

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Bakterienstämme

DH10B	F^- <i>mcrA</i> Δ -(<i>mrr hsd RMS-mcr BC</i>) ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ^- <i>rpsL endA1 nupG</i> (Invitrogen)</i>
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac^-</i> F' [<i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r) (Stratagene)
SURE	<i>e14^-(McrA^-)</i> Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>uvrC</i> F' [<i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] (Stratagene)
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i> (Invitrogen)
BL21-RP	<i>E. coli</i> B F^- <i>ompT hsdS</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>dcm+</i> Tet ^r <i>gal endA Hte</i> [<i>argU proL Cam^r</i>] (Stratagene)
SCS-pSE111	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> ($r_K^+ m_K^+$) <i>supE44 relA1</i> (Stratagene); enthält Plasmid pSE111 mit <i>lacI^q</i> -Repressorgen und <i>argU</i> Gen für die seltene Arginin-tRNA (Bussow et al., 1998)

4.1.2. Hefestämme

L40ccU MATa	<i>MATa his3</i> Δ 200 <i>trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)</i> ₄ - <i>HIS3 ura3::(lexAop)</i> ₈ - <i>lacZ ADE2::(lexAop)</i> ₈ - <i>URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2</i> (Goehler et al., 2004)
L40cc MAT α	<i>MATα his3</i> Δ 200 <i>trp1-910 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)</i> ₄ - <i>HIS3 URA3::(lexAop)</i> ₈ - <i>lacZ GAL4 gal80 can1 cyh2</i> (Goehler et al., 2004)
SEY6210	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 his3</i> Δ 200 <i>trp1-Δ901 lys2-Δ801 suc2-Δ9</i> (Robinson et al., 1988)
GT17	<i>MATa ade1-14 his3-Δ200 leu2-3,112 trp-289 ura3-52 [psi] [pin]</i> (Derkatch et al., 1997)

OT56	<i>MATa ade1-14 his3-Δ200 leu2-3,112 trp-289 ura3-52 [PSI⁺] [PIN⁺]</i> (Derkatch et al., 1996)
OT78	<i>MATa ade1-14 his3-Δ200 leu2-3,112 trp-289 ura3-52 hsp104Δ::LEU2 [psi⁻] [pin⁻]</i> (Chernoff et al., 1995)
GT680	<i>MATα ade1-14 his3Δ (or 11,15) lys2 ura3-52 leu-3,112 trp1 sup35Δ::HIS3 [psi⁻] [pin⁻] [URA3 SUP35]</i> (Yury Chernoff, unveröffentlicht)
GT651	<i>MATα ade1-14 his3Δ (or 11,15) lys2 ura3-52 leu-3,112 trp1 sup35Δ::HIS3 [PSI⁺] [PIN⁺] [LEU2 SUP35]</i> (Yury Chernoff, unveröffentlicht)
GT17-SM	<i>MATa ade1-14 his3-Δ200 leu2-3,112 trp-289 ura3-52 SUP35::9Myc-kITRP1 [psi⁻] [pin⁻]</i> (diese Arbeit)

4.1.3. Zelllinien

COS-1	Nierenzellen des afrikanischen grünen Affen; Fibroblasten-ähnlich; Wachstum in adhärennten Monolayern; Träger replikationsdefekter Mutanten von SV-40; Wirtszelle für Vermehrung von rekombinanten SV-Viren (DSMZ)
HEK293	Fibroblasten-ähnliche Zellen, die in adhärennten Monolayern wachsen; humane embryonale Nierenzellen mit fragmentierter DNA des Adenovirus Typ5 (DSMZ)

4.1.4. Plasmidvektoren

4.1.4.1. Bakterielle Expressionsvektoren

pQE-31N

Größe	3,5 kb
Promoter	T5; zwei zusätzliche lac Operatorsequenzen
Fusionsprotein/Tag	6× Histidin
Resistenz	Amp
MCS	<i>Bam</i> HI, <i>Sph</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Not</i> I, <i>Hind</i> III
Eigenschaften	Derivat von pQE32 (Qiagen)
Referenz	Bussow et al., 1998

pGEX-5x-2

Größe	4,9 kb
Promoter	Ptac
Fusionsprotein/Tag	Glutathion S Transferase (GST)
Resistenz	Amp
MCS	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Sma</i> I, <i>Sa</i> II, <i>Xho</i> I, <i>Not</i> I
Eigenschaften	<i>lac</i> ^R -Repressor, Faktor Xa Protease Schnittstelle
Referenz	Amersham Pharmacia

pGEX-6P (2, 3)

Größe	4,9 kb
Promoter	Ptac
Fusionsprotein/Tag	Glutathion S Transferase (GST)
Resistenz	Amp
MCS	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Sma</i> I, <i>Sa</i> II, <i>Xho</i> I, <i>Not</i> I
Eigenschaften	<i>lac</i> ^R -Repressor, <i>PreScission</i> TM Protease Schnittstelle
Referenz	Amersham Pharmacia

pMAL-c2X

Größe	6,7 kb
Promoter	Ptac
Fusionsprotein/Tag	Maltose-bindendes Protein (MBP)
Resistenz	Amp
MCS	<i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI, <i>Xba</i> I, <i>Sa</i> II, <i>Pst</i> I, <i>Hind</i> III
Eigenschaften	Faktor Xa Protease Schnittstelle
Referenz	New England, Biolabs

4.1.4.2. Expressionsvektoren für *S. cerevisiae*pBTM117c

Größe	9,5 kb
Promoter	ADH1
Fusionsprotein/Tag	LexA
Auxotrophiemarker	<i>TRP1</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>Sa</i> II, <i>Not</i> I
Eigenschaften	Y2H-Vektor, 2 μ Plasmid
Referenz	Wanker et al., 1997

pBTM116

Größe	5,6 kb
Promoter	ADH1
Fusionsprotein/Tag	LexA
Auxotrophiemarker	<i>TRP1</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>EcoRI, SmaI, BamHI, Sall, PstI</i>
Eigenschaften	Y2H-Vektor, 2 μ Plasmid
Referenz	Bartel, 1993

pBTM118c

Größe	9,5 kb
Promoter	ADH1
Fusionsprotein/Tag	LexA
Auxotrophiemarker	<i>TRP1</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>Sall, NotI</i>
Eigenschaften	Y2H-Vektor, 2 μ Plasmid
Referenz	Labor Wanker, unveröffentlicht

pACT2

Größe	8,1 kb
Promoter	ADH1
Fusionsprotein/Tag	GAL4-AD
Auxotrophiemarker	<i>LEU2</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>BglII, NcoI, SfiI, SmaI, XmaI, BamHI, EcoRI, SacI, XhoI, BglIII</i>
Eigenschaften	Y2H-Vektor, 2 μ Plasmid
Referenz	Clontech

pGAD10

Größe	6,7 kb
Promoter	ADH1
Fusionsprotein/Tag	GAL4-AD
Auxotrophiemarker	<i>LEU2</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>BglIII, XhoI, BamHI, EcoRI, BglII</i>
Eigenschaften	Y2H-Vektor, 2 μ Plasmid
Referenz	Clontech

pACT4-1b

Größe	7,8 kb
Promoter	ADH1
Fusionsprotein/Tag	GAL4-AD
Auxotrophiemarker	<i>LEU2</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>BglII</i> , <i>Sall</i> , <i>NcoI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>NotI</i> , <i>BglII</i>
Eigenschaften	Y2H-Vektor, 2 μ Plasmid
Referenz	Labor Wanker, unveröffentlicht

pGAD427

Größe	9,1 kb
Promoter	ADH1
Fusionsprotein/Tag	GAL4-AD
Auxotrophiemarker	<i>LEU2</i>
Resistenz	Kan
MCS	<i>EcoRI</i> , <i>Sall</i> , <i>NotI</i>
Eigenschaften	Y2H-Vektor, 2 μ Plasmid
Referenz	Labor Wanker, unveröffentlicht

pYex2T

Größe	7,2 kb
Promoter	CUP1
Fusionsprotein/Tag	6 \times Histidin, HA-Epitop
Auxotrophiemarker	<i>URA3</i> , <i>leu2-d</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>Sall</i> , <i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>
Eigenschaften	2 μ Plasmid; Derivat von pYEXbx (Clontech)
Referenz	Holz et al., 2001

pYex2T/L

Größe	6,1 kb
Promoter	CUP1
Fusionsprotein/Tag	6 \times Histidin, HA-Epitop
Auxotrophiemarker	<i>URA3</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>Sall</i> , <i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>
Eigenschaften	2 μ Plasmid, Derivat von pYex2T
Klonierung	pYex2T wurde mit <i>BstEII</i> und <i>KpnI</i> verdaut; das 6,1 kb Fragment wurde aufgereinigt; die kohäsiven Enden des Fragmentes wurden mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt; das Fragment wurde religiert.
Referenz	diese Arbeit

pGADYex

Größe	6,1 kb
Promoter	CUP1
Fusionsprotein/Tag	6× Histidin, HA-Epitop
Auxotrophiemarker	<i>LEU2</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>Sall</i> , <i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>
Eigenschaften	2 μ Plasmid, Derivat von pGAD424 (Clontech)
Klonierung	Von pYex2T (Holz et al., 2001) wurde mit den Primern P14/P15 ein 0,9 kb großes PCR-Fragment amplifiziert, das für den CUP1-Promotor und den CYC1-Terminator kodiert; das PCR-Fragment wurde mit <i>SphI</i> verdaut, aufgereinigt und in den mit <i>SphI</i> geschnittenen, dephosphorylierten und aufgereinigten Vektor pGAD424 ligiert.
Referenz	diese Arbeit

pGADYEp

Größe	6,2 kb
Promoter	CUP1
Fusionsprotein/Tag	-
Auxotrophiemarker	<i>LEU2</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>EcoRI</i> , <i>BglII</i> , <i>Sall</i>
Eigenschaften	2 μ Plasmid; Derivat von pGAD424 (Clontech)
Klonierung	Von pYEp96 (Ecker et al., 1987) wurde mit den Primern P10/P11 ein 1,0 kb großes PCR-Fragment amplifiziert, das für den CUP1-Promotor und den CYC1-Terminator kodiert; das PCR-Fragment wurde mit <i>SphI</i> verdaut, aufgereinigt und in den mit <i>SphI</i> geschnittenen, dephosphorylierten und aufgereinigten Vektor pGAD424 ligiert.
Referenz	diese Arbeit

pRS316sp

Größe	4,9 kb
Promoter	<i>SUP35</i> Promoter
Fusionsprotein/Tag	-
Auxotrophiemarker	<i>URA3</i>
Resistenz	Amp
MCS	<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i>
Eigenschaften	Centromer Plasmid, Derivat von pRS316-SP35 Δ Bst (Borchsenius et al., 2001)
Klonierung	Das 1,3 kb <i>BamHI/SacI</i> Fragment von pRS316-SP35 Δ Bst wurde durch ein DNA-Fragment, das durch die Hybridisierung von O1 und O2 generiert wurde, ersetzt.
Referenz	diese Arbeit

4.1.4.3. Expressionsvektoren für Säugetierzellen

pTL1-HA (1, 2, 3)

Größe	4,1 kb
Promoter	SV40
Fusionsprotein/Tag	HA-Epitop
Resistenz	Amp
MCS	<i>EcoRI, BamHI, HindIII, XhoI, NotI, SmaI, PstI, SacI, KpnI, BglII</i>
Eigenschaften	Derivat von pSG5 (Stratagene)
Referenz	Sittler et al., 1998

pcDNA1/Amp

Größe	4,0 kb
Promoter	CMV
Fusionsprotein/Tag	-
Resistenz	Amp
MCS	<i>HindIII, BamHI, EcoRI, PstI, EcoRV, NotI, XhoI, SphI, XbaI</i>
Referenz	Invitrogen

pcDNA3.1/V5-HIS

Größe	5,5 kb
Promoter	CMV
Fusionsprotein/Tag	V5-Tag, 6× Histidin
Resistenz	Amp
MCS	<i>HindIII, KpnI, BamHI, EcoRI, EcoRV, NotI, XhoI, XbaI, ApaI, SfuI</i>
Referenz	Invitrogen

4.1.4.4. Plasmide

Tabelle 11: Vorliegende und zur Verfügung gestellte Plasmide

Plasmid	Herkunft	Referenz
pBTM117c-HD1.7	Erich Wanker	Wanker et al., 1997
pBTM116-HDexQ20	Erich Wanker	Sittler et al., 1998
pBTM116-HDexQ53	Erich Wanker	Sittler et al., 1998
pBTM117c-HD170Q23	Erich Wanker	Goehler et al., 2004
pBTM117c-HD-CT	Erich Wanker	Goehler et al., 2004
pBTM117c-SH3GL3	Erich Wanker	Sittler et al., 1998
pBTM117c-HIP1	Erich Wanker	Wanker et al., 1997
pBTM117c-mHap	Erich Wanker	Goehler et al., 2004
pBTM117c-HDd1.0	Stephanie Wälter	Goehler et al., 2004

