 3× mut-Lef/TCF-luc verwendet. Sie basieren auf den Konstrukten TOP- bzw. FOPflash (Korinek et al., 1997). Abbildung 4-1 zeigt schematisch die Struktur der verwendeten Reporterstrukturen. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pCH110 (Pharma-

cia) verwendet, welches das β -Galaktosidase-Gen unter der Kontrolle des frühen SV40 Promotor/Enhancer beinhaltet.

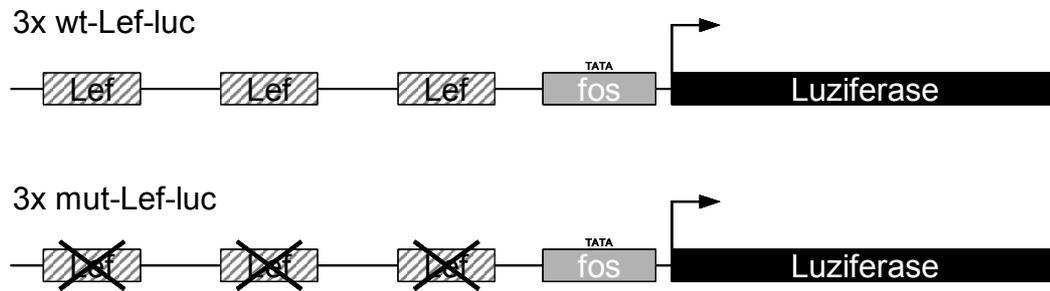


Abbildung 4-1: Schematische Darstellung der verwendeten β -Catenin-abhängigen Reporterkonstrukte

Für die Transfektion wurden einen Tag zuvor $1,7 \times 10^5$ Zellen auf 6well-Platten in DMEM +10% FCS ausgesät. Die Transfektion erfolgte nach der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode mit $0,3 \mu\text{g}$ Luziferase-Reporter, $0,7 \mu\text{g}$ pCH110 und Effektor-Plasmiden in variablen Anteilen in jeweils dreifachen Ansätzen. Mit pCDNA3.1 Leervektor wurde die DNA-Menge einheitlich auf $5 \mu\text{g}$ eingestellt. Jeder dreifache Ansatz wurde mit $37,5 \mu\text{l}$ $2,5\text{M}$ CaCl_2 vermischt und mit Wasser auf ein Volumen von $375 \mu\text{l}$ aufgefüllt. Separat wurden für jeden dreifachen Ansatz $6 \mu\text{l}$ $100\times$ Phosphat-Lösung und $369 \mu\text{l}$ $2\times$ HBS in einem Reaktionsgefäß vorgelegt. Die DNA-Kalzium-Mischung wurde nun tropfenweise unter ständigem Mischen zu dem HBS/Phosphat gegeben. Die vorbereiteten Zellen wurden mit je $250 \mu\text{l}$ /well dieser Transfektionsmischung für 6 Stunden im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Zur Entfernung der Kalziumphosphatkristalle wurde einmal mit angesäuertem DMEM gewaschen. Nach etwa 18 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen, mit $900 \mu\text{l}$ PBS von der Zellkulturschale abgespült und durch Zentrifugation (15sec bei $9000\times g$) gesammelt. Durch Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Lysepuffer und kurzes vortexen wurden die Zellen aufgeschlossen.

Für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden entsprechende Polystyrol-Messgefäße mit $200 \mu\text{l}$ Luziferase-Reaktionspuffer beschickt, dann mit $5\text{-}10 \mu\text{l}$ Zelllysate vermischt und im Injektions-Luminometer mit $80 \mu\text{l}$ Substrat-Lösung versetzt und die Lichtausbeute quantitativ erfasst. Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz über β -Galaktosidase-Aktivität wurden je $25 \mu\text{l}$ Zelllysate mit $1 \mu\text{l}$ $100\times$ Mg-Lösung, $34 \mu\text{l}$ ONPG-Lösung und $40 \mu\text{l}$ $0,1\text{M}$ Phosphatpuffer in 96well-Mikrotiterplatten vermischt und bei 37°C bis zum Eintreten einer gut sichtbaren Gelbfärbung inkubiert. Das Ausmaß der Färbung wurde über die Absorption bei 415nm im

ELISA-Reader quantifiziert. Die Luziferase-Messwerte wurden auf die β -Galaktosidase-Werte abgeglichen. Sämtliche Reporter-Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt.

