

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen

#### 2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3. *Escherichia coli*-Stämme.

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
DB3.1	Hanahan, 1983; Bernard und Couturier, 1992	F <sup>-</sup> <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm <sup>r</sup> ) <i>xyl5 Δleu mtl1</i>	Plasmidvermehrung
DH5α	Hanahan, 1983; Raleigh <i>et al.</i> , 1989	F <sup>-</sup> <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> ,m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Plasmidvermehrung und Klonierung
HB101	Jessee, 1984; King und Blakesley, 1986	F <sup>-</sup> <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> - m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>recA13 leu ara-14 proA2lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20</i> (Sm <sup>r</sup> ) <i>supE44 λ</i>	Plasmidvermehrung und Klonierung
DH10B	Calvin und Hanawalt, 1988; Raleigh, 1988	F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ rpsL nupG</i>	Plasmidvermehrung und Klonierung
Xll Blue	Stratagene	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F <sup>-</sup> <i>proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> )]	Mutagenese
BI21 (DE) pLysS	Grunberg-Manago, 1999; Lopez <i>et al.</i> , 1999	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm rne131</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )	Proteinexpression
BI21 Star (DE3) pLysS	Kido <i>et al.</i> , 1996 ; Lopez <i>et al.</i> , 1999	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm rne131</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> )	Proteinexpression
Rosetta2	Kane, 1995; Kurland und Gallant, 1996	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i>	Proteinexpression

#### 2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm

Der in dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stamm ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4. *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm.

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
L40ccua	Goehler <i>et al.</i> , 2004	<i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2::(lexAop)<sub>4</sub>-HIS3 URA3::(lexAop)<sub>8</sub>-lacZ ADE2::(lexAop)<sub>8</sub>-URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2</i>	Yeast Two-Hybrid

#### 2.1.3 Pflanzen

Der in dieser Arbeit verwendete *Arabidopsis thaliana* Ökotyp ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5. *Arabidopsis thaliana* Ökotyp.

Ökotyp	Referenz	Verwendung
Col-0 (Columbia)	NASC – The European Arabidopsis Stock Centre	RNA- und Proteinextraktion

## 2.2 Nährmedien

### 2.2.1 Nährmedien für *Escherichia coli*

Für die Anzucht von *E. coli* wurde in dieser Arbeit LB-Medium (10 g/L Trypton + 5 g/L Hefeextrakt + 5 g/L Natriumchlorid) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Für die Herstellung von Festmedien wurden 15 g Agar auf 1 L LB-Medium zugesetzt und für 30 min autoklaviert. Zur Selektion auf die rekombinanten Plasmide wurde LB-Medium mit Antibiotika gemäß Tabelle 6 versetzt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass nur Zellen, die ein Resistenz vermittelndes Plasmid enthalten, wachsen können. Manche Antibiotika, z.B. Ampicillin, können von Bakterien-Enzymen abgebaut werden, so dass der Selektionsdruck während der Anzucht kontinuierlich abnimmt. Statt Ampicillin wurde in solchen Fällen Carbenicillin, ein Strukturanalog von Ampicillin, eingesetzt. Die Antibiotika-Stammlösungen wurden über einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert und bei -20 °C für mehrere Monate gelagert.

**Tabelle 6. Antibiotika-Stammlösungen.**

Substanz	Konzentration im Medium	Stammlösung	Lösungsmittel
Ampicillin	50 µg/mL	50 mg/mL	H <sub>2</sub> O
Carbenicillin	50 µg/mL	50 mg/mL	H <sub>2</sub> O
Chloramphenicol	25 µg/mL	25 mg/mL	Ethanol
Kanamycin	100 µg/mL	100 mg/mL	H <sub>2</sub> O
Tetracyclin	10 µg/mL	10 mg/mL	Ethanol
Zeocin	50 µg/mL	50 mg/mL	H <sub>2</sub> O

### 2.2.2 Nährmedien für *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Anzucht von *S. cerevisiae* wurden in dieser Arbeit das Vollmedium YPD (10 g/L Hefeextrakt + 20 g/L Pepton + 20 g/L Glukose, pH 5,8) und das Minimalmedium SD (6,7 g/L YNB + 20 g/L Glukose, pH 5,8) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Glukose wurde separat als 40 %ige Stammlösung autoklaviert und anschließend den Medien zugesetzt. Für die Herstellung von Festmedien wurden 10 g Agar auf 1 L YPD- bzw. SD-Medium zugesetzt und für 30 min autoklaviert. Zur Selektion auf die rekombinanten Plasmide wurde SD-Medium mit Aminosäuren gemäß Tabelle 7 versetzt. Die Aminosäure-Stammlösungen wurden über einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert und bei RT unter Lichtausschluss für mehrere Monate gelagert. Für Autoaktivierungstests wurde dem SD-Medium 3-Amino-1, 2, 4-triazol (3-AT) in verschiedenen Konzentrationen zugefügt.

**Tabelle 7. Aminosäure-Stammlösungen.**

Substanz	Konzentration im Medium	Stammlösung	Lösungsmittel
Leucin	100 mg/L	10 mg/mL	H <sub>2</sub> O
Tryptophan	20 mg/L	2 mg/mL	H <sub>2</sub> O
Uracil (pH 8,5; NaOH)	20 mg/L	2 mg/mL	H <sub>2</sub> O
Histidin	20 mg/L	2 mg/mL	H <sub>2</sub> O

### 2.2.3 Nährmedien für *Arabidopsis thaliana*

Für die Anzucht von *A. thaliana* in Sterilkultur wurde in dieser Arbeit MS-Medium (4,2 g/L MS-Salze + 0,5 g/L MES + 30 g/L Saccharose, pH 5,7) verwendet (Murashige und Skoog, 1962).

### 2.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 8 aufgeführt. Modifizierte Plasmide sind in Tabelle 8 ohne Referenzen aufgeführt. Plasmidkarten sind entweder dem Begleitheft des Herstellers (Invitrogen und Clontech) oder dem Anhang (Kapitel 11.1) zu entnehmen.

Tabelle 8. Plasmide.

Plasmid-bezeichnung	Firma / Referenz	Beschreibung	Antibiotikresistenz / Hefemarker
pENTR1A	Invitrogen™	Gateway <i>Entry</i> -Vektor, Klonierung mittels BP-Rekombination	Kanamycin
pDONR201	Invitrogen™	Gateway <i>Entry</i> -Vektor, Klonierung mittels BP-Rekombination	Kanamycin
pDONR221	Invitrogen™	Gateway <i>Entry</i> -Vektor, Klonierung mittels BP-Rekombination	Kanamycin
pDONR222	Invitrogen™	Gateway <i>Entry</i> -Vektor, Klonierung mittels BP-Rekombination	Kanamycin
pENTR/D-TOPO	Invitrogen™	Gateway <i>Entry</i> -Vektor, Klonierung mittels TOPO-Rekombination	Kanamycin
pBTM116-D9-GW	Goehler <i>et al.</i> , 2004	Gateway <i>Bait</i> -Vektor für das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System, Klonierung mittels LR-Rekombination	Tetracyclin / Tryptophan
pBTM116-D9-GW-Leer	-	Modifizierter pBTM116-D9-GW-Vektor für das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System zur Autoaktivierungskontrolle	Tetracyclin / Tryptophan
pGAD10-GW	Bürkle <i>et al.</i> , 2005	Gateway <i>Prey</i> -Vektor für das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System, Klonierung mittels LR-Rekombination	Carbenicillin / Leucin
pGAD10-GW-Leer	-	Modifizierter pGAD10-GW-Vektor für das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System zur Autoaktivierungskontrolle	Carbenicillin / Leucin
pACT2	Clontech™	<i>Prey</i> -Vektor für das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System	Carbenicillin / Leucin
pACT2-GW	-	Gateway <i>Prey</i> -Vektor für das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System, Klonierung mittels LR-Rekombination	Carbenicillin / Leucin
pACT2-GW-Leer	-	Modifizierter pACT2-GW-Vektor für das <i>Yeast Two-Hybrid</i> System zur Autoaktivierungskontrolle	Carbenicillin / Leucin
pDEST15	Invitrogen™	Gateway <i>GST</i> -Vektor für die Expression von GST-Fusionsproteinen, Klonierung mittels LR-Rekombination	Carbenicillin
pDEST15-Leer	-	Modifizierter pDEST15-Vektor für die Expression von GST	Carbenicillin
pDEST17	Invitrogen™	Gateway <i>HIS</i> -Vektor für die Expression von 6xHis-Fusionsproteinen, Klonierung mittels LR-Rekombination	Zeocin

## 2.4 Oligonukleotide

Die in lyophilisierter Form von der Firma Invitrogen bezogenen Oligonukleotide wurden entweder in sterilem H<sub>2</sub>O (bidest.) oder in TE-Puffer (10 mM Tris + 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und auf 100 pmol/μl eingestellt. Die Oligonukleotide wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.4.1 Genspezifische und universelle BP-Rekombinationsprimer

Die in dieser Arbeit für die Klonierung mittels der BP-Rekombination verwendeten genspezifischen Oligonukleotide sind dem Anhang (Kapitel 11.2) zu entnehmen. Die universellen BP-Rekombinationsprimer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9. Universelle BP-Rekombinationsprimer.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
attB1-GW	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
attB2-GW	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

### 2.4.2 Genspezifische TOPO-Rekombinationsprimer

Die in dieser Arbeit für die Klonierung mittels der TOPO-Rekombination verwendeten genspezifischen Oligonukleotide sind dem Anhang (Kapitel 11.3) zu entnehmen.

### 2.4.3 Mutageneseprimer

Für die Mutagenese wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Die für den Aminosäureaustausch kodierenden Nukleotide sind in Klammern gesetzt.

Tabelle 10. Mutageneseprimer.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
AHP5-H83K <i>sense</i>	CAGGTGGATTCAGGTGTT(AAG)CAACTCAAGGGTAGTAGC
AHP5-H83K <i>anti sense</i>	GCTACTACCCTTGAGTTG(CTT)AACACCTGAATCCACCTG
AHP5-H83A <i>sense</i>	CAGGTGGATTCAGGTGTT(GCC)CAACTCAAGGGTAGTAGC
AHP5-H83A <i>anti sense</i>	GCTACTACCCTTGAGTTG(GGC)AACACCTGAATCCACCTG

## 2.5 Mikrobiologische und gentechnische Methoden

### 2.5.1 Kultur und Lagerung von *E. coli*

*Kultur von E. coli*

*E. coli*-Flüssigkulturen wurden in Kulturvolumina bis zu 6 mL LB-Medium (Kapitel 2.2.1) in Reagenzröhrchen und in Kulturvolumina ab 10 mL in Erlenmeyerkolben über Nacht (üN) bei 37 °C unter Schütteln angezogen. Kulturen auf Festmedium (Kapitel 2.2.1) wurden

ebenfalls üN bei 37 °C angezogen. Zur Selektion auf die rekombinanten Plasmide wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum (Kapitel 2.2.1) zugesetzt.