Fortsetzung Tabelle 11:

pBTM117c-HDd1.3	Stephanie Walter	Goehler et al., 2004
pBTM117c-14-3-3	Stephanie Walter	Goehler et al., 2004
pGEX-6P-1-HIP1	Stephanie Walter	Waelter et al., 2001b
pHD510Q68	Annie Sittler	Goehler et al., 2004
pHD510Q17	Annie Sittler	Goehler et al., 2004
pTL1-HA-1-SH3GL3	Annie Sittler	Sittler et al., 1998
pTL1-HA3-HP28	Annie Sittler	Goehler et al., 2004
pBTM117c-HIP5	Bianca Bauer	Goehler et al., 2004
pGEX-6P-2-HIP5	Bianca Bauer	Goehler et al., 2004
pTL1-HA1-HIP5	Bianca Bauer	Goehler et al., 2004
pTL1-HA1-HBO1	Bianca Bauer	Goehler et al., 2004
pTL1-HA2-PLIP	Bianca Bauer	Goehler et al., 2004
pTL1-HA2-FEZ1	Bianca Bauer	Goehler et al., 2004
pBS-CLH	T. Nagase	Kazusa DNA Research Institute
pBS-mAP2A1	M. Robinson	Robinson, 1987
pBS-mAP2A2	M. Robinson	Robinson, 1987
pBS-HIP2	ATCC	721441
pVA5-1-mp53	Matchmaker II	Clontech
pOTB7-GIT1	RZPD	IMAGp958H111245Q2
pCAG20	Eberhard Scherzinger	Scherzinger et al., 1997
pCAG51	Eberhard Scherzinger	Scherzinger et al., 1997
pCAG122	Eberhard Scherzinger	Scherzinger et al., 1997
pYex2T	Caterina Holz	Holz et al., 2001
pTRP1kl-9xMyc	Sigrid Schaper	unveroffentlicht
pYCH-U2	Yury Chernoff	Bonneaud et al., 1991
pRS316-SP35ΔBst	Yury Chernoff	Borchsenius et al., 2001
pKT218,620	Yury Chernoff	Wegrzyn et al., 2001

4.1.5. Oligonukleotide

Tabelle 12: Oligonukleotide fur Sequenzierungsreaktionen

Primer	5'-Sequenz-3'
BGH-as	TAGAAGGCACAGTCGAGG
BTM-s	TCGTAGATCTTCGTCAGCAG
BTM-as	GGAATTAGCTTGGCTGCAGC
GAD-s	TACCACTACAATGGATGATGT
GAD-as	CGATGATGAAGATACCCAC
QE-s	CGGATAACAATTCACACAG
QE-as	CCAAGCTAGCTTGGATTCTC
GEX-s	TATAGCATGGCCTTTGCAGG
GEX-as	GCTTACAGACAAGCTGTGAC
MAL-s	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC
MAL-as	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
TL1-HA-s	TCTGCTAACCATGTTTCATGCC

Fortsetzung Tabelle 12:

TL1-HA-as	GGACAAACCACAACCTAGAATG
Yex-s	CTGTAACGAATTCATTATGTG
Yex-as	GCATTGGCACTCATGACCTTC
RS316-as	ATGTGCTGCAAGGCGATTAA
Yep96-s	ATCATATAGAAGTCATCG
Yep96-as	TTCATGTTTGACAGCTTATCATCG
T7	TAATACGACTCACTATAGG

Tabelle 13: Oligonukleotide für PCR

Primer	5'-Sequenz-3'
H1	CGAATTCGCGGCCGCGTTCGAC
H2	CCCTTTTTCGCGGCCGCTCAGTATCTACGATTCATAGATCTC
H3	ACGCGTCGACCATGGCCAGATTCTGCC
H4	ATAAGAATGCGGCCGCTAAGTCTCAAGATCATAGAGGTG
H5	ACGCGTCGACCCGACTTCCTGTAGTTATTGG
H6	ATAAGAATGCGGCCGCTATTTGATATAAGAATCAAT
H7	ACGCGTCGACCATGGCCAACATCGCGGTG
H8	ATAAGAATGCGGCCGCTACTCAGAAGCAATTCTG
H9	ACGCGTCGACTGCACAGCCCAGCCTGGGGCC
H10	ATAAGAATGCGGCCGCTAGAACTGCTGGGCCTGCAGCTC
H11	ACGCGTCGACTGCACTTCTTGCACCCGCCTC
H12	ATAAGAATGCGGCCGCTAGAACTGTTCCGACAGCAATTC
H13	GCGTCGACGCCACAGATGGCTGACAGATC
H14	ATAAGAATGCGGCCGCTCACTGCTTCTTCTCTCGGGTGGTG
H15	GCGTCGACGATGTCCCGAAAGGGGCGCG
H16	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGTCACTGTCGGCTCCCACTGCC
H17	ATAAGAATGCGGCCGCTCAACTCTGGCTCCGCAGAGACAG
H18	GCGTCGACGGACCTCGACGACCAACACG
H19	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGACATCCTCTGTGCTGGGAAG
H20	GCGTCGACGTATGAGAACACGCAAAGTGG
H21	CGGAATTCATGTCCCGAAAGGGGCGCG
H22	GGAAGATCTGGTCACTGCTTCTTCTCTCGGG
H23	ACGCGTCGACGTTTCGACGCGTCCGCGCGGAAC
H24	ATAAGAATGCGGCCGCTCATTTCCTCGATGTGTTATTTG
H25	ACGCGTCGACGCTCAAAGAAGGCAGTCCGCTG
H26	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGTCTAGCAGGCTCAGCTTCCA
H27	ACGCGTCGACCAAGACCCGGACCTTTAATAC
H28	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGTCTGGAAGTGCTTGGTGAG
H29	ACGCGTCGACGGCTCCTCGCCGTCCGCGCTGC
H30	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGAACCCAGAGTCTCTCAAGTA
H31	ACGCGTCGACGAATCACATGGCTCCACCTTATCC
H32	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGGATCATTTTGGTTGTCTAT
H33	ACGCGTCGACAGCTGACACCCTGCAAGGCCAC
H34	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGTCTTGTATCACCTGCTCCGC
H35	ACGCGTCGACGGATGAAGAGGAGAGAAACCA

Fortsetzung Tabelle 13:

H36	ATAAGAATGCGGCCGCTCAATCTACAGAGCATTTCCTCAG
P1	CCGCTCGAGCATGTCCGATTCAAACCAAGGCAAC
P2	ATAAGAATGCGGCCG CACTCGGCAATTTTAACAATTTTACC
P3	ATAAGAATGCGGCCGCCATACCTTG AGACTGTGG
P4	ATAAGAATGCGGCCGCATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATG
P5	GGAATTCTACGGCCGGTGGCGGCTGTTGCTG
P6	CCGCTCGAGCATGTTTGGTGGTAAAGATCACG
P7	GTTGGGCAGCTACATGAT
P8	AGAGATCAAGGTACCACAATAGCAATTGGTAAAATTGTTAAAATTGCC- GAGTCCGGTTCTGCTGCTAG
P9	GGTGAAGTTTACCTTGTTTATGGTATATGGTACAAAAAGAACTAAAC- TAATCCTCGAGGCCAGAAGAC
P10	ACATGCATGCATCCCATTACCGACATTTGGGC
P11	ACATGCATGCTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCG
P12	CGGGATCCGTATGAACGACCAAACGCAATTTAC
P13	GCGTCGACTTAATCTAGGTCATCATCAATTTCC
P14	ACATGCATGCTTGCATGTCTTTTGCTGGC
P15	ACATGCATGCGCGGTACCATGAATAG
P16	ACGCGTCGACAATGGATACGGATAAGTTAATCTC
P17	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGTAGCGGTTCTGGTTGCCGT
P18	ATAAGAATGCGGCCGCTGTAGCGGTTCTGGTTGCCGT
P19	GGAATTCATGTCCGATTCAAACCAAGG
P20	CGGGATCCTCACATACCTTGAGACTGTGG
P21	GGAATTCGCTCTGCAGAGAGGATCG
P22	CGGGATCCTTACTCGGCAATTTTAAACAATTTTACC
P23	ATAAGAATGCGGCCGCATGGCGACCCTGGAAAAGCTG

Tabelle 14: Oligonukleotide zur Herstellung von DNA-Fragmenten

Oligonukleotid	5'-Sequenz-3'
O1	GATCCACTAGTCCAGAATTCAGCT
O2	GAATTCTGGACTAGTG

4.1.6. Antikörper

Tabelle 17: Primäre polyklonale Antikörper

Polyklonale Antiseren	Spezies	Hersteller/ Herkunft
anti-CAG53b	Kaninchen	Davies et al., 1997
anti-GAPDH	Kaninchen	Wanker et al., 1997
anti-GIT1	Kaninchen	diese Arbeit
anti-GITz	Ziege	Transduction Laboratories
anti-GST	Ziege	Amersham Pharmacia
anti-HD1	Kaninchen	Scherzinger et al., 1997
anti-Rnq	Kaninchen	Sondheimer and Lindquist, 2000
anti-Sup	Kaninchen	Osherovich and Weissman, 2001

Tabelle 18: Primäre monoklonale Antikörper

Monoklonale Antiseren	Spezies	Hersteller/ Herkunft
anti-HA (12CA5)	Maus	Roche Diagnostics
anti-HA	Maus	Babco
anti-Htt (4C8)	Maus	Chemicon
anti-Htt (2B4)	Maus	Lunkes et al., 2002
anti-Htt (EM48)	Maus	Gutekunst et al., 1999
anti-MBP	Maus	New England Biolabs
anti-Myc	Maus	Roche Diagnostics
anti-RGS-HIS	Maus	Qiagen
anti-V5	Maus	Invitrogen

Tabelle 19: Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Konjugat	Spezies	Hersteller/ Herkunft
anti-Kaninchen IgG	Peroxidase	Ziege	Roche Diagnostics
anti-Kaninchen IgG	Peroxidase	Ziege	Sigma
anti-Kaninchen IgG	Cy3	Esel	Jackson ImmunoResearch
anti-Kaninchen IgG	Alexa 488	Esel	Molecular Probes
anti-Kaninchen IgG	Kolloidales Gold (10 nm)	Ziege	Britisch BioCell
anti-Maus-IgG	Peroxidase	Ziege	Roche Diagnostics
anti-Maus-IgG	Peroxidase	Ziege	Sigma
anti-Maus-IgG	Cy3	Esel	Jackson ImmunoResearch
anti-Ziege	Peroxidase	Maus	Sigma

4.1.7. Enzyme, Proteine und DNA

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Roche Diagnostics
AmpliTaq DNA-Polymerase FS	Perkin Elmer
Faktor Xa	New England Biolabs
Benzonase	Merck
Expand™ Long Template PCR-System	Roche Diagnostics
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs /Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs
Zymolase-20T	Seikagaku Corporation
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Herings Sperma Carrier DNA	BD Biosciences
dNTP-MIX	Fermentas
1 kb DNA-Marker	Invitrogen
Bench Mark, Protein-Größenstandard	Invitrogen

4.1.8. Kits

Bradford Proteinassay Kit	BioRad
MinElute PCR-Purification Kit	Qiagen
Lipofectamin 2000	Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Western Lightning ECL	Perkin Elmer

4.1.9. Computerprogramme

AIDA 1.0	AIDA, Deutschland
Generunner	http://www.generunner.com
Pajek	http://vlado.fmf.uni-lj.si/pub/networks/pajek
VectorNTI	Invitrogen

4.1.10. Datenbanken

Swissprot	http://www.ebi.ac.uk/swissprot/
TrEMBL	http://www.ebi.ac.uk/TrEMBL/
MINT	http://mint.bio.uniroma2.it/mint/
HPRD	http://www.hprd.org/
BIND	http://www.bind.ca/
ExPasy	http://us.expasy.org/tools/

4.1.11. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden im Reinheitsgrad „zur Analyse“ (p.A.) von den Firmen BioRad, Difco, Fluka, Invitrogen, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen. Alle Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert.

4.1.12. Medien und Medienzusätze

4.1.12.1. Medien und Medienzusätze für *E. coli*

Zur Herstellung von Festmedien für Platten wurden dem Flüssigmedium 20 g/l Agar zugesetzt.