<u>100× Phosphat:</u>	35mM Na ₂ HPO ₄ , 35mM NaH ₂ PO ₄
<u>2× HBS:</u>	42mM HEPES pH7,05, 270mM NaCl
<u>PBS-Puffer:</u>	120mM NaCl, 1,5mM CaCl ₂ , 28mM Na ₂ HPO ₄ , 2,5mM NaH ₂ PO ₄ , pH7,3
<u>Lysepuffer:</u>	25mM Tris/HCl pH7,5, 8mM MgCl ₂ , 15% Glycerol, 1% TritonX100, 1mM DTT
<u>Luziferase-</u>	
<u>Reaktionspuffer:</u>	25mM Glycylglycin pH7,8, 10mM MgSO ₄ , 2mM ATP
<u>Luziferase-</u>	
<u>Substratlösung:</u>	25mM Glycylglycin pH7,8, 0,2mM Luciferin
<u>100× Mg-Lösung:</u>	100mM MgCl ₂ , 4,5M β -Mercaptoethanol
<u>ONPG-Lösung:</u>	4mg/ml in 0,1M Phosphatpuffer
<u>0,1M Phosphatpuffer:</u>	82mM Na ₂ HPO ₄ , 18mM NaH ₂ PO ₄

4.2.4. Immunpräzipitation und Immunoblot

Für diese Experimente wurden 8×10^5 Neuro2A oder HEK293-Zellen auf 10cm-Petrischalen ausgebracht und über Nacht kultiviert. Die Transfektion erfolgte auch hier nach der oben beschriebenen Kalziumkoprazipitationsmethode mit einem Gesamtvolumen des Transfektionsansatzes von 1ml und mit 10-20 μ g Plasmid-DNA. Nach 18-24 stündiger Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 900 μ l L-CAM-Lysepuffer von der Schale geschabt, in Eppendorfgefäße überführt und 10min zur vollständigen Lyse unter gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden anschließend für 8min bei 15.000 \times g sedimentiert und der Überstand in neue Gefäße überführt. Davon wurden als Extraktkontrolle 75 μ l abgenommen, mit 25 μ l 4 \times Dissoziationspuffer versetzt und 5min aufgeköcht. Der restliche Überstand wurde mit etwa 1 μ g des entsprechenden Antikörpers und 20 μ l 50% Protein-A oder -G Sepharose (Pharmacia) vermischt. In dieser Arbeit wurden folgende Antikörper verwendet: α Flag M2 mAb (Sigma), α HA 12CA5 mAb, aHA 3F10 rAb (beide Roche), α GSK3 mAb, α β -Catenin mAb (beide Transduction Lab), α Conductin CG7 mAb (J. Behrens). Die Immunpräzipitationsansätze wurden für 3 Stunden bei 4°C rotiert. Immunkomplexe wurden anschließend pelletiert (1min bei 15.000 \times g) und 5 mal mit NET-Hochsalzpuffer gewaschen.

Abschließend wurden die Proben in 100µl 1× Dissoziationspuffer aufgenommen und ebenfalls für 5min bei 95°C inkubiert. Die Lagerung dieser Proben erfolgte bei -65°C, deren Handhabung ausschließlich auf Eis.