#### *Lagerung von E. coli*

500 µL einer üN angezogenen Bakterienkultur wurde mit 500 µL sterilem Glycerin (87 %ig) versetzt, durch Schütteln vollständig gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glycerinkulturen wurden bei -80 °C gelagert.

### **2.5.2 Herstellung und Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen**

Die folgenden Methoden zur Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen wurden für alle Stämme angewendet. Die kompetenten Zellen wurden für mehrere Monate bei -80 °C gelagert, durften aber nicht aufgetaut und wieder eingefroren werden, wenn die Transformationskompetenz erhalten bleiben sollte.

#### *Herstellung von chemisch kompetenten E. coli-Zellen*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach der Calciumchlorid-Methode nach Cohen *et al.* (1972) durchgeführt. Die Effizienz dieser Transformationsmethode liegt in der Regel bei ca.  $10^7$  Transformanden pro µg eingesetzter DNA. Ein frischer Ausstrich aus der Dauerkultur eines der in Kapitel 2.1 genannten *E. coli*-Stämme wurde zunächst auf LB-Medium (Kapitel 2.2.1) angesetzt und bei 37 °C üN inkubiert. Eine einzelne *E. coli*-Kolonie wurde in 20 mL LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C üN inkubiert. 2 mL dieser Kultur wurden in 500 mL LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen überführt und bis zu einer  $OD_{600}$  0,6 – 0,8 bei 37 °C geschüttelt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 15 min bei 4 °C und 10000 rpm pelletiert und in 10 mL eiskaltem 0,1 M  $CaCl_2$  resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 10000 rpm erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 2 mL 0,1 M  $CaCl_2$  / 10 % Glycerin, das anschließend zu 100 µL Aliquots in frische Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung mehrere Monate bei -80 °C gelagert wurde.

#### *Transformation von chemisch kompetenten E. coli-Zellen*

Die 100 µL Zellcharge wurde auf Eis aufgetaut, mit ca. 0,1 ng – 1 ng Vektor-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 90 s bei 42 °C inkubiert, anschließend sofort mit 900 µL LB-Medium (Kapitel 2.2.1) aufgefüllt und bei 37 °C auf dem Schüttler für 1 h inkubiert. 100 µL des Transformationsansatzes wurden auf LB-Selektivmedium (Kapitel 2.2.1) ausplattiert und bei 37 °C üN inkubiert.

### *Herstellung von elektrokompetenten E. coli-Zellen*

Die Effizienz dieser Transformationsmethode liegt in der Regel bei ca.  $10^9$  Transformanden pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA. Ein frischer Ausstrich aus der Dauerkultur eines der in Kapitel 2.1 genannten *E. coli*-Stämme wurde zunächst auf LB-Medium (Kapitel 2.2.1) angesetzt und bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  üN inkubiert. Eine einzelne *E. coli*-Kolonie wurde in 20 mL LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und unter Schütteln bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  üN inkubiert. 2 mL der üN-Kultur wurden in 500 mL LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben mit Schikanen überführt, bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  0,6 – 0,8 bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  geschüttelt und durch fünfzehnminütiges Zentrifugieren bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und 10000 rpm pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 100 mL eiskaltem sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. / 10 % Glycerin erfolgte die Resuspension in 2 mL der genannten Glycerinlösung. Die Zellen wurden zu 50  $\mu\text{L}$  Aliquots in frische Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung mehrere Monate bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### *Transformation von elektrokompetenten E. coli-Zellen*

Bei der Elektroporation wird durch das Anlegen eines elektrischen Impulses die Permeabilität der Zellmembran kurzfristig so erhöht, dass DNA-Moleküle in die Zellen eindringen können. Die 50  $\mu\text{L}$  Zellcharge wurde zunächst auf Eis aufgetaut, mit 0,1 ng – 1 ng Vektor-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Zeitgleich erfolgte die Vorwärmung der Elektroporationsküvette, ebenfalls für 30 min auf Eis. Das Gemisch aus Vektor-DNA und Zellen wurde in die Elektroporationsküvette überführt und bei 1,7 kV und einer Impulsdauer von 5 ms elektroporiert. Die transformierten Zellen wurden in 1 mL LB-Medium (Kapitel 2.2.1) aufgenommen und für 1 h bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. 50  $\mu\text{L}$  des Transformationsansatzes wurden auf LB-Selektionsmedium (Kapitel 2.2.1) ausplattiert und bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  üN inkubiert.

## **2.5.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen**

### *Minipräparation von Plasmid-DNA in Standardqualität*

Plasmid-DNA in Standardqualität wurde durch klassische alkalische Lyse mit anschließender Alkohol-Präzipitation präpariert. Dieses Verfahren basiert auf der 1979 von Birnboim und Doly beschriebenen alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und ist heute die am häufigsten angewandte Methode. Die für die Plasmidisolation benötigten Komponenten sind dem aktuellen Handbuch *Qiagen Plasmid Purification Handbook* der Firma Qiagen zu entnehmen.

Eine einzelne *E. coli*-Kolonie wurde in 3 mL LB-Selektivmedium (Kapitel 2.2.1) in einem Reagenzröhrchen angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C üN inkubiert. Aus dieser Kultur wurden 2 mL durch Zentrifugation sedimentiert, das Medium entfernt und das Sediment anschließend in 150 µL P1 gründlich resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µL P2 wurde der Ansatz durch fünfmaliges Invertieren vorsichtig (nicht auf dem Vibromischer, da dies zu Kontaminationen des Bakterienlysats mit genomischer DNA führen kann) gemischt; das Lysat sollte anschließend klar und viskos sein. Danach wurden 350 µL P3 zugegeben, der Ansatz durch fünfmaliges Invertieren gemischt und für 7 min bei 4 °C und 13200 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand, der die freigesetzte Plasmid-DNA enthält, wurden 850 µL entnommen, in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, und mit 850 µL Isopropanol auf dem Vibromischer gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 4 °C und 13200 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einer Pipette entfernt und das Sediment mit 300 µL 70 %igem Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde erneut vollständig entfernt, das Sediment für 20 min bei 40 °C getrocknet und in 30 µL bidest. H<sub>2</sub>O (steril) resuspendiert. Der Erfolg der durchgeführten Plasmid-Aufreinigung wurde durch ein analytisches Agarose-Gel überprüft, indem 20 µL der Plasmid-DNA auf einem Agarose-Gel getrennt wurde (Kapitel 2.5.12).

#### *Minipräparation von Plasmid-DNA in Reinstqualität*

Für reinste DNA wurde das Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen gemäß dem aktuellen Handbuch benutzt. Der Erfolg der durchgeführten Plasmid-Aufreinigung wurde durch ein analytisches Agarose-Gel überprüft, indem 2 µL der aufgereinigten Plasmid-DNA (das Gesamtvolumen betrug 40 µL) in einem Agarose-Gel getrennt wurde (Kapitel 2.5.12).

#### *Maxipräparation von Plasmid-DNA in Reinstqualität*

Für präparative Zwecke wurde das Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen gemäß dem aktuellen Handbuch benutzt. Der Erfolg der durchgeführten Plasmid-Aufreinigung wurde durch ein analytisches Agarose-Gel überprüft, indem 2 µL der aufgereinigten Plasmid-DNA (das Gesamtvolumen betrug 400 µL) in einem Agarose-Gel getrennt wurde (Kapitel 2.5.12).

### **2.5.4 Kultur und Lagerung von *S. cerevisiae***

#### *Kultur von S. cerevisiae*

Der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* L40ccU3 (Kapitel 2.1.2) wurde auf YPD-Medium bzw. SD-Selektivmedium (Kapitel 2.2.2) frisch ausgestrichen und bei 30 °C für 2 - 3 Tage inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 30 mL YPD-Medium bzw. SD-Selektivmedium überimpft und bei 30 °C unter Schütteln üN angezogen.

### *Lagerung von S. cerevisiae*

Generell wurde die zu lagernde *S. cerevisiae*-Kultur auf YPD-Medium bzw. SD-Selektivmedium (Kapitel 2.2.2) bei 30 °C für 3 Tage inkubiert und anschließend bei 8 °C für 3 Monate gelagert.

### **2.5.5 Herstellung und Transformation von kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen**

Während kompetente *E. coli*-Zellen für mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden können und ihre Kompetenz nahezu ohne Verlust beibehalten, müssen kompetente *S. cerevisiae*-Zellen frisch hergestellt und sofort nach ihrer Herstellung transformiert werden. Die folgenden Arbeiten wurden in Anlehnung an die Methode von Gietz und Woods (2002) durchgeführt. Die Hefezellen werden während des gesamten Prozesses auf Raumtemperatur gehalten, da *S. cerevisiae* bei niedriger Temperatur relativ schnell den Stoffwechsel einschränkt, so dass die Kompetenz reduziert werden könnte.

#### *Transformation von S. cerevisiae-Zellen im kleinen Maßstab*

Der zu transformierende Stamm wurde auf YPD-Medium bzw. SD-Selektivmedium (Kapitel 2.2.2) frisch ausgestrichen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine große Kolonie entnommen, in einen Erlenmeyerkolben mit 30 mL YPD-Medium überführt und bei 30 °C üN unter Schütteln inkubiert. 1,5 mL dieser Kultur wurden mit 29 mL YPD-Medium, das auf 30 °C vortemperiert war, in einem 200 mL Erlenmeyerkolben versetzt. Die OD<sub>600</sub> dieser Hauptkultur betrug anfänglich ca. 0,3. Die Kultur wurde bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 - 0,9 angezogen. Die Hefezellen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase (die Zellwand ist in dieser Phase dünn) und waren bereit für die Transformation. Während dessen wurde die Träger-DNA (*Salmon Sperm*, 10 mg/mL) der Firma Sigma 10 min bei 95 °C erhitzt, auf dem Vibromischer gründlich vermischt und sofort auf Eis abgekühlt, damit die Träger-DNA einzelsträngig vorliegt und somit zur Erhöhung der Transformationsrate beiträgt. Hatte die Hauptkultur die entsprechende Zelldichte erreicht, wurde sie für 5 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert. Das Sediment wurde durch Schütteln in 10 mL Mix1 (0,1 M LiAc + 1 M Sorbitol + 5 mM Tris-HCl pH 7,5 + 0,5 mM EDTA) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das neue Sediment wurde in 10 mL Mix1 ein zweites Mal gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 1 – 3 mL Mix1 gründlich resuspendiert, um die Zellen für die Transformation möglichst einzeln vorliegen zu haben. Pro Transformation wurden ca. 0,5 – 1 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Zu der in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß vorgelegten Plasmid-DNA wurden 15 µL vorbereitete Träger-DNA gegeben und pro Ansatz 50 µL Hefezell-Mix1-Suspension und je 230 µL Mix2 (0,1 M LiAc +