LB (Luria-Bertani)-Medium:

10 g/l Bacto Pepton
5 g/l Hefe-Extrakt
10 g/l NaCl
pH 7,2 (mit NaOH)

2YT-Medium:

16 g/l Bacto Trypton
10 g/l Hefe-Extrakt
5 g/l NaCl
pH 7,2 (mit NaOH)

SOB-Medium

20 g/l Bacto Trypton
5 g/l Hefe-Extrakt
0,5 g/l NaCl
2,5 mM KCl
1 mM MgCl₂
vor Benutzung zusetzen:
10 mM MOPS-KOH, pH7,9
20 µg/ml Thiamin

M9-Medium

20 g/l Glucose
2 mM MgSO₄
0,1 mM CaCl₂
1× M9 Aminosäuren
1× M9 Salze

SOC-Medium

4 g/l SOB-Medium
4 g/l Glucose

5× M9 Salze

64 g/l Na₂HPO₄ ×7H₂O
15 g/l KH₂PO₄
2,5 g/l NaCl
5 g/l NH₄Cl

Expressionsmedium

2YT-Medium
20 mM MOPS-KOH, pH 7,9
20 µg/ml Thiamin
2 g/l Glucose

100× M9 Aminosäuren

4 g/l Prolin
0,2 g/l Thiamin
2 g/l Threonin

Tabelle 15: Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml in EtOH	100 mg/l
Kanamycin	30 mg/ml in H ₂ O	15 mg/l
Chloramphenicol	30 mg/ml in EtOH	30 mg/l

4.1.12.2. Medien und Medienzusätze für *S. cerevisiae*

Den SD-, NBG- und GAL-Medien wurden je nach Auxotrophiemarker der Hefestämme die entsprechende Aminosäuren zugesetzt.

YPD-Medium

10 g/l Bacto Hefeextrakt
 20 g/l Bacto-Pepton
 20 g/l Glucose

SD-Medium

6,7 g/l Yeast Nitrogen Base
 20 g/l Glucose
 10 ml 100× As-Stammlösung pro Liter

NBG-Medium

6,7 g/l Yeast Nitrogen Base
 20 g/l Glucose
 5 % Glycerin
 0,5 M Betain
 10 ml 100× As-Stammlösung pro Liter

GAL-Medium

6,7 g/l Yeast Nitrogen Base
 20 g/l Galactose
 10 ml 100× As-Stammlösung pro Liter

Tabelle 16: Aminosäuren

Bezeichnung	100× As-Stammlösung	Endkonzentration im Medium
100× Ade	2 g/l Adenin	20 mg/l
100× His	2 g/l Histidin	20 mg/l
100× Leu	10 g/l Leucin	100 mg/l
100× Lys	2 g/l Lysin	20 mg/l
100× Trp	2 g/l Tryptophan	20 mg/l
100× Ura	2 g/l Uracil	20 mg/l

4.1.12.3. Medien und Medienzusätze für Säugetierzelllinien

Alle Medien und Zusätze zur Kultivierung von Säugetierzellen wurden von Life Technologies bezogen.

Zellkulturmedium

DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium mit Natriumpyruvat und Pyridoxin
10 %	FCS (Fötales Kälberserum)
1 %	Penicillin-Streptomycin-Glutamin (100×)

4.1.13. Standardlösungen

TE

10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
1 mM	EDTA

10× TBS

80 g/l	NaCl
2 g/l	KCl
30 g/l	Tris
pH 7,5	(mit HCl)

10× PBS

80 g/l	NaCl
2 g/l	KCl
14,4 g/l	Na ₂ HPO ₄
2,4 g/l	KH ₂ PO ₄

10× SCE

1M	Sorbitol
0,1 M	Na-Citrat
10 mM	EDTA
pH 5,8	(mit HCl)

4.2. Methoden

Sofern nicht explizit erwähnt, wurden alle experimentellen Techniken gemäß den Ausführungen von Sambrook *et al.* oder von Guthrie und Fink durchgeführt (Sambrook, 1989; Guthrie and Fink, 1991).

4.2.1. Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1. Plasmidpräparation aus *E. coli*

Für sämtliche Plasmidisolierungen aus *E. coli* wurden die Qiagen-Kits „Mini“ und „Maxi“ verwendet. Die Bakterien wurden in einem entsprechenden Volumen 2YT- oder LB-Medium über Nacht bei 37 °C angezogen. Die Aufreinigung der Plasmide wurde nach Vorschrift des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Hierfür wurde das Bakterienpellet durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Plasmid-DNA über Absorptionschromatographie an einer Silicamembran (QIAprep Spin Miniprep Kit) bzw. über Anionenaustauscherchromatographie (QIAprep Plasmid Maxi Kit) gereinigt.

4.2.1.2. Amplifikation von cDNA-Bibliotheken

Zur Amplifikation von kommerziell erhältlichen cDNA-Bibliotheken (Clontech) wurden 1-2 µl Portionen der vom Hersteller bezogenen Glycerin-Gefrierkulturen in 500 µl 2YT-Medium pipettiert. Das Gemisch wurde mit sterilen Glasperlen auf 23×23 cm großen 2YT-Platten mit 50 mg/l Ampicillin plattiert. Nach Inkubation für 36 h bei 30 °C bildeten sich optimalerweise ca. 10⁵ Kolonien auf der Platte. Zur Qualitätskontrolle wurden 48 cDNA-Fragmente mittels Kolonie-PCR amplifiziert und auf einem Agarosegel überprüft. Die restlichen Kolonien wurden mit einem Spatel von der Platte abgekratzt, in 1× PBS resuspendiert und dann bei 6 000 g für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet so oft in 1× PBS gewaschen (2-5 Mal) bis ein klarer Überstand nach Zentrifugation erhalten wurde. Die Plasmid-DNA wurde dann aus

dem Zellpellet mit dem QIAprep Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

4.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration wässriger DNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Nukleinsäuren haben bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum. Eine Absorption (A_{260}) von 1 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ für doppelsträngige DNA. Ist der Quotient $A_{260}/A_{280} = 2$, gilt die Lösung als proteinfrei.

4.2.1.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Restriktionsenzyme wurden in den entsprechenden Reaktionspuffern und bei der erforderlichen Temperatur nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden 1-2 U Restriktionsenzym pro μg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden für 1-20 h inkubiert. Anschließend wurden zur Analyse des Restriktionsverdaus die Proben mit der entsprechenden Menge an 6 \times DNA-Probenpuffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

4.2.1.5. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

In einem horizontalen Agarosegel wurden die DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose-Konzentration variierte je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0,8 und 1,5% (w/v). Die Gele enthielten 50 ng/ml Ethidiumbromid zur Markierung der DNA. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben mit der entsprechenden Menge DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 10 V/cm in 0,5 \times TBE-Puffer durchgeführt. Das „Bio Imaging System“ von SYNGENE wurde zur Geldokumentation verwendet.

10× TBE

108 g/l Tris
55 g/l Borsäure
20 mM EDTA
pH 8,0 (mit HCl)

6× DNA-Probenpuffer

0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol
30 % (v/v) Glycerin

4.2.1.6. Auffüllen von 5'-Überhängen bei DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden

Um 5'-DNA-Überhänge aufzufüllen, die beim Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen entstehen, wurde die T4-DNA-Polymerase benutzt. Ein typischer Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 50 U T4-DNA-Polymerase, 1× Reaktionspuffer (New England Biolabs), 10 mM dNTP's und 1 µg des DNA-Fragments mit 5'-Überhang. Nach 40 min bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz über das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

4.2.1.7. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Um die Religation eines Vektors zu verhindern, wurden die DNA 5'-Phosphatester hydrolysiert. Dafür wurde die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach der Dephosphorylierung wurden die Proben mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) gereinigt.

4.2.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor mit identischen kohäsiven Enden zu ligieren, wurden Fragment und Vektor in einem molaren Verhältnis von ungefähr 3:1 gemischt. Ein typischer Reaktionsansatz (5µl) enthielt 200 U T4-DNA-Ligase, 1× Ligasepuffer und insgesamt 1 µg DNA. Zur Bestimmung der Religationsrate wurde nur Vektor-DNA ligiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C oder bei Raumtemperatur für 45 min. Die Ligationsansätze wurden für 30-60 min auf Dialyse-

filtrern (0,025 µm Porengröße; Millipore) gegen bidestilliertes Wasser dialysiert und anschließend in elektrokompetente *E. coli* Zellen transformiert.

10× Ligasepuffer

500 mM	Tris-HCl, pH 7,5
100 mM	MgCl ₂
100 mM	DTT
10 mM	ATP
250 µg/ml	BSA

4.2.1.9. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten, die anschließend für eine Klonierung eingesetzt wurden, erfolgte mit dem ExpandTM Long Template PCR-System (Roche Diagnostics), das eine Polymerase mit Proofreading-Aktivität enthält. Das PCR-Profil wurde den jeweiligen Bedingungen angepasst (Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments, Annealing-Temperatur der Oligonukleotide).

Bei der *E. coli* Kolonie-PCR wurde eine Einzelkolonie mit einem Zahnstocher auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Anschließend wurden die an demselben Zahnstocher verbliebenen Zellreste in den Reaktionsansatz eingerührt. Der Reaktionsansatz (25 µl) enthielt je 0,2 µM Primer, 0,2 mM dNTP's, 1× PCR-Puffer und 2 U *Taq* DNA-Polymerase (Ampli*Taq* FS ;Perkin Elmer). Das PCR-Programm setzte sich wie folgt zusammen: 5 min bei 96°C und 30 Zyklen von je 30 sek bei 96°C, 30 sek bei 51°C und 2 min bei 72°C.

10× PCR Puffer

500 mM	Tris-HCl, pH 9,0
0,5 M	KCl
1 %	TWEEN
15 mM	MgCl ₂

4.2.1.10. DNA-Fällung

Zur Aufkonzentrierung von DNA wurden DNA-Lösungen mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dafür wurde 1 Volumen DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,6) sowie 2,5 Volumina eiskaltem Ethanol gemischt und 20 min bei -80 °C inkubiert. Die gefällte DNA wurde für 20 min bei 20 000 g pelletiert, mit eiskaltem 70% Ethanol überschichtet und für 20 min bei 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet und in H₂O oder 1× TE aufgenommen.

4.2.1.11. DNA-Sequenzierung

DNA-Fragmente wurden von der Firma AGOWA oder der Service-Abteilung des MPI-MG, Berlin nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977) sequenziert.

4.2.1.12. Klonierungen

Die Mehrzahl der in Tabelle 1 aufgeführten Proteine stammen von der hEX1-cDNA-Bibliothek (Bussow et al., 1998). Die für diese Proteine kodierenden cDNA-Fragmente wurden aus dem pQE-NST-Plasmid (hEX1-cDNA-Bibliothek) mit *SaII* und *NotI* herausgeschnitten und dann in pBTM117c subkloniert.

Die cDNA-Fragmente, die für die in Tabelle 3 (außer GIT1, HIP5, PIASy) und Tabelle 5 aufgeführten Proteine kodieren, wurden über eine PCR mit den Primern H1/H2 amplifiziert. Als Templates dafür dienten die entsprechenden Prey-Plasmide. Das PCR-Produkt wurde mit *SaII* und *NotI* verdaut und anschließend in den mit *SaII* und *NotI* linearisierten Vektor pBTM118c subkloniert.

Tabelle 20: Übersicht der hergestellten Plasmide

Bezeichnung	Herstellung des Inserts	Restriktion Insert	Zielploid	Restriktion Zielploid
pBTM116-HD510Q68	Restriktion, pcDNA1/Amp-HD510Q68	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI	pBTM116	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI
pBTM116-mp53	Restriktion, pVA5-1-mp53	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI	pBTM116	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI
pBTM117c-CLH-17N	PCR; Primer H3/H4; Template: pBS-CLH	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pBTM117c	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pBTM117c-CLH-17c	PCR; Primer H5/H6; Template: pBS-CLH	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pBTM117c	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pBTM117c-HIP2	PCR; Primer H7/H8; Template: pBS-HIP2	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pBTM117c	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pBTM117c-mAP2A1	PCR; Primer H9/H10; Template: pBS-mAP2A1	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pBTM117c	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pBTM117c-mAP2A2	PCR; Primer H11/H12; Template: pBS-mAP2A2	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pBTM117c	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pBTM116-PIASy	Restriktion pACT2-PIASy	<i>Bam</i> HI <i>Xho</i> I	pBTM116	<i>Bam</i> HI <i>Sal</i> I
pBTM117c-GIT1(249-761)	PCR; Primer H13/H14; Template: pACT2-GIT1(249-761)	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pBTM117c	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pACT4-1b-GIT1 (1-761)	PCR; Primer H15/H14; Template: pOTB7-GIT1	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pACT4-1b	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pACT4-1b-GIT1 (1-596)	PCR; Primer H15/H16; Template: pOTB7-GIT1	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pACT4-1b	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pACT4-1b-GIT1 (249-761)	PCR; Primer H13/H14; Template: pACT2-GIT1(249-761)	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pACT4-1b	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pACT4-1b-GIT1 (249-375)	PCR; Primer H13/H17; Template: pACT2-GIT1(249-761)	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pACT4-1b	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pACT4-1b-GIT1 (376-645)	PCR; Primer H18/H19; Template: pACT2-GIT1(249-761)	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pACT4-1b	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pACT4-1b-GIT1 (376-761)	PCR; Primer H18/H14; Template: pACT2-GIT1(249-761)	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pACT4-1b	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pACT4-1b-GIT1 (597-761)	PCR; Primer H20/H14; Template: pACT2-GIT1(249-761)	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pACT4-1b	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pQE32N-HIS-GIT1	Restriktion pACT2-GIT1(249-761)	<i>Xho</i> I <i>Hind</i> III	pQE31N	<i>Xho</i> I <i>Hind</i> III
pGEX-6P2-GIT1	PCR; Primer H13/H14; Template: pACT2-GIT1(249-761)	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pGEX-6P2	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I