Zur Analyse wurden die Proben auf 8-12%-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE, (Laemmli, 1970)) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf PVDF-Membranen (Millipore) überführt. Dies geschah im sog. Nassblotverfahren: Gel und Membran wurden in Blotkammern (BioRad) mit 1× Blotpuffer bedeckt. Die Überführung der Eiweiße erfolgte bei 500mA bei 4°C für eine Stunde. Die Membranen wurden anschließend mit Ponceau-Rot gefärbt, um die Markerbanden einzeichnen zu können. Der Farbstoff wurde dann mit PBS wieder abgewaschen und die Membran mit 5% Magermilch in PBS für > 1 Stunde blockiert. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper, 1:1000 verdünnt in 5% Magermilch/PBS, erfolgte für > 1 Stunde. Überschüssiger Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen für jeweils 10min mit PBS entfernt. Anschließend wurde die Membran für > 1 Stunde mit Sekundärantikörper (Peroxidase-gekoppelter Goat-anti-mouse IgG, Jackson Laboratories) in 1:2000 Verdünnung inkubiert, danach erneut fünfmal mit PBS gewaschen. Die Visualisierung der Peroxidase erfolgte mit dem Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit (NEN Dupont) nach Herstellerangaben.

L-CAM-Lysepuffer: 10mM HEPES pH7,4, 140mM NaCl, 5mM KCl, 0,7mM MgSO₄, 1,2mM CaCl₂, 1mM PMSF, 1% TritonX100

NET-Hochsalzpuffer: 500mM NaCl, 50mM Tris/HCl pH8, 5mM EDTA, 1% TritonX100

1× Blotpuffer: 25mM Tris/HCl pH8,6, 200mM Glycin

sonstige Reagenzien: Ausubel et al. (1987)

4.2.5. *Xenopus* Injektionen

Synthetische RNA von Frat-1 und Diversin wurde mit dem SP6 mMessageMachine-Kit (Ambion) nach Herstellerangaben hergestellt.

Xenopus laevis Weibchen wurden durch Injektion von 150U Gonadotropin superovuliert und das Gelege etwa 8 Stunden später geerntet. Die Oozyten wurden manuell befruchtet. Dazu wurde einem Männchen der gesamte Hoden entfernt, homogenisiert und zu den Oozyten gegeben. Erfolgreiche Befruchtung wurde anhand der Ausrichtung der Oozyten verifiziert. Durch Behandlung mit einer 3%igen Cystein-Lösung wurde die Gallerthülle der befruchteten Oozyten entfernt. Die befruchteten Oozyten wurden in Oozyten-Medium bei 18°C bis zu Vierzellern entwickelt. Die RNA wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf die gewünschte

Konzentration verdünnt. Mit einer ausgezogenen Glaskapillare wurden etwa 30 Nanoliter in die ventralen Blastomeren injiziert (microINJECTOR™, Tritech Research, Inc.). Die injizierten Embryonen wurden bei 18°C in Oozyten-Medium über Nacht kultiviert und die Phänotypen visuell bestimmt und asugezählt.

Oozyten-Medium: 5mM HEPES pH7,6, 96mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl₂, 1,8mM CaCl₂, 2,5mM Na-Pyruvat, je 10% Penicillin & Strptomycin

Cystein-Lösung: 3% in H₂O

4.2.6. RNA-Präparation aus *Drosophila* und RT-PCR

Etwa 500 *Drosophila*-Embryonen wurden in 250µl TRIZOL (GIBCO Life Technologies) aufgenommen, mechanisch aufgeschlossen und mit QUIAshredder™ Säulen nach Herstellerangaben homogenisiert. Das Eluat der Säulen wurde mit 120µl CHCl₃ vermischt und zur Phasentrennung für 2min bei 15.000×g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und 0,2µl Glycogen (Roche) zugegeben. Die RNA wurde mit 250µl Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Für die reverse Transkription wurden 5µg RNA mit 0,5µl random Primern (1µg/µl) vermischt, für 2min auf 70°C aufgeheizt und anschließend auf Eis abgekühlt. Dazu wurden 1µl 2mM dNTPs, 1µl 100mM DTT, 0,2µl RNasin (Promega), 2µl 5× Erststrangsynthese-Puffer und 1µl Superscript™ Reverse Transkriptase (beides GIBCO) gegeben und für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Für die folgende spezifische PCR-Reaktion wurden 0,5µl des RT-Ansatzes als Matritze verwendet. Die Bestandteile der Reaktion waren weiterhin: 2µl 10× Pfu-Puffer (Stratagene), 0,25µl Pfu™-Polymerase (Stratagene), 2,5µl 2mM dNTPs, 0,6µl 50mM MgSO₄, je 1µl spezifische Primer mit einer Konzentration von 10µM und 12,15µl Wasser. Die PCR-Bedingungen waren: 10sec 96°C, 25sec Hybridisierungstemperatur, 1min40sec 72°C, 40 Zyklen. Sämtliche über PCR amplifizierte Fragmente wurden durch Sequenzierung verifiziert.