40 % ultrareines Polyethylenglycol 3350 der Firma Sigma + 10 mM Tris-HCl pH 7,5 + 1 mM EDTA) hinzu pipettiert. Der DNA-Hefe-Suspension wurden nach dreißigminütiger Inkubation bei 30 °C je 30 µL DMSO beigefügt, der komplette Transformationsansatz für 30 s auf dem Vibromischer vermischt und die Hefen für 20 min bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Hefezellen wurden anschließend für 3 min bei 4000 rpm und RT pelletiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 200 µL bidest. H<sub>2</sub>O (steril) resuspendiert. 70 µL der Hefesuspension wurden auf SD-Selektivmedium (Kapitel 2.2.2) ausplattiert und für 3 – 7 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### *Transformation von S. cerevisiae-Zellen im großen Maßstab*

Die Transformation im großen Maßstab wurde für den plasmidenthaltenden Stamm im *Library-Screen* verwendet. Hierzu wurde der Stamm mit dem *Bait*-Vektor zunächst auf SD-Selektivmedium (Kapitel 2.2.2) ausgestrichen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine große Kolonie entnommen, in einen Erlenmeyerkolben mit 30 mL YPD-Medium (Kapitel 2.2.2) überführt und bei 30 °C üN unter Schütteln inkubiert. Aus dieser Kultur wurden 7 mL mit 95 mL YPD-Medium, das auf 30 °C vortemperiert war, in einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikanen versetzt. Die OD<sub>600</sub> der Hauptkultur betrug anfänglich ca. 0,3. Die Kultur wurde bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,7 - 0,9 angezogen. Die Hefezellen befanden sich in der logarithmischen Wachstumsphase und waren bereit für die Transformation. Während dessen wurde die Träger-DNA (*Salmon Sperm*, 10 mg/mL) der Firma Sigma 10 min bei 95 °C erhitzt, auf dem Vibromischer gründlich vermischt und sofort auf Eis abgekühlt. Hatte die Hauptkultur die entsprechende Zelldichte erreicht, wurde sie auf zwei 50 mL Falkonröhrchen aufgeteilt und für 5 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert. Die beiden Sedimente wurden durch Schütteln jeweils in 7,5 mL Mix1 resuspendiert, vereinigt und erneut zentrifugiert. Das neue Sediment wurde in 15 mL Mix1 ein zweites Mal gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment in 1 mL Mix1 gründlich resuspendiert. Für die Transformation wurde 50 µg Plasmid-DNA (cDNA-Bank im *Prey*-Vektor) eingesetzt. Zu der in einem 50 mL Falkonröhrchen vorgelegten Plasmid-DNA wurden 150 µL vorbereitete Träger-DNA, die gesamte Hefezell-Mix1-Suspension und 7 mL Mix2 hinzu pipettiert. Der DNA-Hefesuspension wurden nach dreißigminütiger Inkubation bei 30 °C je 300 µL DMSO zugegeben, der komplette Transformationsansatz 30 s auf dem Vibromischer vermischt und die Hefen für 20 min bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt. Die Hefezellen wurden anschließend für 3 min bei 4000 rpm und RT pelletiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 4 mL bidest. H<sub>2</sub>O (steril) resuspendiert. Zur Bestimmung der Transformationsrate wurde das Gesamtvolumen der Hefesuspension ermittelt,

jeweils 1  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$  und 10  $\mu\text{L}$  auf SD-Selektivmedium ausplattiert und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die restliche Hefe-Suspension wurde auf vier Platten (22 cm x 22 cm) mit SD-Selektivmedium ausplattiert. Für das gleichmäßige Verteilen der Zellsuspension wurden die Platten mit ca. 10 sterilen Glaskügelchen (Roll & Grow Plating Beads) der Firma QBIogene versetzt und bis zur Trockne geschüttelt. Nach dem Entfernen der Glaskügelchen erfolgte eine siebentägige Inkubation bei 30 °C.

Aus den Ergebnissen der *Screens* (Tabelle 21 und Tabelle 23) konnte festgestellt werden, dass die Transformationsrate zunahm, wenn der Hefe-Stamm vor dem *Screen* frisch auf Selektivmedium ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert wurde. Darüber hinaus ist dem Hefe-Transformationsprotokoll zu entnehmen, dass Transformationen bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7-0,9 durchgeführt werden sollen. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass Transformationen bei höheren OD-Werten (0,9 bis 1) höhere Transformationsraten lieferten. Aus diesem Grund wurden die Transformationen bei einer  $\text{OD}_{600}$  von mindestens 0,9 durchgeführt.

### **2.5.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*-Kulturen**

Generell wurde die Plasmid-Isolation mit *S. cerevisiae*-Kulturen durchgeführt, die zwei Plasmide (*Bait*- und *Prey*-Vektor) gleichzeitig enthielten. Zur Selektion auf das unbekannte *Prey*-Plasmids aus den *Library-Screens* wurde eine einzelne Kolonie in 4 mL SD-Selektivmedium (Kapitel 2.2.2) in einem Reagenzröhrchen angeimpft, das mit dem Hefemarker des auszuselektierenden *Bait*-Plasmids versetzt wurde, und unter Schütteln bei 30 °C für 3 Tage inkubiert. Während dieser Inkubationszeit sollte das *Bait*-Plasmid passiv aufgrund der Zellteilungsvorgänge ausgestoßen und das *Prey*-Plasmid aufgrund des Selektionsdruckes angereichert werden. Von dieser Kultur wurden 2 mL durch Zentrifugation sedimentiert, das Medium entfernt und das Pellet in 200  $\mu\text{L}$  Puffer A (10 mM Tris-HCl pH 8,0 + 1 mM EDTA + 100 mM  $\text{NaCl}_2$  + 1 % SDS + 2 % Triton X-100) resuspendiert. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol Gemisches (25:25:1), sowie 0,3 g Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 425 – 600  $\mu\text{m}$  für 2 min auf dem Vibromischer aufgeschlossen und für 5 min bei 13200 rpm erneut sedimentiert. Der wässrige Überstand, der die freigesetzte Plasmid-DNA enthält, wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, der Ansatz mit 200  $\mu\text{L}$  Isopropanol und 25  $\mu\text{L}$  Na-Acetat (3 M) versetzt und für 30 min bei 4 °C und 13200 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 300  $\mu\text{L}$  70 %igem Ethanol gewaschen, der Überstand vollständig entfernt und das Sediment für 20 min bei 40 °C getrocknet und in 30  $\mu\text{L}$  bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  (steril) resuspendiert. Der gesamte Ansatz

wurde gemäß Kapitel 2.5.2 in *E. coli* transformiert und das unbekannte *Prey*-Plasmid nach der Isolierung (Kapitel 2.5.3) gemäß Kapitel 2.5.9 einer Restriktionsfragmentierung unterzogen. Anschließend wurde das unbekannte DNA-Segment durch Sequenzierung (Kapitel 2.5.18) identifiziert.

### **2.5.7 Kultur und Lagerung von *A. thaliana***

#### *Kultur von A. thaliana*

Für den Affinitätschromatographischen Interaktionstest (Kapitel 2.6.9) wurde *A. thaliana* in Sterilkultur angezogen. Für die Anzucht mussten die Samen erst in gesättigter Calcium-Hypochlorid-Lösung (200 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 0,1 % Triton X-100) sterilisiert werden. Hierzu wurden aus dem Überstand der Calciumhypochlorid-Lösung 10 ml in ein 15 mL Falconröhrchen überführt, mit 10 mg Samen versetzt und für 15 min bei RT unter gelegentlichem Invertieren sterilisiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die sedimentierten Samen viermal in 10 mL bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  (steril) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Samen in 1 mL MS-Medium (Kapitel 2.2.3) aufgenommen und in einen mit 20 mL MS-Medium versetzten sterilen 500 mL Erlenmeyerkolben überführt. Die Samen wurden für 6 Tage bei RT unter Schütteln einem 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus ausgesetzt.

#### *Lagerung von A. thaliana*

Die 6 Tage alten Keimlinge wurden in einem Filter mit Wasser gewaschen, um das Pflanzenmaterial von restlichem MS-Medium zu befreien. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial auf Zellulosepapier vorsichtig getrocknet, je 5 g in Aluminiumfolie eingewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Pflanzenmaterial wurde bis zur Verwendung maximal für einen Monat bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.5.8 Isolierung von RNA aus *A. thaliana***

#### *Anzucht von Pflanzen*

RNA-Präparate wurden aus *A. thaliana* Col-0 (Kapitel 2.1.3) hergestellt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei  $20\text{ }^\circ\text{C}$  und einem 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus kultiviert. Die Lichtintensität betrug 16000 lux. Nach der Ernte wurden die Samen für 48 h bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  stratifiziert, auf Erde ausgelegt und mittels einer Plastik-Haube wurde für 48 h das nötige Klima zur Keimung der Samen geschaffen. Für die Isolierung von RNA aus Keimlingen wurden 5 – 7 Tage alte Keimlinge, deren Kotyledonen vollständig ausgebildet waren, in

flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Isolierung von RNA aus Primärblättern wurden 7 – 10 Tage alte Keimlinge verwendet. Die Primärblätter der Keimlinge wurden abgeschnitten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die Isolierung von RNA aus Blüten wurden die Blüten abgeschnitten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### *Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen*

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde TRIzol der Firma Sigma gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Das Pflanzengewebe wurde in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff versetzt aufgeschlossen. Ca. 200 mg an Pflanzengewebe wurde mit 1 mL TRIzol versetzt und bei RT für 5 min inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde bei 4 °C und 12000x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand mit 400 µL Chloroform vermischt. Erneut erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei RT mit anschließender Zweiphasentrennung durch Zentrifugation bei 4 °C und 12000x g für 15 min. Die wässrige obere Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, mit Isopropanol (0,6x Volumen) und 3 M Na-Acetat (0,1x Volumen) versetzt und bei 4 °C für 10 min inkubiert. Die ausgefällte RNA wurde bei 4 °C und 12000x g für 15 min sedimentiert und das Sediment zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen. Die RNA wurde getrocknet, anschließend in 50 µl Diethylpyrocarbonat behandeltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und gemäß Kapitel 2.5.14 gelagert.