Fortsetzung Tabelle 20:

pTL1-HA3-GIT-CT	Restriktion pACT2-GIT1(249-761)	<i>EcoRI</i> <i>SmaI</i>	pTL1-HA3	<i>EcoRI</i> <i>SmaI</i>
pTL1-HA2-GIT1	PCR; Primer H21/H22; Template: pOTB7-GIT1	<i>EcoRI</i> <i>BglII</i>	pTL1-HA2	<i>EcoRI</i> <i>BglII</i>
pcDNA1/Amp-HD169Q68	-	-	pcDNA1/Amp-HD510Q68	<i>XhoI</i>
pV5-HD169Q68	Restriktion pHD169Q68	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>	pcDNA3.1/V5-HIS	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>
pGEX-6P2-CGI-125	PCR; Primer H23/H24; Template: pACT2- CGI-125	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P3-DRP-1	Restriktion pBTM118c-DRP-1	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P3	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P3-FEZ1	Restriktion pACT2-FEZ1	<i>Sall</i> <i>XhoI</i>	pGEX-6P3	<i>Sall</i>
pGEX-6P3-HFZH	Restriktion pBTM118c-HFZH	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P3	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P2-HIP11	Restriktion pBTM118c-HIP11	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P3	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P2-IKAP	PCR; Primer H25/H26; Template: pACT2- IKAP	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P2-Ku70	PCR; Primer H27/H28; Template: pACT2-Ku70	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P2-PFN2	PCR; Primer H29/H30; Template: pACT2- PFN2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-5x2-PIASy	Restriktion pACT2-PIASy	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>	pGEX-5x2	<i>EcoRI</i> <i>XhoI</i>
pGEX-5x2-BARD1	Restriktion pBTM117c-BARD1	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-5x2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P2-HIP15	PCR; Primer H31/H32; Template: pACT2-HIP15	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P2-GADD45G	Restriktion pBTM117c-GADD45G	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P2-SUMO-3	Restriktion pBTM118c-SUMO-3	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P3	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pGEX-6P2-hADA3	Restriktion pBTM117c-hADA3	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pGEX-6P2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA2-CA150	Restriktion pACT2-CA150	<i>Sall</i> <i>XhoI</i>	pTL1-HA2	<i>XhoI</i>
pTL1-HA2-HYPA	Restriktion pACT2-HYPA	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA2	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA2-HFZH	Restriktion pACT2-HFZH	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA2	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>

Fortsetzung Tabelle 20:

pTL1-HA1- IKAP	PCR; Primer H25/H26; Template: pACT2- IKAP	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1- Ku70	PCR; Primer H27/H28; Template: pACT2- Ku70	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA2- PIASy	Restriktion pACT2-PIASy	<i>Sall</i> <i>BglII</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>BglII</i>
pTL1-HA3- HIP1	PCR; Primer H33/H34; Template: pBTM117c-HIP1	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA3	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1- PFN2	PCR; Primer H29/H30; Template: pACT2-PFN2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA2- DRP-1	Restriktion pACT2-DRP-1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA2	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1- CGI-125	PCR; Primer H23/H24; Template: pACT2-CGI-125	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1- HIP11	Restriktion pACT2-HIP11	<i>XhoI</i> <i>Sall</i>	pTL1-HA2	<i>XhoI</i> <i>Sall</i>
pTL1-HA2- HIP13	Restriktion pACT2-HIP13	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA2	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1- HIP15	PCR; Primer H31/H32; Template: pACT2- HIP15	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1- HIP16	PCR; Primer H35/H36; Template: pACT2- HIP16	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1- BAIP3	Restriktion pBTM117c-BAIP3	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1 GADD45G	Restriktion pBTM117c-GADD45G	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>
pTL1-HA1- BARD1	Restriktion pBTM117c-BARD1	<i>Sall</i> <i>NotI</i>	pTL1-HA1	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pYex2T- SUP35	PCR; Primer P1/P2; Template: pYCH-U2	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>	pYex2T	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pYex2T- PrD	PCR; Primer P1/P3; Template: pYCH-U2	<i>XhoI</i> <i>NotI</i>	pYex2T	<i>Sall</i> <i>NotI</i>
pYex2T- CAG52	PCR; Primer P23/P5 Template: pCAG51	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T- CAG89	PCR; Primer P23/P5 Template: pCAG122	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T- SUP-CAG19	PCR; Primer P4/P5; Template: pCAG20	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T- SUP35	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T- SUP-CAG54	PCR; Primer P4/P5; Template: pCAG51	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T- SUP35	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>

Fortsetzung Tabelle 20:

pYex2T-SUP-CAG92	PCR; Primer P4/P5; Template: pCAG122	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T-SUP35	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T-PrD-CAG19	PCR; Primer P4/P5; Template: pCAG20	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T-PrD	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T-PrD-CAG54	PCR; Primer P4/P5; Template: pCAG51	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T-PrD	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T-PrD-CAG92	PCR; Primer P4/P5 Template: pCAG122	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T-PrD	<i>NotI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-SUP35	Restriktion pYex2T-SUP35	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-PrD	Restriktion pYex2T-PrD	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-CAG52	Restriktion pYex2T-CAG52	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-CAG90	Restriktion pYex2T-CAG89	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-SUP-CAG19	Restriktion pYex2T-SUP-CAG19	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-SUP-CAG54	Restriktion pYex2T-SUP-CAG54	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-SUP-CAG92	Restriktion pYex2T-SUP-CAG92	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-PrD-CAG19	Restriktion pYex2T-PrD-CAG19	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-PrD-CAG54	Restriktion pYex2T-PrD-CAG54	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pYex2T/L-PrD-CAG92	Restriktion pYex2T-PrD-CAG92	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pYex2T/L	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pGADYex-SUP35	Restriktion pYex2T-SUP35	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pGADYex	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pGADYex-CAG52	Restriktion pYex2T-CAG52	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pGADYex	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pGADYex-CAG90	Restriktion pYex2T-CAG89	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pGADYex	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pGADYex-Sup-CAG54	Restriktion pYex2T-SUP-CAG54	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pGADYex	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pGADYex-Sup-CAG54	Restriktion pYex2T-SUP-CAG92	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pGADYex	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pRS316sp-SUP35	Restriktion pYex2T-SUP35	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pRS316sp	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pRS316sp-SUP-CAG54	Restriktion pYex2T-SUP-CAG54	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pRS316sp	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pRS316sp-SUP-CAG92	Restriktion pYex2T-SUP-CAG92	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pRS316sp	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pRS316sp-PrD	Restriktion pYex2T-PrD	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pRS316sp	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>
pRS316sp-PrD-CAG54	Restriktion pYex2T-PrD-CAG54	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	pRS316sp	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>

Fortsetzung Tabelle 20:

pRS316sp-PrD-CAG92	Restriktion pYex2T-PrD-CAG92	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI	pRS316sp	<i>Bam</i> HI <i>Eco</i> RI
pGADYep-HSP104	PCR; Primer P12/P13 Template: chromosomal DNA	<i>Bam</i> HI <i>Sal</i> I	pGADYep	<i>Bgl</i> II <i>Sal</i> I
pYex2T/L-RNQ1	PCR; Primer P16/P17 Template: chromosomal DNA	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pYex2T/L	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pYex2T/L-CAG19*	PCR; Primer P4/P5 Template: pCAG20	<i>Not</i> I <i>Eco</i> RI	pYex2T/L	<i>Not</i> I <i>Eco</i> RI
pYex2T/L-CAG54*	PCR; Primer P4/P5 Template: pCAG51	<i>Not</i> I <i>Eco</i> RI	pYex2T/L	<i>Not</i> I <i>Eco</i> RI
pYex2T/L-CAG91*	PCR; Primer P4/P5 Template: pCAG122	<i>Not</i> I <i>Eco</i> RI	pYex2T/L	<i>Not</i> I <i>Eco</i> RI
pYex2T/L-RNQ-CAG19	PCR; Primer P16/P18 Template: pYex2T/L-RNQ1	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pYex2T/L-CAG19*	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pYex2T/L-RNQ-CAG54	PCR; Primer P16/P18 Template: pYex2T/L-RNQ1	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pYex2T/L-CAG54*	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pYex2T/L-RNQ-CAG91	PCR; Primer P16/P18 Template: pYex2T/L-RNQ1	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I	pYex2T/L-CAG91*	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pMAL-c2X-PrD	PCR; Primer P19/P20 Template: pYex2T-SUP35	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI
pMAL-c2X-HIS-PrD	PCR; Primer P21/P20 Template: pYex2T-SUP35	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI
pMAL-c2X-HIS-SUP35	PCR; Primer P21/P22 Template: pYex2T-SUP35	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI
pYex2T-SUPCT	PCR; Primer P6/P2 Template: pYex2T-SUP35	<i>Xho</i> I <i>Not</i> I	pYex2T/L	<i>Sal</i> I <i>Not</i> I
pMAL-c2X-HIS-SUPCT	PCR; Primer P21/P22 Template: pYex2T-SUPCT	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI
pMAL-c2X-PrD-CAG19	PCR; Primer P19/P7 Template: pYex2T-PrD-CAG19	<i>Eco</i> RI	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI
pMAL-c2X-PrD-CAG55	PCR; Primer P19/P7 Template: pYex2T-PrD-CAG54	<i>Eco</i> RI	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI
pMAL-c2X-PrD-CAG89	PCR; Primer P19/P7 Template: pYex2T-PrD-CAG92	<i>Eco</i> RI	pMAL-c2X	<i>Eco</i> RI

4.2.2. Mikrobiologische Methoden

4.2.2.1. Herstellung von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

E. coli Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase werden allgemein durch Waschen in eiskaltem 10 %igen Glycerin elektrokompetent gemacht. Dabei werden die bei der Elektroporation störenden Elektrolyte aus dem Medium entfernt.

Eine Einzelkolonie wurde in 10 ml SOB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C angezogen. Für die Hauptkultur wurde 1 l SOB-Medium mit der Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 im Schüttler bei 37°C angezogen, für 30 min auf Eis inkubiert und dann bei 4°C und 4 000 g für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen und schließlich in 2 ml eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung der elektrokompetenten Zellen wurde eine Transformation mit einem Kontrollplasmid (pUC19) durchgeführt. Die dabei ermittelte Effizienz sollte bei 10⁸-10⁹ Transformanten/µg Plasmid-DNA liegen.

4.2.2.2. Transformation durch Elektroporation

Durch einen kurzen Impuls von hoher Feldstärke werden die Zellwände elektrokompetenter *E. coli* Zellen durchlässig gemacht, so dass die Zellen in der Lage sind, hochmolekulare DNA-Moleküle aufzunehmen.

Für die Transformation wurden 30 µl elektrokompetente Zellen mit maximal 5 µl DNA-Lösung gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm, BioRad) überführt. Mit einem Genepulser (BioRad) wurden die Zellen bei 200 Ω, 25 mF und 1,68 kV elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium resuspendiert und für 60 min bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Transformationsansätze wurden dann auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.2.3. Lagerung transformierter Bakterien

Nach der Transformation wurden einzelne Kolonien von der selektiven LB-Agarplatte mit einer Impföse in 2 ml selektives LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden im Verhältnis 1:1 mit 50 %igem sterilen Glycerin vermischt und bei -80 °C gelagert.

4.2.3. Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentration in Lösungen wurde mit der Bradford-Methode bestimmt. Hierbei wird die Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue G250“ gemessen. Bindet dieser an Proteine, so wird sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschoben. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist daher ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Standardverdünnungsreihe mit BSA verwendet.

4.2.3.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Molekularmasse wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Benutzt wird dafür das anionische Detergenz SDS, das die Dissoziation der Proteine in die einzelnen Polypeptid-Untereinheiten bewirkt. SDS lagert sich dabei gleichmäßig entlang der Proteinketten an. Dadurch werden die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Masse unterschiedlich stark negativ geladen und können anschließend im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese wurde nach den Angaben nach Sambrook *et al.* durchgeführt (Sambrook, 1989). Entsprechend der Größe des zu untersuchenden Proteins wurden 8, 10 oder 12 %ige Trenngele benutzt. Das Sammelgel war in allen Fällen 4 %ig. Die Proben wurden in

einem entsprechenden Volumen 4× SDS-Probenpuffer und für 5 min bei 99 °C erhitzt.