4.2.7. Klonierungen

Frat-1

Das murine Frat-1-Gen besitzt keine Introns (Jonkers et al., 1997), daher konnte der kodierende Bereich aus genomischer ES-Zell-DNA durch PCR amplifiziert werden. Folgende Primer wurden eingesetzt:

mFrat-1 sense: 5'-AAC CGA GCT GCC AGC GAC G-3'

mFrat-1 antisense: 5'-GGT GCG CTC TGT AGA TTC TGC-3'

Das Produkt von knapp 900bp wurde glatt in die EcoRV-Stelle von pBluescript eingesetzt, und mit einer erneuten PCR wurde an das 5'-Ende eine NotI-Schnittstelle im Leserahmen der Flag- und HA-Epitope eingefügt. Dieses Produkt wurde mit NotI und EcoRI in pCDNA Flag/HA eingesetzt und durch Sequenzierung verifiziert.

I-mf

Zu Klonierung der Gesamt-cDNA von I-mf a wurde der N-Terminus aus dem EST AA838992 amplifiziert. Der stromaufwärts gelegene Primer beinhaltet bereits eine NotI-Schnittstelle im korrekten Leserahmen.

Not-I-mf sense: 5'-GCG AGT CCG CGG CCG CTG TCC CAG G-3'

I-mf antisense: 5'-GCA TCA GGA GGA GAA ACA GAG TC-3'

Dieses PCR-Produkt wurde dann in einer dreifach Ligation über NotI, die interne PstI-Schnittstelle bei Kodon 192 und XbaI am 3'-Ende mit dem C-Terminus aus dem Fragment #70 (Hefe-2-Hybrid-Klon) verbunden und in pCDNA Flag/HA eingesetzt.

Für die weitere Charakterisierung von I-mf wurden die cDNA's von Isoformen b und c freundlicherweise von Dr. Norbert Kraut (Boehringer Ingelheim, Biberach) zur Verfügung gestellt.

Diego

Für die Klonierung von diego (dgo) aus embryonaler *Drosophila* cDNA wurden folgende Primer eingesetzt:

dgo-s-beg: 5'-CGG TCC AAA GAC GGG ATT TA-3'

dgo-s-mid: 5'-TCG ATC AGC AGA ACA AGA GC-3'

dgo-as-mid: 5'-TAG CCT CCA CTG CCT GAT CT-3'

dgo-as-end: 5'-CAG CTG TGG GAT TAC CGA AC-3'

Die entstandenen PCR-Produkte decken jeweils etwa die Hälfte der gesamten cDNA ab. Die entsprechenden Hälften wurden über interne XbaI (dgo) zusammen gefügt. Mit einem weiteren PCR-Schritt wurden NotI und NheI bzw. XhoI Schnittstellen für die Klonierung in pCDNA Flag/HA eingefügt.

4.2.8. Abkürzungen

×g	×Gravitationskonstante	LiAc	Lithiumacetat
ATP	Adenosintriphosphat	luc	Luziferase
bp	Basenpaar	OD	optische Dichte
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	phosphate-buffered saline
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	PCR	polymerase chain reaction
DTT	Dithiothreitol	PEG	Polyethylenglykol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay	PVDF	Polyvinylidenfluorid
EST	expressed sequence tag	RNA	Ribonukleinsäure
FCS	fetal calf serum	RT	reverse Transkription
HBS	HEPES-buffered saline	SV40	simian virus 40
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure	Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
IP	Immunpräzipitation	Vol	Volumen
LB	Luria Bertani	w/v	Masse pro Volumen