### **2.5.9 Restriktionsfragmentierung von Plasmid-DNA**

Für analytische Zwecke wurde die Plasmid-DNA einer Restriktionsfragmentierung unterzogen. Die Zusammensetzung eines Restriktionsansatzes ist in Tabelle 11 aufgeführt. Der Erfolg der durchgeführten Restriktionsanalyse wurde durch ein analytisches Agarose-Gel überprüft, indem der gesamte Restriktionsansatz in einem Agarose-Gel getrennt wurde (Kapitel 2.5.12). Die Restriktionsenzyme, die entsprechenden 10x konzentrierten Puffer und das 10x konzentrierte BSA wurden von den Firmen Fermentas und New England Biolabs bezogen.

**Tabelle 11. Standardzusammensetzung eines Restriktionsansatzes.**

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Plasmid-DNA	1 µg
10x Puffer	2 µL
10x BSA	2 µL
Restriktionsenzym	0,5 µL
H <sub>2</sub> O bidest.	auf 20 µL füllen

### 2.5.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wurde 1987 von Mullis und Faloona entwickelt (Mullis und Faloona, 1987). In Anlehnung an diese Methode wurde die PCR durchgeführt. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion für ein Volumen von 25 – 50 µL ist in Tabelle 12 aufgeführt. Die *Taq*-Polymerase wurde nur für analytische Zwecke eingesetzt, da ihr die 3'-5'-Exonuclease-Aktivität fehlt und an das 3'-Ende der Produktstränge ein überstehendes Adenosin anhängt und somit für Klonierungszwecke ungeeignet ist. Für Klonierungszwecke wurde die *Pwo*-Polymerase verwendet, die die 3'-5'-Exonuclease-Aktivität, auch *Proofreading*-Aktivität genannt, besitzt. Durch diese Aktivität werden falsch eingebaute Nukleotide erkannt und entfernt, so dass die Fehlerrate deutlich reduziert ist. Für die sequenzspezifische Hybridisierung der Primer an die Matrizen-DNA wurde die vereinfachte Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur  $T_m$  verwendet:  $T_m = 2\text{ °C} \times (A+T) + 4\text{ °C} \times (G+C)$ . Für die PCR-Experimente wurde eine Hybridisierungstemperatur von 5 - 10 °C unter der berechneten Schmelztemperatur gewählt. In Tabelle 13 ist ein typisches PCR-Programm für analytische Zwecke dargestellt, in der die Zyklenzahl auf 30 festgelegt ist. Die DNA-Polymerasen wurden von der Firma Promega bezogen, dNTPs und 10x Komplettpuffer wurden mitgeliefert. Der Erfolg der durchgeführten PCR wurde durch ein analytisches Agarose-Gel überprüft, indem 20 µL des Ansatzes auf einem Agarose-Gel getrennt wurde (Kapitel 2.5.12).

**Tabelle 12. Standardzusammensetzung eines PCR-Ansatzes.**

Substanz	Konzentration
Matrizen-DNA	5 – 100 ng
10x Komplettpuffer	1x
Primer 1 und 2	10 pMol jeweils
dNTPs	200 µM
DNA-Polymerase	5 Units

**Tabelle 13. Standard PCR-Programm für analytische Zwecke.**

Bezeichnung	Temperatur
1. Denaturierung	5 min, 95 °C
2. Denaturierung	30 sek, 95 °C
3. Hybridisierung	15 sek, $T_m - 5\text{ °C}$ (oder $-10\text{ °C}$ )
4. Polymerisation	4 min, 72 °C
5. Wiederholung der Schritte 2-4; 30 mal	
6. Polymerisation	5 min, 72 °C

### **2.5.11 Reverse Transkription von RNA**

Für das Arbeiten mit RNA wurden ein gesonderter Satz an Glasgeräten, die durch trockene Hitze (4 h bei 180 – 200 °C) sterilisiert wurden, und RNase-freie Chemikalien verwendet. Plastikmaterial wurde im Autoklaven sterilisiert. Da Hände eine wesentliche Quelle für RNase-Kontaminationen sind, wurden stets Handschuhe getragen. Zur reversen Transkription von RNA, die gemäß Kapitel 2.5.8 hergestellt wurde, wurde das RETROscript™ Kit der Firma Ambion gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Generell wurde für die Erststrangsynthese oligo(dT) als Primer eingesetzt. Die Produkte der reversen Transkription konnten bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden, bevor sie dann gemäß Kapitel 2.5.10 für die Zweitstrangsynthese mittels genspezifischen Primern (Kapitel 2.4.1 und Kapitel 2.4.2) in der PCR eingesetzt wurden.

### **2.5.12 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

Zur Analyse doppel- und einzelsträngiger DNA-Fragmente sowie von Plasmid-DNA wurden Agarose-TBE-Gele und zur präparativen Isolierung Agarose-TAE-Gele eingesetzt, modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989. Es wurden 50x TAE (2 M Tris-Base + 1 M Essigsäure + 0,1 M EDTA)- und 10x TBE (108 g/L Tris + 55 g/L Borsäure + 40 mL/L einer 0,5 M EDTA pH 7,5 Lösung)-Stammlösungen hergestellt, die für mehrere Monate bei RT gelagert werden konnten. In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden für große Fragmente (>1kb) 0,8 %ige und für kleine Fragmente (0,2 bis 1 kb) 1 %ige Agarose-Gele verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und im entsprechenden Volumen an 1X TAE-Puffer oder 1X TBE-Puffer suspendiert. Der Ansatz wurde in einem Mikrowellengerät aufgekocht, anschließend mit Ethidiumbromid (1 µL / 100 mL einer 10 %igen Ethidiumbromidlösung) versetzt und die Lösung nach dem Abkühlen auf ca. 50 – 60 °C in die Gelkammer gegossen. Für ein Agarose-TBE- bzw. TAE-Gel der Größe 100 mm x 100 mm waren typische Elektrophoresebedingungen 1 h – 1,5 h bei 75 V. Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten im Agarosel-Gel wurden 5 µL des DNA-Größenmarkers Hyperladder I der Firma BioLine mit aufgetragen. Die DNA wurde mittels UV-Licht gemäß Kapitel 2.5.15 sichtbar gemacht und dokumentiert.

### **2.5.13 Gelelektrophoretische Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen**

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten sowie von Plasmid-DNA aus Agarose-Gelen wurden ausschließlich Agarose-TAE-Gele verwendet, die gemäß Kapitel 2.5.12 hergestellt wurden. Die DNA wurde mittels UV-Licht gemäß Kapitel 2.5.15 sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufarbeitung der Probe erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification / Gel Extraction Kit der Firma Qiagen gemäß dem Begleitheft des Herstellers. Der Erfolg der durchgeführten Aufreinigung wurde durch ein analytisches Agarose-Gel (Kapitel 2.5.12) überprüft. Die Qualität bzw. Reinheit der DNA ermöglichte den nachfolgenden Einsatz in Restriktionsreaktionen, Markierungs- und Hybridisierungsexperimenten, PCR- und Transformationsreaktionen, DNA-Sequenzierung, wie auch *in vitro* Transkriptionen.

### **2.5.14 Quantifizierung und Lagerung von Nukleinsäuren**

Für die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde die gelelektrophoretische Quantifizierung der photometrischen vorgezogen. Die photometrische Quantifizierung wurde nur dann eingesetzt, wenn gleichzeitig auch die Reinheit der Probe ermittelt werden sollte.

#### *Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren*

Die Ausbeute der isolierten Nukleinsäuren wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette vorgenommen. Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine weitere Messung bei 280 nm vorgenommen. Die Nukleinsäurepräparation wurde als ausreichend rein beurteilt, wenn das Verhältnis der Absorptionswerte  $A_{260/280} > 1,6$  war. Nukleinsäuren von hoher Reinheit hatten ein Verhältnis  $A_{260/280}$  von 1,7 – 1,9.

#### *Gelelektrophoretische Quantifizierung von Nukleinsäuren*

Die Ausbeute der isolierten Nukleinsäure wurde mittels eines analytischen Agarose-Gels unter Verwendung von 5  $\mu$ L des DNA-Größenmarkers Hyperladder I (Kapitel 2.5.12) optisch ermittelt. Hierzu wurde die Fluoreszenzintensität der zu quantifizierenden Nukleinsäure mit denen des DNA-Größenmarkers mittels UV-Licht (Kapitel 2.5.15) verglichen.

#### *Lagerung von Nukleinsäuren*

Die isolierten Plasmid-Präparate bzw. DNA-Fragmente (Kapitel 2.5.3, Kapitel 2.5.6 und Kapitel 2.5.13) wurden in sterilem H<sub>2</sub>O (bidest.) gelöst und bei -20 °C für mehrere Monate gelagert. RNA-Präparate (Kapitel 2.5.8) wurden bei -80 °C für mehrere Monate gelagert.

### **2.5.15 Visualisierung und Dokumentation gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA**

Die gemäß Kapitel 2.5.12 und Kapitel 2.5.13 gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde mittels UV-Licht auf einem Tisch der Firma Syngene bei 312 nm sichtbar gemacht und mit der zugehörigen Software in digitaler Form dokumentiert.

### **2.5.16 Klonierung von PCR-Produkten**

#### **2.5.16.1 GATEWAY™ Klonierung**

Die GATEWAY-Technologie der Firma Invitrogen ist ein neues System zur Klonierung und Subklonierung von DNA-Sequenzen. Unter Beibehaltung der Orientierung und des Leserasters können die DNA-Segmente mittels spezifischer Rekombinationssequenzen zwischen den GATEWAY-kompatiblen Vektoren beliebig transferiert werden. Die PCR-amplifizierte DNA-Sequenz wird zunächst per BP-Reaktion in einen *Entry*-Vektor kloniert und anschließend per LR-Reaktion in die entsprechenden *Destination*-Vektoren. Der *Destination*-Vektor ist auch gleichzeitig der Expressionsvektor. Die *Entry*- und *Destination*-Vektoren sind in Kapitel 2.3 aufgeführt.

#### *Klonierung per BP-Rekombination*

Voraussetzung für eine erfolgreiche BP-Rekombination ist, dass sowohl das PCR-Produkt als auch der *Entry*-Vektor frei von Verunreinigungen sind. Die PCR (Kapitel 2.5.10) wurde entweder direkt auf Plasmid-DNA aus den cDNA-Banken (Kapitel 2.5.19) oder auf den Produkten der reversen Transkription (Kapitel 2.5.11) durchgeführt. Als Primer wurden die in Kapitel 2.4.1 aufgeführten genspezifischen und universellen BP-Rekombinationsprimer verwendet. Die PCR-Produkte wurden gemäß Kapitel 2.5.13 und der *Entry*-Vektor gemäß Kapitel 2.5.3 aufgereinigt. Die Klonierung per BP-Rekombination erfolgte gemäß dem Begleitheft des Herstellers. Der Erfolg der BP-Rekombination wurde gemäß Kapitel 2.5.9 durch Restriktionsfragmentierung und anschließender Sequenzierung des klonierten DNA-Segments untersucht.