4× SDS-Probenpuffer

0,2 M Tris-HCl (pH 7,5)
 8 % (v/v) SDS
 40 % (v/v) Glycerin
 0,1 % Bromphenolblau
 0,1 M DTT (vor Benutzung zusetzen)

10× SDS-Puffer

30 g/l Tris
 144 g/l Glycin

SDS-Laufpuffer

1× SDS-Puffer
 0,1 % SDS

4.2.3.3. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit „Coomassie Brilliant Blue G250“ angefärbt. Dafür wurde das Proteingel für 5 min in Fixierlösung inkubiert, womit dem Gel Wasser entzogen wird. Das Gel wurde dann für 30 min in der Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung entfärbt.

Coomassie-Färbelösung

50 % Methanol
 9,2 % Eisessig
 0,175% Coomassie Brilliant Blue G250

Fixierlösung

45 % Methanol
 7 % Eisessig

Entfärbelösung

20 % Methanol
 7 % Eisessig

4.2.3.4. Westernblotting

Nach Auftrennung im SDS-Gel wurden die Proteine durch Elektroblootting auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, auf der die immobilisierten Proteine mit

geeigneten Antikörpern nachgewiesen werden können. Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese blasenfrei auf eine mit Westernblot-Puffer befeuchtete Nitrozellulosemembran aufgelegt. Ober- und unterhalb vom Gel und der Membran lagen mehrere mit Westernblot-Puffer getränkte Whatman 3MM Filter. Der Transfer erfolgte in einer Semidry-Blotapparatur (BioRad) in Richtung der positiven Elektrode bei 20 V für 90 min. Zur Immundetektion wurde die Membran nach dem Transfer für 30 min in Blockierlösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in Blockierlösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Die Membran wurde dreimal 5 min in 1× TBS mit 0,05% Tween 20 und dreimal 5 min in 1× TBS gewaschen. Schließlich wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper in Blockierlösung für 1 h inkubiert und dann erneut gewaschen. Die Detektion der immunmarkierten Proteinbanden erfolgte durch die Chemilumineszenzreaktion (Western Lightning™ Perkin Elmer) nach Angabe des Herstellers. Zum Nachweis der Lumineszenzsignale wurden Röntgenfilme (Kodak) auf die Membran aufgelegt und je nach Signalstärke von 1 sek bis zu 1 h exponiert. Anschließend wurden die Röntgenfilme mit dem Curix 60 (AGFA) entwickelt und getrocknet.

Westernblot-Puffer

1× SDS-Puffer
10 % Methanol

CAPS-Westernblot-Puffer

50 mM CAPS, pH 10,0
10 % Methanol

Blockierlösung

1× TBS
5 % Magermilchpulver

4.2.3.5. Expression von rekombinanten Fusionsproteinen durch IPTG-Induktion

Proteine, die mit einem sogenannten Affinitätstag wie z.B. dem HIS₆-Tag, der Glutathion-S-Transferase (GST) oder dem Maltose-bindenden Protein (MBP) fusioniert sind, können über diesen mit einer entsprechenden Matrix aufgereinigt werden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Expressionsvektoren steht das jeweilige Fusionsprotein unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *tac*-Promoters.

HIS₆-markierte Proteine wurden in SCS1-pSE11 Zellen und GST- oder MBP-Fusionsproteine in BL21-RP Zellen exprimiert. Zur Herstellung eines Fusionsproteins wurde eine Einzelkolonie mit dem entsprechenden Expressionsplasmid in 20 ml selektives LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit der Vorkultur wurde am nächsten Tag 1 l Expressionsmedium (vgl. Seite 130) angeimpft und die Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde dann 10 min auf Eis gestellt und mit IPTG (0,3 mM) versetzt. Anschließend wurden die Bakterien über Nacht bei 23 °C kultiviert, um die Wachstumsgeschwindigkeit zu reduzieren und dadurch die Löslichkeit der rekombinanten Proteine zu erhöhen (Owen et al., 2000). Am nächsten Tag wurden die Zellen 20 min bei 4 000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 50 ml 1× PBS gewaschen und entweder sofort aufgeschlossen oder bei -80 °C gelagert.

4.2.3.6. Reinigung von HIS₆-markierten Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

HIS₆-markierte Proteine, die sich z.B. mit Hilfe von pQE-Plasmiden herstellen lassen, können über Nickel-Nitriloessigsäure (Ni-NTA) Agarosebeads affinitätsgereinigt werden. Die Ni-NTA Matrix (Qiagen) wurde vor Gebrauch mit Puffer A gewaschen, abzentrifugiert und in einem gleichen Volumen Puffer A resuspendiert.

Das HIS₆-GIT1 Fusionsprotein, das zur Herstellung eines Antikörpers eingesetzt werden sollte, wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Dafür wurden die pelletierten Bakterienzellen in 15 ml Puffer A resuspendiert und 1 h bei RT auf dem Magnetrührer gemischt. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 10 000 g für 10 min entfernt. Der Überstand wurde mit 3,5 ml Ni-NTA Agarose (1:1 Suspension) versetzt und für 1 h bei 4 °C auf dem Rotationsschüttler inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend in eine 5 ml Säule (Qiagen) gegossen und zweimal mit 10 ml Puffer B, viermal mit 10 ml Puffer C und zweimal mit 1,5 ml Puffer D gewaschen. Das gebundene Protein wurde in 1,5 ml Fraktionen mit insgesamt 6 ml Puffer E eluiert. Anschließend wurden die Proteinfractionen zweimal für 4 h gegen 6 M Urea dialysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ca. 1,5 µg aufgereinigtes Protein durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Das

restliche Protein wurde aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80 °C gelagert.

<u>Puffer A</u>		<u>Puffer B</u>		<u>Puffer C</u>	
100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄
10 mM	Tris	10 mM	Tris	10 mM	Tris
6 M	GdnHCl	8 M	Urea	8 M	Urea
pH 8,0	(mit NaOH)	pH 8,0	(mit NaOH)	pH 6,3	(mit HCl)
<u>Puffer D</u>		<u>Puffer E</u>			
100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄		
10 mM	Tris	10 mM	Tris		
8 M	Urea	8 M	Urea		
pH 5,9	(mit HCl)	65 mM	Imidazol		
		pH 6,3	(mit HCl)		

4.2.3.7. Reinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine, die von pGEX-Plasmiden kodiert werden, können an immobilisiertem Glutathion (Sigma) affinitätsgereinigt werden. Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurden 200 mg Glutathion-Agarosebeads in 50 ml H₂O für 4 h bei RT gequollen. Die Glutathion-Agarose wurde bei 1 000 g für 5 min abzentrifugiert. Ein Volumen Agarosebeads wurden in 2 Volumen 1 M NaCl aufgenommen und zur Lagerung bei 4 °C mit 0,01 % NaN₃ versetzt. Vor Gebrauch wurden die Agarosebeads in GST-B Puffer gewaschen, abzentrifugiert und in einem gleichen Volumen GST-B Puffer aufgenommen.

Die pelletierten Bakterien wurden in 20 ml GST-B Puffer mit Zusatz von 5 mM MgCl₂, 800 µl 25× Complete Protease Inhibitorstammlösung (Roche Diagnostics) und 100 U Benzonase resuspendiert und nach Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym für 30-45 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaliger Ultraschallbehandlung für 45 sek auf Eis wurde das Lysat mit 0,1 % Triton X-100 versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 30 000 g und bei 4 °C für 30 min geklärt. Der Überstand wurde mit 3 ml Glutathion-Agarosebeads (1:1 Suspension) versetzt und für 1 h bei 4°C rotiert. Dieses Gemisch wurde für *in vitro* Bindungsexperimente verwendet. Falls das GST-Protein von den Beads eluiert werden sollte, wurde das Gemisch auf eine 5 ml Säule (Qiagen) gegossen und zweimal mit 30 ml GST-B Puffer mit 0,1%

Triton X-100 und einmal mit GST-B Puffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 6 ml GST-B Puffer, der 720 µg/ml Glutathion (reduziert) enthielt, in 1 ml Fraktionen eluiert. Die Proteinkonzentration der Eluate wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Je 1,5 µg Gesamtprotein der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die reinsten Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen GST-Dialysepuffer dialysiert. Die gereinigten Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert.

GST-B Puffer

50 mM	Hepes-NaOH, pH 7,4
150 mM	NaCl
10 %	Glycerin
1 %	Nonidet-P40
20 mM	NaF
1 mM	DTT
5 mM	EDTA

GST-Dialysepuffer

20 mM	Tris-HCl, pH 8,0
150 mM	NaCl
0,1 mM	EDTA
8,7 % (v/v)	Glycerin

4.2.3.8. Reinigung von MBP-Fusionsproteinen

MBP-Fusionsproteine, die von pMAL-Plasmiden kodiert werden, können an immobilisiertem MBP affinitätsgereinigt werden. Für die Reinigung von MBP-Fusionsproteinen wurden MBP-Agarosebeads (New England Biolabs) verwendet. Diese wurden vor Gebrauch mit MBP-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und in einem gleichen Volumen MBP-Puffer aufgenommen.

Die pelletierten Bakterien wurden in 40 ml MBP-Puffer mit Zusatz von 5 mM MgCl₂, 1,6 ml 25× Complete Protease Inhibitorstammlösung (Roche Diagnostics) und 100 U Benzonase resuspendiert und nach Zugabe von 0,5 mg/ml Lysozym 30-45 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaliger Ultraschallbehandlung für 45 sek auf Eis wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10 000 g pelletiert. Der Überstand wurde mit 3 ml Agarosebeads (1:1 Suspension) versetzt und für 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine 10 ml Säule (MoBiTec) gegeben und dreimal mit 10 ml MBP-Puffer gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit

10 mM Maltose in 1,5 ml Fraktionen eluiert und über Nacht gegen MBP-Dialysepuffer dialysiert. Die gereinigten Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert.

MBP-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,4
200 mM NaCl
1 mM EDTA

MBP-Dialysepuffer

20 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM NaCl
8.7 % (v/v) Glycerin

4.2.3.9. *In vitro* Bindungsexperimente

Mit Hilfe von *in vitro* Bindungsexperimenten lassen sich Protein-Interaktionen, die mit dem Y2H-System identifiziert wurden, bestätigen. Hierfür wurde ein Partnerprotein als GST-Fusionsprotein in *E. coli* und das andere in Säugetierzellen (COS-1 Zellen) exprimiert. Die an Agarose gebundenen GST-Proteine (vgl. Seite 148) wurden zweimal mit 30 ml GST-B Puffer gewaschen und dann in 5 ml GST-B Puffer aufgenommen. Die COS-1 Zellen wurden lysiert (vgl. Seite 165) und die Konzentration des Ly-sats wurde auf 1 µg/µl Gesamtprotein eingestellt. Pro Ansatz wurden 150 µl GST-Agarosebeads mit gebundenem Protein, 350 µl Zellkulturlysat und 500 µl GST-B Puffer vermischt und für 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Puffer I, zweimal mit Puffer II und einmal mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen. Die pelletierten Agarosebeads wurden in 40 µl 1× SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 99 °C erhitzt, wodurch die gebundenen Proteine von den Beads abgelöst wurden. Die eluierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

Puffer I

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
0,2 % Triton X-100
2 mM EDTA

Puffer II

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
500 mM NaCl
0,2 % Triton X-100
2 mM EDTA

4.2.3.10. Immunpräzipitation aus Zellkulturlysat

Mit einer Immunpräzipitation wird überprüft, ob zwei Proteine in der Zelle miteinander interagieren. Dabei wird ein Protein spezifisch mit einem Antikörper aus dem Zellysate gezogen. Mit Hilfe von SDS-PAGE und Westernblotting wird dann überprüft, ob ein zweites Protein copräzipitiert wurde. Für Immunpräzipitationsexperimente wurden zunächst 150 mg ProteinA-Sepharose, an die Immunglobuline selektiv binden, in 30 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) suspendiert und für 1 h bei RT gequollen. Nach Zentrifugation bei 1 000 g für 1 min wurden die ProteinA-Beads mit Lysepuffer (vgl. Seite 166) gewaschen und in 1 ml desselben Puffers aufgenommen. COS-1 Zellen wurden mit Plasmiden, die für die zu untersuchenden Proteinpärchen kodieren, cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert (vgl. Seite 165) und die Konzentration der Lysate wurde auf 1 µg/µl Gesamtprotein eingestellt. Pro Ansatz wurden 500 µl Lysat und 1,5 µl Antiserum verwendet. Die Ansätze wurden für 3 h bei 4 °C auf dem Rotationsrad inkubiert, anschließend mit 30 µl ProteinA-Beads versetzt und für eine weitere Stunde bei 4 °C rotiert. Darauf folgend wurden die Proben dreimal mit Puffer I, zweimal mit Puffer II und einmal mit 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen (vgl. Seite 150). Die pelletierten ProteinA-Beads wurden in 40 µl 1× SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 99 °C erhitzt, wobei die gebundenen Antikörper und somit auch die präzipitierten Proteine von den Beads abgelöst wurden. Die eluierten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

4.2.3.11. Immunpräzipitation aus Extrakten von humanem Gehirn

Mit Hilfe einer Immunpräzipitation aus Gewebe kann geprüft werden, ob zwei Proteine auch unter physiologischen Bedingungen miteinander interagieren. Extrakte von tiefgefrorenem Kortexgewebe wurden hergestellt (vgl. Seite 167) und auf eine Gesamtproteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt. 500 µl Extrakt wurden mit 1, 3 oder 5 µl Antiserum versetzt und über Nacht bei 4 °C rotiert. Zwischenzeitlich wurden magnetische Beads (Dyna), die mit sekundären Antikörpern gekoppelt sind und somit eine Präzipitation von primären Antikörpern ermöglichen, in Extrakt-Puffer (vgl. Seite 167) gewaschen und in diesen Puffer im Ausgangsvolumen aufgenommen. Pro

Immunpräzipitationsansatz wurden 25 µl magnetische Beads zugegeben. Jeder Ansatz wurde dann für weitere 2 h bei 4 °C auf dem Rotationsrad inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit Extrakt-Puffer gewaschen. Die magnetischen Beads wurden schließlich in 40 µl 4x SDS-Ladepuffer aufgenommen und 5 min bei 99 °C erhitzt. Dabei wurden die primären Antikörper und die daran gebundenen Proteine von den Beads gelöst. Das Eluat wurde über SDS-PAGE und Westernblotting analysiert.