#### *Klonierung per LR-Rekombination*

Voraussetzung für eine erfolgreiche LR-Rekombination ist, dass der *Destination*-Vektor innerhalb der Rekombinationskassette, jedoch außerhalb von kodierenden Sequenzen, mittels eines Restriktionsansatzes linearisiert und anschließend gemäß Kapitel 2.5.13 aufgereinigt wird. Der *Entry*-Klon musste ebenfalls in Reinstqualität vorliegen und wurde daher gemäß Kapitel 2.5.3 aufgereinigt. Die Linearisierung der *Destination*-Vektoren erfolgte gemäß Tabelle 14 im 100 µL Reaktionsvolumen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei optimaler

Temperatur, die für das Restriktionsenzym vorgegeben ist, wurde das Restriktionsenzym für 20 min durch Hitze bei 85 °C deaktiviert. Der Erfolg der durchgeführten Linearisierung wurde durch ein analytisches Agarose-Gel (Kapitel 2.5.12) überprüft, indem 3 µL der linearisierten Plasmid-DNA in einem Agarose-Gel getrennt wurde. Die LR-Rekombination erfolgte gemäß dem Begleitheft des Herstellers. In Tabelle 15 ist der modifizierte Ansatz für die LR-Rekombination aufgeführt. Der Erfolg der LR-Rekombination wurde durch Restriktionsfragmentierung gemäß Kapitel 2.5.9 untersucht. Eine Untersuchung des klonierten DNA-Segments per Sequenzierung war nicht erforderlich, da das Segment schon zuvor nach der BP-Rekombination sequenziert wurde.

**Tabelle 14. Standardzusammensetzung eines Linearisierungsansatzes.**

Substanz	Menge
<i>Destination</i> -Vektor	100 ng/µL
10x Puffer	10 µL
Restriktionsenzym	10 µL
H <sub>2</sub> O bidest.	auf 100 µL füllen

**Tabelle 15. Standardzusammensetzung eines LR-Rekombinationsansatzes.**

Substanz	Menge
<i>Destination</i> -Vektor	100 ng/µL
<i>Entry</i> -Klon	100 ng/µL
LR-Puffer	2 µL
LR-Clonase	0,5 µL
H <sub>2</sub> O bidest.	auf 10 µL füllen

### 2.5.16.2 TOPO<sup>®</sup> Klonierung

Die TOPO-Technologie der Firma Invitrogen ist ein System zur Klonierung von DNA-Sequenzen, die aufgrund der verwendeten Primer während der PCR-Amplifikation mit einem spezifischen Überhang am 5'-Primer (5'-CACC-Gensequenz-3') versehen werden. Der in dem Kit enthaltene GATEWAY-kompatible Vektor hat ebenfalls die passenden Überhänge und ist an eine Topoisomerase gekoppelt. Dieses Enzym ligiert das PCR-Produkt unter Beibehaltung der Orientierung und des Leserasters in den Vektor. Die PCR (Kapitel 2.5.10) wurde entweder direkt auf Plasmid-DNA aus den cDNA-Banken (Kapitel 2.5.19) oder auf den Produkten der reversen Transkription (Kapitel 2.5.11) durchgeführt. Als Primer wurden die in Kapitel 2.4.2 aufgeführten TOPO-Rekombinationsprimer verwendet. Die Klonierung erfolgte gemäß dem Begleitheft des Herstellers. Der Erfolg der TOPO-Klonierung wurde durch Restriktionsfragmentierung gemäß Kapitel 2.5.9 und anschließender Sequenzierung (Kapitel 2.5.18) des klonierten DNA-Segments untersucht. Der durch TOPO-Klonierung erzeugte *Entry*-Klon konnte nun für die Subklonierung per LR-Rekombination (Kapitel 2.5.16.1) in die

entsprechenden *Destination*-Vektoren verwendet werden. In Kapitel 2.3 sind die *Entry*- und *Destination*-Vektoren aufgeführt.

### **2.5.17 Gerichtete Mutagenese**

Die gerichtete Mutagenese dient der Veränderung der DNA-Sequenz und wird meist für eine damit verbundene Veränderung der Aminosäuresequenz von Proteinen eingesetzt. Das Konzept dieser Methode (Zoller und Smith, 1982) basiert darauf, dass ein synthetisches Oligonukleotid, das die gewünschte Mutation enthält, als Primer für die Anlagerung an den komplementären Strang der Matrizen-DNA verwendet wird. Als Produkt entsteht eine Kopie der Matrizen-DNA, die sich nur in der Primersequenz von der Matrize unterscheidet. Für die gerichtete Mutagenese wurden die in Kapitel 2.4.3 aufgeführten Mutageneseprimer und das QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung (Kapitel 2.5.18) des veränderten DNA-Segments im *Entry*-Vektor überprüft. Der modifizierte *Entry*-Klon wurde anschließend für die Subklonierung per LR-Rekombination (Kapitel 2.5.16.1) in die entsprechenden *Destination*-Vektoren verwendet.

### **2.5.18 Sequenzierung klonierter DNA-Segmente**

Für die Sequenzierung der klonierten ZKS-Gene wurden Sequenzierungsprimer verwendet, die für die *Entry*-Vektoren charakteristisch sind und im Begleitheft des Herstellers der GATEWAY- und TOPO-Klonierung (Invitrogen) aufgeführt werden. Die ZKS-Gene wurden von beiden Seiten, also vom 5`- und 3`-Ende sequenziert. Unbekannte DNA-Segmente in den *Prey*-Vektoren pGAD10-GW sowie pACT2/pACT2-GW (Kapitel 2.3) aus den *Library-Screens* (Kapitel 3.4) wurden mittels eines Standardprimers, der für die GAL4-AD charakteristisch ist, vom 5`-Ende aus ansequenziert.

## 2.5.19 Verwendete cDNA-Banken

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Banken sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16. cDNA-Banken.

Referenz	Bezeichnung- und Beschreibung der cDNA-Bank	Anzahl der Primärklone	Verwendung
Bürkle <i>et al.</i> , 2005	<i>Blüten</i> -cDNA-Bank: Hergestellt aus <i>A. thaliana</i> Col-0 Blüten; kloniert in den GATEWAY-kompatiblen <i>Entry</i> -Vektor pENTR1A.	617.000	<i>Yeast Two-Hybrid</i> und cDNA-Amplifizierung
Bürkle <i>et al.</i> , 2005	<i>Samen</i> -cDNA-Bank: Hergestellt aus <i>A. thaliana</i> Col-0 Samen und Primärblättern aus 7 – 10 Tage alten Keimlingen; angezogen auf Erde bei 26 °C mit 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus; kloniert in den GATEWAY-kompatiblen <i>Entry</i> -Vektor pENTR1A.	820.000	<i>Yeast Two-Hybrid</i> und cDNA-Amplifizierung
Bürkle <i>et al.</i> , 2005	<i>Keimlinge</i> -cDNA-Bank: Hergestellt aus 5 – 7 Tage alten <i>A. thaliana</i> Col-0 Keimlingen; angezogen in flüssigem MS-Medium bei 26 °C mit 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus; kloniert in den GATEWAY-kompatiblen <i>Entry</i> -Vektor pENTR1A.	530.000	<i>Yeast Two-Hybrid</i> und cDNA-Amplifizierung
Bürkle <i>et al.</i> , 2005	<i>Hormon</i> -cDNA-Bank: Hergestellt aus 5 – 7 Tage alten <i>A. thaliana</i> Col-0 Keimlingen; angezogen auf MS-Medium getränktem Filterpapier bei 26 °C mit 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus mit anschließender Behandlung für 2 h und 24 h mit hormonhaltigem (1 µM Abscisinsäure, 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure, Benzyladenin, Gibberelinsäure der Firma Sigma) MS-Medium; kloniert in den GATEWAY-kompatiblen <i>Entry</i> -Vektor pENTR1A.	776.000	<i>Yeast Two-Hybrid</i> und cDNA-Amplifizierung
C. Koncz, MPI-Köln, unpubliziert	<i>Koncz</i> -cDNA-Bank: hergestellt aus <i>A. thaliana</i> Col-0 Wurzelzellkultur; kloniert in den <i>Prey</i> -Vektor pACT2.	-	<i>Yeast Two-Hybrid</i> und cDNA-Amplifizierung
A. Theologis, unpubliziert	<i>Theologis</i> -cDNA-Bank: Hergestellt aus 3 Tage alten <i>A. thaliana</i> Col-0 Keimlingen, kloniert in den <i>Prey</i> -Vektor Lambda-ACT.	36.000.000	<i>Yeast Two-Hybrid</i> und cDNA-Amplifizierung
Minet <i>et al.</i> , 1992	<i>Minet</i> -cDNA-Bank: Hergestellt aus 5 – 7 Tage alten <i>A. thaliana</i> C24 Keimlingen; angezogen auf MS-Medium bei 26 °C mit 16 h Licht / 8 h Dunkel-Zyklus.	-	cDNA-Amplifizierung

## 2.5.20 Amplifizierung und Aufreinigung von cDNA-Banken

Die in Kapitel 2.5.19 aufgeführten cDNA-Banken lagen als aufgereinigte Plasmide in bidest. H<sub>2</sub>O (steril) gelöst vor und wurden bei -80 °C gelagert. Die zur Verfügung stehenden Mengen waren jedoch begrenzt und mussten deshalb vor der Durchführung der Experimente amplifiziert und aufgereinigt werden.

### *Amplifizierung von cDNA-Banken*

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen mit einer Transformationsrate von  $> 10^9$  wurden gemäß Kapitel 2.5.2 hergestellt und mit 10 ng der jeweiligen cDNA-Bank (Kapitel 2.5.19) transformiert. Der Transformationsansatz wurde mit LB-Medium auf insgesamt 24 mL aufgefüllt und jeweils 1 mL auf insgesamt 24 Platten (22cm x 22cm) mit LB-Selektivmedium

(Kapitel 2.2.1) verteilt. Für das gleichmäßige Verteilen der 1 mL Zellsuspension wurden die Platten mit ca. 10 sterilen Glaskügelchen (Roll&GrowPlatingBeads) der Firma QBIOfine versetzt und bis zur Trockne geschüttelt. Nach dem Entfernen der Glaskügelchen erfolgte die Inkubation  $\mu$ N bei 37 °C. Jede Platte enthielt im Durchschnitt 500.000 Klone. Da der Sauerstoffeintrag in Flüssigmedien gering ist, wurde die Amplifizierung auf Festmedium dem Flüssigmedium vorgezogen. Auf Festmedium befindet sich jeder Klon im direkten Kontakt mit der Luft, so dass ein ungleichmäßiges Wachstum vermieden und so eine möglichst gleich bleibende Häufigkeit erzielt wird. Die Auswahl der Anzahl von 500.000 Klonen pro Platte sollte ebenfalls zu einem gleichmäßigen Wachstum beitragen, da bei dieser Zahl die Zellen noch vereinzelt vorlagen und somit weitere Stressbedingungen wie z.B. Nährstoffmangel weitestgehend vermieden wurden.

#### *Aufreinigung von cDNA-Banken*

Die auf den 24 Platten angewachsenen Klone wurden mit dem Deckel einer 96er Mikrotiterplatte „abgeschabt“, die amplifizierte Plasmid-DNA gemäß Kapitel 2.5.3 isoliert und aufgereinigt und in 500  $\mu$ L bidest. H<sub>2</sub>O (steril) gelöst. Die Ausbeute und Reinheit der isolierten DNA wurde gemäß Kapitel 2.5.14 photometrisch ermittelt.

#### **2.5.21 Verschieben von cDNA-Banken**

cDNA-Banken (Kapitel 2.5.19), die in dem GATEWAY-kompatiblen pENTR1A-Vektor vorlagen und für das *Yeast Two-Hybrid* System verwendet werden sollten, wurden per LR-Rekombination in die entsprechenden *Prey*-Expressionsvektoren pGAD10-GW und pACT2-GW (Kapitel 2.3) gemäß Kapitel 2.5.16.1 verschoben und gemäß Kapitel 2.5.20 amplifiziert und aufgereinigt. Die cDNA-Banken *Koncz* und *Theologis* befinden sich bereits in einem *Prey*-Expressionsvektor (Kapitel 2.5.19) und konnten deshalb ohne weiteres im *Yeast Two-Hybrid* System eingesetzt werden.

#### **2.5.22 Koloniehybridisierung**

Mittels der Koloniehybridisierung ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen in Bakterien- oder Hefezellen nachzuweisen (Palkova *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Koloniehybridisierung zur Vorselektion von bekannten DNA-Sequenzen aus den *Library-Screens* (Kapitel 3.4) verwendet.

### *Aufschluss von S. cerevisiae*

*S. cerevisiae*-Zellen wurden in flüssigem Selektivmedium (Kapitel 2.2.2) angezogen und mittels einer 96er-Mikrotiterplatte und einem 96er-Stempel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit der Kolonie-Seite nach oben auf Selektivmedium ausgelegt, um die Zellen nach erneuter Anzucht (bei 30 °C für drei Tage) direkt auf der Membran aufzuschließen. Für den Zellaufschluss wurde die Membran mit der Kolonie-Seite nach oben für 3 min auf Zellulosepapier aufgelegt, das zuvor in Aufschlusspuffer (10 % SDS) getränkt wurde. Anschließend wurde die Membran nacheinander für jeweils 5 min auf Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH + 1,5 M NaCl), Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl + 0,5 M Tris-HCl pH 7,4) und 2x SSC-Puffer (300 mM NaCl + 30 mM Na-Citrat) getränktes Zellulosepapier aufgelegt und für 30 min bei RT getrocknet. Die DNA wurde auf der Membran durch UV-Behandlung fixiert und konnte für mehrere Tage bei RT in einem geschlossenen Behälter gelagert werden.

### *Synthese und Aufreinigung von <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonden*

Die Hybridisierungssonde wurde per PCR gemäß Kapitel 2.5.10 amplifiziert und gemäß Kapitel 2.5.13 gelelektrophoretisch aufgereinigt. Der Aufreinigungsschritt nach der PCR ist essentiell, da geringste Verunreinigungen der Probe mit Vektor-DNA einen erhöhten Hintergrund bei der Hybridisierung bewirken und somit zur Identifizierung eines falschen Klons führen können. Die radioaktive Markierung der aufgereinigten Hybridisierungssonde erfolgte mit dem Prime-It® II Random Primer Labeling Kit (Stratagene) gemäß dem Begleitheft des Herstellers. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden durch Gelfiltration (*Nick Column*, Pharmacia) gemäß dem Begleitheft des Herstellers entfernt. Die markierte Hybridisierungssonde wurde mit 400 µL sterilem H<sub>2</sub>O (bidest.) aus der Säule in ein Eppendorfgefäß eluiert (nichtinkorporierte Nukleotide verbleiben auf der Säule) und der gesamte Ansatz nach zehnminütiger Denaturierung bei 95 °C für die Hybridisierung eingesetzt.

### *Hybridisierung*

Vor der eigentlichen Hybridisierungsreaktion erfolgte die Prähybridisierung, um unspezifische Bindungen der markierten Hybridisierungssonde auf der Membran zu vermeiden. Die Nitrozellulosemembran wurde so zusammengerollt, dass sich die zu hybridisierende Nukleinsäure-Seite innen befindet, und in die Hybridisierungsröhre geführt. Ca. 15 – 20 mL der Hybridisierungslösung (0,25 M Na-Phosphat-Puffer pH 7,2 + 1 mM EDTA + 1 % BSA + 7 % SDS) wurden zugeführt. Pro mL Hybridisierungslösung wurden 10 µL Heringssperma-DNA (10 mg/mL) zugeführt, die zuvor für 10 min bei 95 °C denaturiert und

auf Eis gekühlt wurde. Die Prähybridisierung erfolgte im Hybridisierungssofen für mindestens 30 min bei 68 °C. Anschließend wurde die denaturierte radioaktiv markierte Hybridisierungssonde zugeführt und der Ansatz im Hybridisierungssofen für 1 h bei 68 °C hybridisiert. Im Anschluss an die Hybridisierung wurde die Nitrozellulosemembran (darf auf keinen Fall trocken werden, da die Sonde irreversibel an die Membran bindet und zu erhöhten Hintergrund oder falschpositiven Signalen führt) jeweils für 30 min bei 65 °C in 2x SSC-Puffer (300 mM NaCl + 30 mM Na-Citrat + 1 % SDS, pH 7,4) und 0,2x SSC (30 mM NaCl + 3 mM Na-Citrat + 1 % SDS, pH 7,4) im Hybridisierungssofen gewaschen, um den Hintergrund und unspezifische Signale zu entfernen. Im Anschluss an die Hybridisierung durfte die Membran nicht trocken werden.

#### *Detektion und Dokumentation*

Zur Detektion der radioaktiv markierten Hybridisierungssonden wurde die Nitrozellulosemembran feucht (nicht nass) in Haushaltsfolie eingewickelt und bei -70 °C unter einem X-OMAT AR Röntgenfilm (Kodak) mit der DNA-Seite zum Film in einer Expositionsbox für 1 h bis mehrere Tage inkubiert. Nach der Exposition erfolgte die Entwicklung des Films durch Schwenken in Entwicklerlösung bis zur gewünschten Signalstärke, gefolgt durch jeweils einminütiges Schwenken in Wasser, Fixierlösung und erneut in Wasser. Der entwickelte Film wurde an der Luft getrocknet und per *Scanner* dokumentiert.

## **2.6 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.6.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen**

Proteine wurden nach ihrem molekularen Gewicht mittels der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetrennt. Für die als vertikale Plattenelektrophorese durchgeführte PAGE wurde für kleine SDS-Gele das Hoefer SE 250 System (80 x 70 x 0,75 mm) der Firma Hoefer und für große SDS-Gele das Bio-Rad Protean II System (160 x 200 x 0,75 mm) der Firma Bio-Rad verwendet. Die SDS-Gele und die PAGE wurden gemäß dem technischen Handbuch *Protein Electrophoresis* der Firma Amersham angefertigt und durchgeführt. Die SDS-Gele konnten bis zur Verwendung in nassem Zellulosepapier eingewickelt und in einer Plastiktüte verpackt für maximal eine Woche bei 8 °C aufbewahrt werden. Zur Bestimmung der Größe von Proteinen im SDS-Gel wurden 5 µL des Protein-Größenmarkers Precision Plus Protein™ Standards der Firma Bio-Rad für kleine Gele und 15 µL für große Gele mit aufgetragen.

### *Kontinuierliche SDS-Gelelektrophorese*

Für analytische Zwecke wurden kontinuierliche SDS-Gele verwendet, die aus einem Trenngel (8 %-, 10 %- oder 12 %-Polyacrylamidanteil) und einem Sammelgel (4 %-Polyacrylamidanteil) bestanden.

### *Gradienten-SDS-Gelelektrophorese*

Für die massenspektrometrische Analyse wurden generell Gradienten-SDS-Gele verwendet, die aus einem Trenngel mit zunehmendem Polyacrylamidanteil (5 % - 20 %-Polyacrylamidanteil) und einem Sammelgel (4 %-Polyacrylamidanteil) bestanden.

## **2.6.2 Visualisierung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine**

Für die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden je nach gewünschter Proteinnachweisgrenze drei unterschiedliche Färbemethoden verwendet.

### *Coomassie Brilliant Blau R-250-Färbung*

Für analytische Zwecke wurde Coomassie Brilliant Blau R-250 verwendet, der als tiefblauer Farbstoff unspezifisch an alle Proteine bindet. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 100 ng Protein pro Bande. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine (Kapitel 2.6.1) wurde das Gel in einen Plastikbehälter überführt, mit R-250-Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blau R-250 + 10 % Eisessig + 40 % Ethanol) bedeckt und für 1 h bei RT unter Schütteln gefärbt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Entfärbung des Proteingels erfolgte ebenfalls unter Schütteln in der R-250-Entfärbelösung (10 % Eisessig + 40 % Ethanol).

### *Coomassie Brilliant Blau G-250-Färbung*

Für Proteine, die nachfolgend mittels der Massenspektrometrie analysiert werden sollten, wurde die PageBlue-Proteinstaining-Solution der Firma Fermentas gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Die Nachweisgrenze für diese kolloidale Färbelösung liegt bei 5 ng Protein pro Bande. Der Vorteil dieser Färbelösung liegt in der Kompatibilität mit der Massenspektrometrie. Proteinbanden, die mit dieser Lösung detektiert wurden, konnten ausgeschnitten und direkt für die massenspektrometrische Identifizierung des Proteins verwendet werden. Darüber hinaus bindet Coomassie Brilliant Blau G-250 präferenziell an die Proteine und nicht an die Gelmatrix, was kürzere Entfärbungszeiten und kaum Hintergrundsignale zur Folge hat.