4.2.3.12. Filtertest

Zur Detektion von SDS-stabilen Aggregaten wurde eine Filtrationsmethode eingesetzt (Wanker et al., 1999). Bei dieser Methode werden SDS-unlösliche Proteinaggregate auf einer Zelluloseacetatmembran mit einer Porengröße von 0,2 µm (Schleicher & Schüll) zurückgehalten, während SDS-lösliche Proteine die Membran passieren. Aufgearbeitete Proben von verschiedenen Aggregationsexperimenten wurden mit Hilfe einer BRL Dot-Blot Apparatur gefiltert. Dafür wurden zwei Whatman 3 MM Filterpapiere und die Zelluloseacetatmembran mit 0,1 % SDS getränkt und dann so in die Apparatur eingespannt, dass die Membran luftblasenfrei auf den Filterpapieren auflag. Die vorbereiteten Proben (200 µl) wurden auf die Membran pipettiert und unter Wasserstrahlpumpen-Vakuum durch die Membran filtriert. Nach zweimaligem Waschen mit je 200 µl 0,1 % SDS wurde die Membran aus der Apparatur genommen, dreimal für 5 min in 1× PBS geschwenkt und wie bei der Immundetektion eines Westernblottings prozessiert.

4.2.3.13. Aggregationsexperimente mit aufgereinigten rekombinanten Proteinen

Zur Untersuchung der Aggregation von PrD oder PrD-Htt Fusionsproteinen wurden die bei -80 °C gelagerten aufgereinigten MBP-Fusionsproteine (vgl. Seite 149) bei 50 000 g für 20 min zentrifugiert, um bereits aggregiertes Protein aus der Lösung zu entfernen. Zur Initiation der Aggregation wurde das MBP durch einen Faktor Xa

Verdau abgespalten. Pro Ansatz (25 μ l) wurden 0,4 mg Protein mit 4 ng Faktor Xa bei 37 °C gespalten. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben in flüssigem N₂ eingefroren. Für den Filtertest wurden die noch gefrorenen Proben mit je 1 Volumen Denaturierungspuffer versetzt und sofort für 5 min bei 99 °C im Heizblock inkubiert.

Zur Untersuchung der Coaggregation von PrD oder PrD-Htt Fusionsproteinen mit Sup35 bzw. SupC wurden die bei -80 °C gelagerten Proteine (vgl. Seite 149) aufgetaut und für 20 min bei 50 000 g zentrifugiert, um bereits aggregiertes Protein aus der Lösung zu entfernen. Zur Initiation der Aggregation, wurde der MBP-Anteil von den PrD oder PrD-Htt Fusionsproteinen durch die Protease Faktor Xa abgespalten. Pro Ansatz (25 μ l) wurden 0,4 mg PrD oder PrD-Htt Fusionsproteine, 4 ng Faktor Xa und 0,2 mg Sup35 bzw. SupC verwendet. Nach der Inkubation bei 37 °C wurden die Proben mit flüssigem N₂ schockgefrostet. Für den Filtertest wurden die noch gefrorenen Proben mit 1 Volumen Denaturierungspuffer versetzt und anschließend für 5 min bei 99 °C erhitzt.

Denaturierungspuffer

4 % (w/v) SDS
100 mM DTT

4.2.3.14. Aggregationsexperimente mit Lysaten von Säugetierzellen

Um zu untersuchen, ob in HEK293-Zellen, die HD169Q68 und ein Netzwerkprotein coexprimieren, SDS-stabile Aggregate gebildet werden, wurden die Zellen 48 h nach der Transfektion lysiert (vgl. Seite 165). Das Zelllysat wurde mit 1 Volumen Denaturierungspuffer versetzt und der Ansatz für 5 min bei 99 °C erhitzt. Anschließend wurde die Probe für den Filtertest verwendet.

4.2.4. Hefespezifische genetische und molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendete Temperatur zur Kultivierung von Hefezellen betrug stets 30 °C.

4.2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Eine Hefekolonie mit dem zu isolierenden Plasmid wurde in 2 ml Selektivmedium über Nacht angezogen. Die Kultur wurde bei 10 000 g für 3 min zentrifugiert, das Pellet in 100 µl Puffer 1 resuspendiert und bei 25 °C für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Puffer 2 wurde das Gemisch 10 min bei RT inkubiert, dann mit 500 µl Puffer 3 neutralisiert und 10 min auf Eis gestellt. Das Lysat wurde bei 10 000 g für 5 min zentrifugiert und der resultierende Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch die Zugabe von 525 µl Isopropanol wurde die Plasmid-DNA gefällt und anschließend für 30 min bei 10 000 g pelletiert. Nach dem Waschen in 70 % Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 10 µl H₂O aufgenommen. 5 µl davon wurden für die Elektroporation von *E. coli* Zellen eingesetzt.

<u>Puffer 1</u>		<u>Puffer 2</u>		<u>Puffer 3</u>	
1 mg/ml	Zymolyase-20T	125 mM	NaOH	0,9 M	Na-Acetat, pH 5,0
1×	SCE-Puffer, pH 5,8	0,5 %	SDS	0,5 M	NaCl
10 mM	DTT				

4.2.4.2. Isolierung von chromosomaler DNA aus Hefe

5 ml YPD-Medium wurden mit einer Hefekolonie inokuliert und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden bei 3 000 g für 5 min abzentrifugiert und das Pellet wurde mit 10 mM EDTA (pH 8,0) gewaschen. Nach Resuspendierung des Pellets in 500 µl Puffer 1 wurde der Ansatz für 30 min bei 25 °C inkubiert und anschließend bei 1 000 g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl Puffer 2 gelöst und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl 5 M Kaliumacetat wurde das Zelllysate für 30 min auf Eis gestellt und dann bei 10 000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Die so gefällte chromosomale DNA wurde bei 10 000 g für 15 min pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl H₂O

aufgenommen. Für eine PCR wurden 0,5 µl der isolierten chromosomalen DNA als Template eingesetzt.

4.2.4.3. Transformation von Plasmid-DNA in Hefezellen mittels der Lithium-acetat-Methode

Der zu transformierende Hefestamm wurde über Nacht in 2 ml YPD-Medium angezogen und dann in 28 ml YPD-Medium überimpft. Die Kultur wurde solange inkubiert bis sie eine OD_{600} von 0,6-0,8 erreicht hatte. Nach Zentrifugation bei 3 000 g für 5 min wurde das Pellet mit 10 ml 1× TE gewaschen, in 1 ml Mix I resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Pro Transformationsansatz wurden 40 µl Hefezellen, 0,5 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA, 5 µg Heringssperma-DNA und 230 µl Mix II eingesetzt. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl DMSO und einem Hitzeschock für 7 min bei 42 °C wurden die Transformationsansätze auf Selektivmedium plattiert und für 3-5 Tage inkubiert.

Mix I

0,1M LiAc
1 M Sorbitol
0,5× TE

Mix II

0,1 M LiAc
40 % PEG 3350
1× TE

4.2.4.4. Y2H-cDNA-Bank Screen

15 ml einer Übernachtskultur von Hefezellen, die ein nicht autoaktivierendes Bait-Protein exprimierten, wurden in 100 ml YPD-Medium überimpft. Die Kultur wurde bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,8$ angezogen. Nach Zentrifugation bei 3 000 g für 5 min wurde das Zellpellet mit 1× TE gewaschen, in 2 ml Mix I (siehe oben) resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden zu diesen Zellen 5 mg Heringssperma-DNA, 100 µg cDNA-Bibliothek und 7 ml Mix II (vgl. Seite 154) pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30 °C wurden 880 µl DMSO zugegeben und die Zellen für 14 min bei 42 °C einem Hitzeschock unterworfen. Der Transformationsansatz wurde bei 1 500 g für 15 min zentrifugiert. 7 ml des Überstandes

wurden verworfen und das Zellpellet in ca. 1 ml Restüberstand resuspendiert. Je 500 µl des Transformationsansatzes wurden dann mit Hilfe von sterilen Glasperlen auf 23×23 cm große Agarplatten mit SD4-Medium (SD-Medium ohne Aminosäuren) verteilt. Nach 5-10 Tagen Inkubation wurden die Hefeklone in flüssiges SD2-Medium (SD-Medium mit Zusatz von Histidin und Uracil) eingerührt und dann auf SD2- sowie auf SD4-Medium mit und ohne Membran gestempelt. Von den Hefeklonen, die erneut Reporterogenaktivität aufwiesen, wurden die Plasmide isoliert (vgl. Seite 153). Um das AD-Plasmid zu amplifizieren, wurde die aus den Hefezellen isolierte Plasmid-DNA in *E. coli* HB101 transformiert. Die Transformanten wurden auf M9-Medium selektiert. HB101-Zellen können auf M9-Medium nur dann wachsen, wenn sie ein AD-Plasmid mit *LEU2*-Markergen besitzen. Nach Isolation wurde das AD-Plasmid mittels Restriktionsanalysen überprüft und gegebenenfalls zur Identifizierung des cDNA-Fragments ansequenziert.

4.2.4.5. Y2H Array-Screen

Zur Herstellung einer Prey-Matrix für einen Array-Screen wurden 60 Prey-Plasmide, die für die 51 identifizierten Prey-Proteine und für 9 Kontrollproteine kodieren, in den Hefestamm L40ccMAT α transformiert (vgl. Seite 154). Die resultierenden Klone wurden in flüssigem SD2-Medium angezogen. Die Kulturen wurden dann in einer Mikrotiterplatte (MTP) angeordnet, wodurch die Prey-Matrix entstand. Um ein Bait-Protein gegen die Prey-Matrix zu testen, wurden 5 µl Hefekultur von jedem Klon der Prey-Matrix in eine MTP, die mit 150 µl YPD-Medium befüllt war, überimpft. Diese MTP wurde dann für 24 h inkubiert. Gleichzeitig wurden die L40ccMAT α Zellen, die das zu untersuchende Bait-Protein exprimieren, in 30 ml SD-Medium mit Histidin, Uracil und Leucin im Schüttler angezogen. Die MTP wurde dann bei 4 000 g für 1 min zentrifugiert und der resultierende Überstand abgeschlagen. Zu den in der MTP pelletierten Hefezellen wurden je 200 µl L40ccMAT α Zellen gegeben. Nach Zentrifugation bei 4 000 g für 1 min entstand ein Mischpellet aus L40ccMAT α und L40ccMAT α Zellen, das in 30 µl YPD-Medium resuspendiert wurde. Das Gemisch wurde auf YPD-Agar mit 30 mg/l Chloramphenicol gestempelt und für 36 h inkubiert. Auf YPD-Medium verschmelzen („maten“) die haploiden L40ccMAT α und

L40ccMATa Zellen zu diploiden Zellen. Das Antibiotikum dient zur Reduktion von bakteriellen Kontaminationen. Nach der Inkubation wurden die diploiden Zellen mit einem Stempel in flüssiges SD2-Medium eingerührt und dann auf SD2- oder SD4-Medium (vgl. Seite 155) mit und ohne Membran gestempelt. Die Platten wurden 3-6 Tage inkubiert. Nach Prozessierung der Membranen mit dem β -GAL Test (vgl. Seite 156) wurde die Reporteraktivität der einzelnen Klone ausgewertet.