### *Silberfärbung*

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Rabilloud (1990) durchgeführt und hat eine Nachweisgrenze von 1 ng Protein pro Bande. Das Proteingel wurde zur Fixierung der Proteine für 1 h in Fixierlösung (10 % Eisessig + 30 % Ethanol) inkubiert und viermal für jeweils 5 min mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Gel wurde für 1 min in Na-thiosulfat (0,02 %) geschwenkt und zweimal in bidest. H<sub>2</sub>O für jeweils 1 min gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung für 60 min in Silberfärbelösung (0,2 % AgNO<sub>3</sub> + 0,02 % Formaldehyd), gefolgt von zweimaligem Waschen in bidest. H<sub>2</sub>O für jeweils 15 s. Das Gel wurde in Entwicklerlösung (3 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + 0,02 % Formaldehyd + 0,002 % Na-thiosulfat) entwickelt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar wurden und anschließend kurz mit bidest. H<sub>2</sub>O gespült. Die Entwicklung wurde mit Stopplösung (10 % Eisessig + 30 % Ethanol) abgebrochen.

### **2.6.3 Dokumentation gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine**

SDS-Polyacrylamidgele (Kapitel 2.6.1) wurden entweder direkt nach der Visualisierung (Kapitel 2.6.2) der Proteine zwischen zwei durchsichtigen Folien in digitaler Form per *Scanner* dokumentiert oder erst im Vakuumtrockner getrocknet und anschließend in digitaler Form per *Scanner* dokumentiert. Zum Trocknen wurde das Gel auf Filterpapier (3 mm dick) aufgelegt und mit einer Frischhaltefolie bedeckt. Das Filterpapier-Gel-Frischhaltefolie „Sandwich“ wurde mit der Frischhaltefolie-Seite nach oben in den Trockner gelegt und unter Vakuum bei 80 °C für 1 h getrocknet.

### **2.6.4 Überexpression von GST und GST-Fusionsproteinen**

Der in dieser Arbeit verwendete Expressionsvektor pDEST15 (Kapitel 2.3) besitzt einen durch IPTG induzierbaren Promotor, der die zeitlich gesteuerte Expression in *E. coli* gestattet. Das Protein wird an seinem N-terminalen Ende gemeinsam mit einer kurzen (26 kDa) Proteinsequenz (*tag*), der Glutathion-S-Transferase (GST), als Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Der GST-*tag* dient nach der Überexpression für die affinitätschromatographische Aufreinigung von GST oder des GST-Fusionsproteins.

### *Konstruktion des Expressionsvektors*

Für die Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurde die kodierende Sequenz des Proteins per LR-Rekombination (Kapitel 2.5.16.1) aus dem *Entry*-Vektor in den *Destination*-Vektor pDEST15 rekombiniert und gemäß Kapitel 2.5.2 in den *E. coli* Stamm DH10B transformiert. Der Stamm DH10B ist kein Expressions-Stamm und diente lediglich als

Dauerkultur für den Expressionsvektor. Darüber hinaus wurde der Vektor pDEST15-Leer (Kapitel 2.3) für die Expression und Aufreinigung des GST-tags verwendet.

#### *Vorexperimente zur Expression von GST und GST-Fusionsproteinen*

Die Vorexperimente dienten der Selektion von Klonen, die das GST-Protein und die GST-Fusionsproteine am stärksten exprimierten. Der Expressionsvektor wurde gemäß Kapitel 2.5.2 in einen der *E. coli*-Proteinexpressionsstämme (Kapitel 2.1.1) transformiert und auf LB-Selektivmedium (Kapitel 2.2.1) bei 37 °C üN inkubiert. Drei bis vier einzelne Kolonien wurden jeweils in mit 15 mL LB-Selektivmedium-Glc (LB-Selektivmedium + 2 % Glukose) versetzte Erlenmeyerkolben angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C üN inkubiert. 500 µL dieser Kulturen wurden jeweils in mit 10 mL LB-Selektivmedium-Glc (bei 37 °C vortemperiert) versetzte Erlenmeyerkolben überführt, die Ansätze für 3 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und jeweils mit 1 mM IPTG induziert. 500 µL wurden jeweils vor der Induktion und jeweils 2 h und 6 h nach der Induktion entnommen, bei 4 °C und 13200 rpm zentrifugiert und die Sedimente nach dem Entfernen des Überstandes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben konnten bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung (Kapitel 2.6.1) bei -20 °C für mehrere Tage gelagert werden. Im Anschluss an die Elektrophorese erfolgte die Visualisierung der Proteine mittels der Coomassie Brilliant Blau R-250-Färbung gemäß Kapitel 2.6.2. Der Klon, der den GST-tag bzw. das GST-Fusionsprotein am stärksten exprimierte, wurde gemäß Kapitel 2.5.1 als Dauerkultur für die nachfolgenden Experimente gelagert.

#### *Überexpression von GST und GST-Fusionsproteinen*

Mittels der Vorexperimente konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob das Protein nativ im Cytoplasma oder denaturiert in den *inclusion bodies* vorlag. Voraussetzung für eine erfolgreiche Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen ist das Vorliegen des Proteins im nativen Zustand. Hierzu wurde ein frischer Ausstrich aus der Dauerkultur auf LB-Selektivmedium (Kapitel 2.2.1) angesetzt und bei 37 °C üN inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 15 mL LB-Selektivmedium-Glc (siehe oben) in einem Erlenmeyerkolben angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C üN inkubiert. 1 mL, 5 mL oder 10 mL der üN Kultur wurde in einen mit 20 mL, 100 mL oder 200 mL LB-Selektivmedium-Glc gefüllten Erlenmeyerkolben (für die 100 mL und 200 mL Kulturen wurden Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet) überführt, der zuvor entsprechend vortemperiert wurde. Diese Hauptkultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,4 bis 0,9 bei Temperaturen zwischen 28 °C bis 37 °C geschüttelt und mit 0,1 mM oder 1 mM IPTG induziert. Die Kultur wurde nach 3 h Inkubationszeit bei 4 °C und 4000 rpm für

10 min zentrifugiert, das Sediment in 1 mL (bei 200 mL in 2 mL) eiskaltem GST-Lysepuffer (20 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,3 + 150 mM NaCl + 1 mM EDTA + 0,2 % Triton X-100 + 1 mM DTT + 1 mM PMSF + 10 µg/mL Aprotinin + 10 µg/mL Leupeptin + 2 mM Benzamidin) resuspendiert und dreimal per Ultraschall (Sonopuls 2070 der Firma Bandelin Electronic, Berlin; Einstellungen: Leistung = 80 %, Zykluszahl = 30) für jeweils 5 s aufgeschlossen. Zwischen den Ultraschallbehandlungen erfolgte eine Inkubation der Proben auf Eis für jeweils 30 s. Der Ansatz wurde bei 4 °C und 13200 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Sowohl die Probe als auch das Pellet wurden bis zur Aufreinigung gemäß Kapitel 2.6.7 gelagert.

### **2.6.5 Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen**

GST und GST-Fusionsproteine wurden in dieser Arbeit entweder im *Batch*-Verfahren mittels magnetischer Glutathion-Kügelchen oder im kontinuierlichen Verfahren mittels eines automatisierten Systems aufgereinigt.

#### *Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen mittels magnetischer Glutathion-Kügelchen*

Für die Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen im *Batch*-Verfahren wurde das MagneGST™ Pull-Down System der Firma Promega gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Für analytische Zwecke wurden 50 µL, für *in vitro* Interaktions-Tests (Kapitel 2.6.8) 20 µL und für affinitätschromatographische Interaktionstests (Kapitel 2.6.9) 50 µL bis 400 µL an magnetischen Glutathion-Kügelchen eingesetzt.

#### *Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen mittels der Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)*

Zur schnellen und einfachen Aufreinigung von GST und GST-Fusionsproteinen wurde das ÄKTAprime™ FPLC System gekoppelt an eine 1 mL GSTrap™ FF GST-Säule der Firma Amersham gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Die gemäß Kapitel 2.6.4 mittels GST-Lysepuffer und Ultraschall aufgeschlossenen *E.coli*-Zellen wurden für 10 min bei 4 °C und 13200 rpm zentrifugiert, der Überstand entnommen und durch eine 0,45 µm Membran (FP 30/0,45 CA-S, Schleicher & Schuell) von großen Fremdkörpern (z.B. Zelltrümmer) befreit. Das Filtrat wurde mit FPLC-Bindepuffer auf 2 mL aufgefüllt und über einen 2 mL Loop auf die FPLC injiziert. Die GST-Proteine werden nach der Aufreinigung mittels des FPLC-Elutionspuffers spezifisch von der GST-Säule eluiert und zu je 1 mL Fraktionen in 1,5 mL Eppendorfgefäße automatisch aufgefangen. Der zeitliche Verlauf der FPLC-Aufreinigung wurde mittels des UV-Detektors des FPLC Systems und einem vom Hersteller mitgelieferten

Computerprogramm verfolgt und dokumentiert. Der Erfolg der durchgeführten FPLC-Aufreinigung wurde durch ein analytisches SDS-Gel (Kapitel 2.6.1) überprüft, indem 30 µL der jeweiligen Fraktionen auf einem SDS-Gel getrennt wurden.

#### *Aufkonzentrierung von Proteinen*

Für die Aufkonzentrierung von FPLC-aufgereinigten GST-Fusionsproteinen wurden Centricon YM-10 Filtereinheiten der Firma Millipore gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Dieses System, dient sowohl der Aufkonzentrierung als auch dem Austausch des Puffers, in dem das Protein gelöst ist. Es besteht aus einer Säule, die mit einer Membran versehen ist und durch Zentrifugation Proteine > 10 kDa (es gibt auch Säulen zur Aufkonzentrierung von größeren Proteinen) aufkonzentriert.

#### *Dialyse von Proteinen*

Die Dialyse dient dem Austausch des Puffers, indem das Protein gelöst ist. Hierzu wird die Proteinprobe (4 mL) in einen Dialyseschlauch (Spectral/Por MWCO 3500) der Firma Roth überführt, dass an beiden Enden verschlossen und anschließend bei 4 °C für 24 h in einen mit 2 L Zielpuffer (Puffer, in dem das Protein am Ende gelöst vorliegen soll) gefülltes Gefäß getaucht wird. Durch dreimaliges Austauschen des Zielpuffers, das eine andere Zusammensetzung und gleichzeitig ein viel größeres Volumen als das der Proteinprobe hat, wird unter ständigem Rühren zwischen den beiden Puffern ein Konzentrationsgradient erzeugt. Dieser Gradient sorgt für die Diffusion der gelösten Komponenten des Zielpuffers in den Dialyseschlauch und der Komponenten in der Proteinprobe aus dem Dialyseschlauch hinaus in das Gefäß. Proteine > 10 kDa können aufgrund der kleinen Porengröße nicht hindurchdiffundieren.