4.2.4.6. β -GAL Test

Für den β -GAL Test wurden die zu untersuchenden Hefezellen auf Membranen (Micro Separations Inc.), die auf SD2- oder SD4-Medium aufgelegt wurden, gestempelt und für 3-6 Tage inkubiert. Die Membranen wurden mit den auf ihnen gewachsenen Hefekolonien für 2 min in flüssiges N_2 getaucht und dann bei RT aufgetaut. Nach Wiederholung des Vorgangs wurden die Membranen 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 2-8 h färbten sich Hefezellen, die die vom Reporter gen *lacZ* kodierte β -Galaktosidase exprimierten, blau. Bei dieser Reaktion wird das farblose X-GAL (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) von der β -Galaktosidase unter anderem in das blaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo gespalten.

X-GAL Lösung

156 μ l	X-GAL
100 μ l	DTT (1M)
10 ml	Z-Puffer

Z-Puffer

10,67 g/l	$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$
5,5 g/l	$NaH_2PO_4 \times H_2O$
0,75 g/l	KCl
0,246 g/l	$MgSO_4 \times 7 H_2O$

X-GAL

20 mg/ml X-GAL in Dimethylformamid

4.2.4.7. Lagerung von Hefezellen

Zur Absicherung von Hefezellen wurden diese in NBG-Medium über Nacht angezogen und anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.2.4.8. Aufbereitung von Hefezelllysaten für den Filtertest

Um zu prüfen, ob SDS-resistente Proteinaggregate in Hefezellen gebildet werden, wurden die Hefezelllysate mit dem Filtertest untersucht. Für jeden Ansatz wurden 5×10^8 Hefezellen bei $3\ 000\ \text{g}$ für $5\ \text{min}$ abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit $1 \times$ PBS gewaschen und dann in $200\ \mu\text{l H}_2\text{O}$ und $200\ \mu\text{l}$ Denaturierungspuffer (vgl. Seite 152) resuspendiert. Nach Zugabe von $1/3$ Volumen Glasperlen wurden die Zellen für $1\ \text{min}$ auf dem Vortex gemischt, in flüssigem N_2 schockgefrostet und bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Probe bei $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ für $5\ \text{min}$ erhitzt und bei $3\ 000\ \text{g}$ für $5\ \text{min}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und $30\ \text{min}$ in Gegenwart von $5\ \text{mM MgCl}_2$ und $100\ \text{U}$ Benzonase auf Eis gestellt. Schließlich wurde die Probe erneut $5\ \text{min}$ auf $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und dann im Filtertest eingesetzt.

4.2.4.9. Bestimmung der Konversionsraten von Hefeprioren

Das Verhältnis der Anzahl von Zellen, die auf SD-Ade Medium wachsen, zu der Anzahl von plattierten Zellen, spiegelt die Konversionsrate bei der *de novo* Entstehung von $[\text{PSI}^+]$ wieder. Zur Bestimmung der Konversionsraten der zu untersuchenden Zellen wurden je drei Hefeklone in selektivem Medium über Nacht angezogen. Nach Bestimmung der Zelldichte wurde die Kultur auf eine OD_{600} von 1 eingestellt. $350\ \mu\text{l}$ der Kultur wurden mit $650\ \mu\text{l}$ SD-Medium gemischt. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe ($1:10$, $1:100$, $1:1000$, $1:10\ 000$) hergestellt. Um die Anzahl der zu Ade^+ konvertierten Zellen zu ermitteln, wurden $100\ \mu\text{l}$ der Ausgangskultur und jeder Verdünnung auf SD-Ade Medium mit Glaskugeln plattiert. Zur Bestimmung der Anzahl der plattierten Zellen wurden $100\ \mu\text{l}$ der $1:10\ 000$ Verdünnung auf SD+Ade Medium mit Glaskugeln verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgte je nach Experiment

für 5-18 Tage. Anschließend wurden jene Kolonien auf den Platten ausgezählt, die 25-500 Klone aufwiesen. Dieses Experiment wurde mindestens noch zweimal mit unabhängigen Klonen wiederholt. Anschließend wurde die Konversionsrate (Anzahl der Ade⁺-Zellen / Anzahl der plattierten Zellen) aus den Mittelwerten der einzelnen Experimente errechnet.

4.2.4.10. Bestimmung der Löslichkeit von Hefeprioren durch Zentrifugation

Die Löslichkeit von Hefeprioren kann durch Zentrifugationsexperimente bestimmt werden (DePace et al., 1998). Eine über Nacht angezogene Vorkultur (3 ml) wurde in 50 ml Selektivmedium überführt und für 24 h inkubiert. Pro Ansatz wurden $2,5 \times 10^8$ Zellen geerntet und mit $1 \times$ PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet dreimal in flüssigem N₂ schockgefroren und bei 50° C aufgetaut. Nach Zugabe von 1 Volumen Glasperlen und 150 µl UZ-Puffer wurden die Proben für 3 min auf dem Vortex gemischt und anschließend bei 3 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein für die Ultrazentrifugation geeignetes Eppendorf Gefäß pipettiert. Der Ansatz wurde dann für 30 min bei 50 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet in 50 µl UZ-Puffer aufgenommen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 25 µg Proteinextrakt der Pellet- und Überstandfraktion mit SDS-Ladepuffer versetzt. Nach Erhitzen der Proben auf 99° C wurden diese über SDS-PAGE und Westernblotting analysiert.

UZ-Puffer

25 mM	Tris-HCl, pH 7,5
50 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
1 mM	EDTA
5 %	Glycerin
1 %	Tween 20
1 mM	PMSF (vor Benutzung zusetzen)
1×	Protease-Inhibitoren (vor Benutzung zusetzen)

4.2.4.11. Herstellung des Hefestammes GT17-SM

Der Hefestamm GT17-SM ist ein Derivat des Hefestammes GT17, bei dem endogenes Sup35 C-terminal mit einem Myc-Epitop fusioniert wurde. Zur Herstellung dieses Stammes wurde eine Tagging-Methode benutzt, die auf der homologen Rekombination eines PCR-Produkts ins Hefegenom basiert (Knop et al., 1999). Als Selektionsmarker wurde das *TRP1* von *Kluyveromyces lactis* benutzt, weil es nur eine geringe Homologie zu dem *TRP1* von *S. cerevisiae* besitzt und GT17-Zellen kein funktionelles *TRP1* synthetisieren können. Für eine homologe Rekombination werden am 5'- und 3'-Ende eines PCR-Fragments ca. 45 Basen benötigt, die identisch mit der Sequenz der chromosomalen Integrationsstelle sind. Mit den Primern P8/P9 wurde vom Plasmid pTRP1kl-9×Myc ein 1,5 kb großes PCR-Fragment amplifiziert, das für 9 aufeinanderfolgende Myc-Epitope, für *TRP1* von *Kluyveromyces lactis* und für die zur homologen Rekombination erforderlichen Sequenzen kodiert. Nach Aufreinigung wurde das PCR-Fragment in GT17-Zellen transformiert (vgl. Seite 154) und der Transformationsansatz auf SD-Medium ohne Tryptophan plattiert. Nach 5-tägiger Inkubation wurden 8 Klone auf Myc-markiertes endogenes Sup35 getestet. Dafür wurden die Klone in 50 ml flüssigem SD-Medium über Nacht angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3 000 g 5 min) und in 10 mM EDTA gewaschen. Das Pellet wurde dreimal in flüssigem N₂ eingefroren und bei 50 °C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl UZ-Puffer resuspendiert, mit einem Volumen Glasperlen versetzt und 3 min auf dem Vortex gemischt. Nach Zentrifugation (3 000 g 5 min) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Mit SDS-PAGE und Westernblotting wurde der Überstand analysiert. Für weiterführende Experimente wurde ein Klon ausgewählt, dessen endogenes Sup35 sowohl mit dem anti-Myc als auch mit dem anti-Sup Antikörper detektiert werden konnte.

4.2.4.12. Immunpräzipitation von endogenem Sup35 aus Hefezellen

Die zu untersuchenden GT17-SM Hefezellen wurden für 2 Tage in 30 ml Selektivmedium angezogen. 170 ml YPD-Medium wurden mit der Vorkultur beimpft und im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden bei 3 000 g für 5 min pelletiert, dann in 50 ml mit 10 mM EDTA (pH 8.0) gewaschen und in 15 ml

Puffer HP für 30 min bei 25 °C protoplastiert. Nach Zentrifugation bei 500 g für 10 min wurden die Protoplasten für 5 min in eiskaltem Puffer L lysiert. Die Zelltrümmer wurden bei 3 000 g für 5 min entfernt und die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Für einen Immunpräzipitationsansatz wurden 500 µg Gesamtprotein und 3 µl Myc-Antikörperlösung verwendet. Die Probe wurde für 4 h bei 4 °C rotiert. Zwischenzeitlich wurden magnetische Beads (Dynal), die mit sekundären Antikörpern gekoppelt sind und somit eine Präzipitation von primären Antikörpern ermöglichen, im Puffer L gewaschen. Zu dem Immunpräzipitationsansatz wurden 25 µl magnetische Beads gegeben. Dieser wurde dann für 2 h bei 4 °C auf dem Rotationsrad inkubiert. Die magnetischen Beads wurden sechsmal in Puffer L gewaschen und schließlich in 40 µl 4 x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Durch Inkubation für 5 min bei 99 °C wurden die primären Antikörper und die daran gebundenen Proteine von den Beads gelöst. Das Eluat wurde über SDS-PAGE und Westernblotting analysiert.

Puffer HP

1 M	Sorbitol
0,1 M	EDTA
50 mM	DTT
20 mg/ml	Zymolyase 100 T
pH 7,5	(mit NaOH)

Puffer L

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
5 mM	MgCl ₂
10 mM	KCl
0,1 mM	EDTA
1 mM	DTT
2 mM	PMSF
100 µg/ml	RNAse A
0,2 %	Triton
1×	Proteaseinhibitoren

4.2.4.13. Präparation von Hefezellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden Hefezellen wurden über Nacht in 2 ml Selektivmedium angezogen. 48 ml YPD-Medium wurden mit der Vorkultur beimpft und im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. 6,25 ml der Kultur wurden mit 5 ml einer 10 %igen Formaldehyd Lösung gemischt. Während der Inkubation für 1 h bei RT wurden die Zellen fixiert. Nach Zentrifugation bei 3 000 g für 5 min wurde das Pellet zweimal in Puffer S gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden in 500 µl Puffer S aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µl β-Mercaptoethanol und 20 µg Zymolase wurden die Zellen für

30-40 min bei 25 °C inkubiert. Durch leichtes Schütteln wurden die Zellen resuspendiert. 15 µl der Zellen wurden auf einen mit Poly-D-Lysin beschichteten Objektträger gegeben. Nach 5 min wurde die Flüssigkeit vorsichtig abpipettiert. Der Objektträger wurde für 6 min in -20 °C kaltem Methanol und dann für 30 sek in -20 °C kaltem Aceton inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger bei RT getrocknet. Die Zellen auf dem Objektträger wurden zehnmal mit PB-Puffer gewaschen. 15 µl des in PB-Puffer verdünnten primären Antikörpers (CAG53b 1:100) wurden auf die Zellen pipettiert. Der Objektträger wurde dann für 1h in einer feuchten Kammer platziert. Nach zehnmalem Waschen mit PB-Puffer wurden 15 µl des in PB-Puffer verdünnten sekundären Antikörpers (CY3 1:500) auf die Zellen gegeben. Alle folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt, um ein Ausbleichen des Präparats zu verhindern. Der Objektträger wurde für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung (0,2 ng/ml) für 20 sek angefärbt. Nachdem der Objektträger getrocknet war, wurde ein Deckgläschen mit ca. 5 µl Montagemedium auf den Zellen fixiert. Zur Visualisierung der Präparate wurde ein Axioplan2 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) benutzt.

Puffer S

1,2 M Sorbitol
100 mM KH₂PO₄
pH 7,5

PB-Puffer

1× PBS
1 mg/ml BSA

Montagemedium

5 % Propylgallat
1:4 v/v PBS:Glycerin

4.2.4.14. Präparation von Hefezellen für die Elektronenmikroskopie

Die zu untersuchenden Hefezellen wurden über Nacht in 2 ml Selektivmedium angezogen. 48 ml YPD-Medium wurden mit der Vorkultur beimpft und im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Das Medium wurde mit 50 ml EM-Puffer, der 0,5% Glutaraldehyd und 4% Formaldehyd enthält, gemischt und für 5 min inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3 000 g für 5 min wurden die Zellen in 10 ml EM-Puffer mit 0,25 % Glutaraldehyd und 2 % Formaldehyd resuspendiert und für 30 min bei 4 °C fixiert

(Mulholland et al., 1994). Nach zweimaligem Waschen in H₂O wurde das Zellpellet in 5 ml 0,5 % Natriumperjodat resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal in H₂O gewaschen, in 5 ml 50 mM NH₄Cl aufgenommen, für 15 min bei RT inkubiert und dann erneut mit H₂O gewaschen. Zur Entwässerung wurden die Zellen anschließend für je 10 min in 25, 50, 75, 90 und 96 % Ethanol und dreimal für 30 min in 100 % Ethanol bei RT inkubiert. Zu den Zellen in 100 % Ethanol wurden für 1 h 33 % LR White (London Resin Company) zugesetzt. Die Zellen wurden dann über Nacht in 50 % LR White bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie noch zweimal für 3 h mit 100 % LR White versetzt. Vor der Übertragung in Gelatinekapseln wurde das LR White, in das die Zellen final aufgenommen wurden, mit N₂ begast, da Sauerstoff die Polymerisation hemmt. Die Polymerisation der Probe in den Gelatine-kapseln erfolgte für 3 Tage bei 45 °C. Ultradünnschnitte von 50 bis 60 nm wurden mit einem Ultracut E Ultramikrotom (Leica Microsystems) durchgeführt.

Für die Immunmarkierung der eingebetteten Zellen wurden die Ultradünnschnitte auf Nickel-Trägernetzchen übertragen. Die einzelnen Inkubationsschritte erfolgten auf einem Tropfen (ca. 50 µl) der entsprechenden Lösungen, wobei die Netzchen mit den Schnitten auf der Oberfläche schwammen. Zuerst wurden die Präparate 10 min in IL-Puffer und dann 10 min in IL-Puffer mit 3 mg/ml BSA-c inkubiert (Aurion, Wageningen). Die Präparate wurden mit anti-Htt-Antikörper CAG53b, der 1:200 in IL-Puffer verdünnt wurde, versetzt. Nach 2 h wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch viermaliges Waschen für je 10 min auf einem Tropfen IL-Puffer entfernt. Die Goldmarkierung mit dem 1:100 in IL-Puffer verdünnten sekundären Antikörper (konjugiert mit 10 nm Gold, British BioCell) erfolgte für 2 h. Nach intensivem Waschen mit IL-Puffer wurden die Präparate jeweils 30 sek mit 3 % Bleicitrat, 2% Uranylacetat, 3 % Bleicitrat nachkontrastiert. Die Proben wurden mit einem Philips CM100 EM (FEI Company) visualisiert.

EM-Puffer

1 M Sorbitol
40 mM KH₂PO₄
pH 6,7

IL-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl

4.2.4.15. GdnHCl-Behandlung zur Eliminierung von Hefeprionen

In der Hefe kann ein unlösliches Prionenprotein in seine lösliche äquivalente Form durch mehrfache Inkubation der Zellen auf Medium mit millimolaren Mengen an Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) überführt werden (Tuite et al., 1981). Für eine Behandlung mit GdnHCl wurden YPD-Platten mit 5 mM GdnHCl hergestellt. Mehrere Hefeklone mit Prionenphänotyp wurden auf diesen Platten ausgestrichen und für 2 Tage inkubiert. Die Hefezellen wurden mehrfach (3-5 Mal) auf GdnHCl-YPD Medium passagiert. Anschließend wurden die Zellen parallel auf SD-Medium mit und ohne Adenin gestempelt, um den Ade-Phänotyp zu bestimmen.

4.2.4.16. Eliminierung von Plasmiden mit URA3-Marker aus Hefezelle

Das *URA3* Gen kodiert für die Orotidylat-Decarboxylase, ein Enzym das für die Biosynthese von Uracil erforderlich ist. In Hefezellen wird 5-FOA („5-Fluoroorotic acid“) durch das *URA3*-Genprodukt in das toxische Fluoruracil umgesetzt. Auf 5-FOA haltigem Medium können demnach nur Hefen wachsen, die keine funktionelle Orotidylat-Decarboxylase besitzen (Boeke et al., 1984). Somit können Plasmide mit *URA3*-Marker aus Hefezellen durch 5-FOA Selektion eliminiert werden. Es wurden ca. 100 000 Hefezellen auf SD-Medium mit Uracil und 500 mg/l 5-FOA plattiert. Um die 5-FOA Selektion zu prüfen, wurden nach 4-tägiger Inkubation mehrere Klone parallel auf SD-Medium mit und ohne Uracil ausgestrichen. Für weitere Versuche wurden dann Zellen verwendet, die auf SD+Ura, nicht aber auf SD-Ura Medium wuchsen.

4.2.5. Zellbiologische Methoden

4.2.5.1. Auftauen von kryokonservierten Säugetierzellen

COS-1 oder HEK293-Zellen, die in Kryoröhrchen in flüssigem N₂ lagerten, wurden im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Noch leicht vereist, wurden die Zellen in 10 ml vorgewärmtes Zellmedium transferiert, das dann in eine Kulturflasche mit 75 cm² (T75) überführt wurde. Die Zellen wurde dann bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach An-

heftung der Zellen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die DMSO-Reste des Gefriermediums zu entfernen.

4.2.5.2. Kultivierung und Lagerung von Säugetierzellen

COS1- oder HEK293-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FBS, 100 iE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden geteilt, wenn sie zu ca. 80 % konfluent waren. Dafür wurden die Zellen mit sterilem 1× PBS gewaschen und mit 0,25 % (w/v) Trypsin/EDTA bei 37 °C für 5 min inkubiert. Die Trypsinbehandlung führt zur Ablösung der Zellen von der Oberfläche. Die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und dann in einer Verdünnung von 1:20 erneut ausgesät. Für eine längerfristige Lagerung wurden die Zellen in einer T75 Zellkulturflasche bis zu 80 % Konfluenz kultiviert. Nach Ablösen mit Trypsin wurden die Zellen bei 1 000 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium mit 20 % FBS aufgenommen. Anschließend wurde tropfenweise DMSO bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben. Die in Kryoröhrchen abgefüllten Zellen wurden langsam in einem Behälter mit Isopropanol bei -80 °C eingefroren und danach in einem Tank mit flüssigem N₂ gelagert.

4.2.5.3. Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion von COS-1 Säugerzellen wurde mittels der Calciumphosphat-Präzipitation durchgeführt (Graham and van der Eb, 1973). Diese Methode beruht auf der Reaktion zwischen Calciumchlorid und Natriumphosphat, bei der ein wasserunlösliches Calciumphosphat-Präzipitat gebildet wird, an das Plasmid-DNA bindet. Dieses Präzipitat wird von Zellen aufgenommen. Intrazellulär wird die Plasmid-DNA dann freigesetzt und transkribiert. Die Zellen wurden 5 h vor der Transfektion in einer T75 Zellkulturflasche mit einer Konfluenz von 30 % ausgesät. Für die Herstellung des Präzipitats wurden 6,65 µg Plasmid-DNA mit 20 µg Heringssperma DNA (Clontech) und 550 µl 1× TE vermischt. Anschließend wurden 80 µl sterilfiltriertes 2 M CaCl₂ und 640 µl 2× HBS zugegeben. Die Transfektionsansätze wurden vor-

sichtig mit der Pipette gemischt, exakt 30 min bei RT inkubiert und dann auf die Zellen geträufelt. Die Ansätze wurden für ca. 15 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 1× PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. 40-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst, pelletiert und einmal in 1× PBS gewaschen. Die Pellets wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

2× HBS

280 mM NaCl
50 mM Hepes
1,5 mM Na₂HP0₄ × 2 H₂O
pH 7,1 (mit NaOH)
sterilfiltrieren

4.2.5.4. Herstellung von Zelllysaten

Die geernteten und gewaschenen Zellen wurden mit 1 ml Lysepuffer versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 3 000 g für 5 min wurde die Proteinkonzentration des Lysats bestimmt.

Lysepuffer

50 mM Hepes-NaOH, pH 7,4
150 mM NaCl
10 % Glycerin
1 % Nonidet-P40
20 mM NaF
1,5 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA
0,1 µl/ml Benzonase (vor Benutzung zusetzen)
1 mM DTT (vor Benutzung zusetzen)
1 mM PMSF (vor Benutzung zusetzen)
1× Protease-Inhibitor (vor Benutzung zusetzen)

4.2.5.5. Präparation von COS-1 Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei Immunfluoreszenz-Analysen werden innerhalb der Zelle Proteine mit spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops werden diese Proteine dann visualisiert.

COS-1 Zellen wurden auf 6 Deckgläschen, die auf dem Boden einer Petrischale (\varnothing 10 cm) platziert waren, mit 30-50 % Konfluenz ausgesät. Die Transfektion der Zellen (vgl. Seite 164) erfolgte nach deren Anheftung. Nach 48 h wurden die Deckgläschen mit den angehefteten Zellen mit 1× PBS gewaschen und in 4 % Paraformaldehyd für 5 min bei RT inkubiert. Die so fixierten Zellen wurden dreimal für 5 min in 1× PBS mit 0,1 % Triton X-100 gewaschen. Bis zur Immunmarkierung wurden die Zellen in 1× PBS mit 0,05 % NaN_3 bei 4 °C gelagert.

Für die Immunmarkierung wurden die Zellpräparate zunächst 30 min mit einer 3 %igen BSA Lösung in PBS in einer feuchten Kammer blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit in 0,3 % BSA verdünnten primären Antikörpern (Verdünnung je nach Antikörper 1:100 bis 1:1000) für 1 h inkubiert und dann für jeweils 10 min zweimal in 1× PBS mit 0,1 % Triton X-100 und einmal in 1× PBS gewaschen. Nach Inkubation für 1 h mit den entsprechenden sekundären, mit CY3- oder Alexa 488-konjugierten Antikörpern, wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben gewaschen. Anschließend wurden die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung (0,2 ng/ml) für 20 sek angefärbt. Nach Waschen der Zellen in 1× PBS wurden die Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger mit Montagemedium (vgl. Seite 161) gelegt. Zur Visualisierung der Präparate wurde ein Axioplan2 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) benutzt.

4.2.5.6. Herstellung von Extrakten aus humanem Gehirn

Aus einem tiefgefrorenen humanen Kortex wurde ca. 1 g Gewebe herausgeschnitten und zusammen mit 1 ml Extrakt-Puffer in einen Potter-Elvehjem Homogenisator gegeben. Die Homogenisation der Probe wurde auf Eis durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 15 000 g für 30 min wurde der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration des Extraktes bestimmt.

Extrakt-Puffer

50 mM	Hepes-KOH, pH7,4
150 mM	NaCl
10 %	Glycerin
1 %	NP-40
1 mM	EGTA
20 mM	NaF (vor Benutzung zusetzen)
1,5 mM	MgCl ₂ (vor Benutzung zusetzen)
1 mM	PMSF (vor Benutzung zusetzen)

4.2.6. Immunologische Methoden

4.2.6.1. Herstellung von Antikörpern

Als Antigen wurde das unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigte HIS₆-GIT1 Protein benutzt (vgl. Seite 147). Ca. 150 µg Proteine wurden mit 1 ml 0,9 % NaCl und 2 ml Freuds komplettem Adjuvans versetzt. Das Gemisch wurde durch Auf- und Abziehen in einer 5 ml Spritze emulgiert und dann subkutan in 8 Portionen ins Kaninchen injiziert. Weitere Injektionen folgten nach 21, 33 und 45 Tagen. Dem Kaninchen wurden sieben Tage nach der letzten Injektion ca. 20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Das Blut wurde für 6 h bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 3 000 g für 10 min zentrifugiert. Der sedimentierte Blutkuchen wurde verworfen und der Überstand ein weiteres Mal zentrifugiert (3 000 g, 10 min). Das so aufbereitete Antiserum wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.2.6.2. Affinitätsreinigung von Antikörpern

Das GIT1-Antiserum wurde affinitätsgereinigt. Dazu wurde das HIS₆-GIT1, das auch als Antigen verwendet wurde, exprimiert. Nach Aufschluss der Zellen wurde das HIS₆-GIT1 Protein an 2 ml Ni-NTA Agarose gebunden (vgl. Seite 147). Das Gemisch wurde auf eine Säule gegeben, mit jeweils 20 ml Puffer B, C und D gewaschen und anschließend mit Puffer F equilibriert. Der Auslauf der Säule wurde verschlossen. 2 ml GIT1-Antiserum wurden auf das Agarosebett in der Säule pipettiert. Nach Inkubation für 1 h bei 4 °C wurde die Agarose mit 20 ml Puffer F und G gewaschen. Die

Säule wurde erneut verschlossen und 2 ml 4 M MgCl₂ (pH 6,0) wurden auf das Agarosebett gegeben. Nach 15 min wurde der gebundene Antikörper dann nach weiterer Zugabe von 4 M MgCl₂ (pH 6,0) in 500 µl Fraktionen eluiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Anschließend wurden die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen vereinigt und dann zweimal für 4 h gegen 1× PBS dialysiert. Die aufgereinigten Antikörper wurden mit 2 mg/ml BSA versetzt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

Puffer F

50 mM Tris-HCl, pH 7,4
150 mM NaCl

Puffer G

50 mM Tris-HCl, pH 7,4
2 M NaCl