### **2.6.6 Western-Blot und immunologischer Nachweis von GST-Fusionsproteinen**

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen erfolgte unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese (Kapitel 2.6.1) der Transfer der getrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran, die für ihre hohe Proteinbindungsstärke bekannt ist (van Oss *et al.*, 1987).

#### *Western-Transfer von Proteinen*

Der Proteintransfer erfolgte in Anlehnung an die von Towbin (1979) entwickelte Standardmethode durch Anlegen einer Spannung. Generell wurde das Wet-(Tank)-Blot Verfahren eingesetzt, da bei dieser Methode das transferierte Protein aufgrund des großen Puffervolumens nur geringfügig erwärmt wird. Für den Western-Transfer wurde das Mini

Trans-Blot Cell System der Firma Bio-Rad gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Entscheidend für den erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran ist die Hydrophobizität der Membran (Pluskal *et al.*, 1986), die dadurch erhöht wurde, indem sie vor dem Aufbau des Blots für 15 s in Methanol und anschließend für 5 min in Transferpuffer (25 mM Tris pH 8,3 + 192 mM Glycin) getränkt wurde.

#### *Immunologischer Nachweis von Proteinen*

Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte in Anlehnung an die von Hoffman und Jump (1986) entwickelte Methode. Sowohl der erste Antikörper, (GST Mouse Monoclonal IgG<sub>1</sub>, 200 µg/mL), der gegen den GST-*tag* gerichtet ist, als auch der zweite Antikörper (Goat Anti-Mouse IgG-HRP conjugated, 200 µg/mL), der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, wurden von der Firma Santa Cruz Biotechnology bezogen und bei 6 °C für mehrere Monate gelagert. Die folgenden Inkubations- und Waschschrte wurden unter Schütteln und bei RT durchgeführt. Nach dem Western-Transfer der Proteine wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit TBST (10 mM Tris-HCl pH 7,5 + 0,9 % NaCl + 0,05 % Tween-20) und einmal für 5 min in TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5 + 0,9 % NaCl) gewaschen, gefolgt durch eine zweistündige Inkubation in Blocklösung (5 % Magermilchpulver in TBS). Die Blocklösung sollte unspezifische Antikörper-Bindungsstellen absättigen. Im Anschluss an das Blocken erfolgte eine dreistündige Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper (1:200 in Blocklösung verdünnt). Die Membran wurde dreimal für jeweils 5 min in TBST und einmal für 5 min mit TBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrte erfolgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper (1:4000 in Blocklösung verdünnt). Die Membran wurde wie zuvor beschrieben in TBST und TBS gewaschen und anschließend gemeinsam mit 2 mL Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat (1 mL Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution + 1 mL Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution) der Firma Pierce in Folie eingeschweißt. Während dieser fünfminütigen Inkubation wurde das Reagenz auf der Membran vorsichtig „verrieben“. Die Membran wurde aus der Folie genommen und überschüssiges Reagenz wurde abgetropft.

#### *Detektion und Dokumentation*

Zur Detektion des gebundenen Antikörpers wurde die PVDF-Membran feucht (nicht nass) zwischen zwei durchsichtige Folien gepackt und bei RT unter einem X-OMAT AR Röntgenfilm (Kodak), mit der Protein-Seite zum Film in einer Expositionsbox für 1 min bis 15 min inkubiert. Nach der Exposition erfolgte die Entwicklung des Films durch Schwenken in Entwicklerlösung bis zur gewünschten Signalstärke, gefolgt durch jeweils einminütiges

Schwenken in Wasser, Fixierlösung und erneut in Wasser. Der entwickelte Film wurde an der Luft getrocknet, deckungsgleich auf das getrocknete SDS-Gel gelegt und per *Scanner* dokumentiert.

### **2.6.7 Quantifizierung und Lagerung von Proteinen**

#### *Quantifizierung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine*

Die Quantifizierung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine erfolgte mittels einer Rinderserumalbumin-Standardreihe. Hierzu wurde das zu quantifizierende Protein gemeinsam mit verschiedenen Mengen an Rinderserumalbumin gelelektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.6.1) und visualisiert (Kapitel 2.6.2). Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Vergleich der Farbintensität der zu quantifizierenden Proteinbande mit denen der Rinderserumalbumin-Proteinbanden.

#### *Lagerung von Proteinen*

Viele Proteine verlieren beim Einfrieren und Auftauen ihre Aktivität, deshalb war es das Ziel jeder durchgeführten proteinbiochemischen Arbeit, die Proteinproben frisch anzufertigen und diese noch am selben Tag zu verwenden. Proteinproben, die noch am selben Tage verwendet werden sollten, wurden auf Eis gelagert. Proteinproben, die nicht am selben Tag, jedoch innerhalb weniger Tage verwendet werden sollten, wurden bei -20 °C gelagert. Proteinproben, die nach einer Woche verwendet werden sollten, wurden bei -80 °C für maximal einen Monat gelagert.

### **2.6.8 *In vitro* Interaktionstest**

Der *in vitro* Interaktionstest dient der Verifizierung der im *Yeast Two-Hybrid* System gefundenen Protein-Protein-Interaktionen. Hierzu wurde das MagneGST™ Pull-Down System der Firma Promega gemäß dem Begleitheft des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieses Systems basiert auf der Inkubation des GST-Fusionsproteins, das zuvor an die Glutathion-Matrix gebunden wurde, gemeinsam mit seinem potentiellen Interaktionspartner. Letzteres Protein wird in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin per *in vitro* Transkription/Translation synthetisiert und zeitgleich radioaktiv markiert. Durch mehrmaliges Waschen unter stringenten Bedingungen verbleiben nur das GST-Fusionsprotein und sein Interaktionspartner auf der Glutathion-Matrix, die dann anschließend mittels reduziertem Glutathion spezifisch von der Matrix eluiert werden. Das radioaktiv markierte Protein wird nach der gelelektrophoretischen Auftrennung per Autoradiographie detektiert. In dieser Arbeit wurden parallel zum

Interaktionsansatz zwei weitere Proben, die Negativ-Kontrollen, bearbeitet. Die erste Kontrolle diente dem Nachweis der unspezifischen Bindung des radioaktiv markierten Proteins an die Glutathion-Matrix, indem das markierte Protein nur mit der Glutathion-Matrix inkubiert wurde. Die zweite Kontrolle hingegen diente dem Nachweis der unspezifischen Bindung des radioaktiv markierten Proteins an den GST-tag, indem das markierte Protein mit dem an die Glutathion-Matrix gebundenem GST-tag inkubiert wurde.

#### *Konstruktion des Expressionsvektors für die in vitro Synthese*

Der in dieser Arbeit verwendete Expressionsvektor pDEST17 (Kapitel 2.3) besitzt einen Promotor für die T7 RNA-Polymerase, der in einem Reticulozyten-Lysat aus Kaninchen zeitgleich die *in vitro* Transkription/Translation ermöglicht. Die kodierende Sequenz des Proteins wurde per LR-Rekombination (Kapitel 2.5.16.1) aus dem *Entry*-Vektor in den *Destination*-Vektor pDEST17 rekombiniert und gemäß Kapitel 2.5.2 in den *E. coli* DH10B-Stamm transformiert. Das Protein ist nach der Rekombination an seinem N-terminalen Ende an einem His-tag fusioniert, der im Rahmen dieser Arbeit für den *in vitro* Interaktionstest keine Bedeutung hat.

#### *In vitro Transkription/Translation*

Für die *in vitro* Transkription/Translation wurde 1 µg an pDEST17-Vektor benötigt, der gemäß Kapitel 2.5.3 isoliert und in reinst Qualität aufgereinigt wurde. Die Vektorprobe wurde mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O auf 10 µL aufgefüllt und gemeinsam mit 10 µCi <sup>35</sup>S-Methionin der Firma Amersham in einen mit 40 µL TNT® T7 Quick Master Mix (TNT-Mix) gefülltes 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Der TNT-Mix ist das Reticulozyten-Lysat und sorgt für die *in vitro* Transkription/Translation von Genen, die stromabwärts des T7 RNA-Polymerase Promotors kloniert wurden. Der Ansatz wurde für mindestens 1 h bis maximal 1,5 h bei 30 °C inkubiert. Der Erfolg der durchgeführten *in vitro* Transkription/Translation wurde durch ein SDS-Gel (Kapitel 2.6.1) überprüft, indem 1 µL des Ansatzes in einem SDS-Gel getrennt wurde. Die restlichen 49 µL des Ansatzes wurden für den Interaktionstest verwendet.

#### *Immobilisierung von GST und GST-Fusionsproteinen an die Glutathion-Matrix*

Vor der Immobilisierung von GST und GST-Fusionsproteinen an die Glutathion-Matrix mussten die Protein-Konzentrationen im *E. coli*-Lysat mittels einer Rinderserumalbumin-Standardreihe gemäß Kapitel 2.6.7 ermittelt werden. Anschließend wurden jeweils 20 µL Glutathion-Matrix in drei 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt und dreimal mit jeweils 250 µL W/B-Puffer präequilibriert. Jedes der drei Ansätze wurde jeweils mit 10 µL einer 20 %igen BSA-Lösung versetzt, mit W/B-Puffer auf 100 µL aufgefüllt und für 30 min bei RT unter

Schütteln inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen an die Glutathion-Matrix zu blocken. Nach der Inkubation wurde das erste Eppendorfggefäß (erste Negativ-Kontrolle) mit W/B-Puffer auf 400  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Das zweite Eppendorfggefäß (zweite Negativ-Kontrolle) wurde mit der entsprechenden Menge an GST aus dem *E. coli*-Lysat versetzt und mit W/B-Puffer auf 400  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Das dritte Eppendorfggefäß (Interaktionsansatz) wurde mit der gleichen Proteinmenge an GST-Fusionsprotein (50 ng – 200 ng) versetzt, die für die zweite Negativ-Kontrolle verwendet wurde, und ebenfalls mit W/B-Puffer auf 400  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Alle drei Ansätze wurden für 30 min bei RT unter Invertieren inkubiert, anschließend dreimal mit jeweils 250  $\mu\text{L}$  W/B-Puffer gewaschen und die Glutathion-Matrix in jeweils 20  $\mu\text{L}$  W/B-Puffer aufgenommen.

#### *In vitro Interaktionstest*

Für den *in vitro* Interaktionstest wurden jeweils 5  $\mu\text{L}$  aus dem zuvor beschriebenen Immobilisierungsansatz erneut in drei 1,5 mL Eppendorfggefäße überführt und jeweils mit 27  $\mu\text{L}$  W/B-Puffer, 10  $\mu\text{L}$  BSA (20 %ig) und 148  $\mu\text{L}$  W/B-Puffer (+ 0,5 % NP40) versetzt. Die Ansätze wurden mit jeweils 10  $\mu\text{L}$  *in vitro* Transkription/Translation Produkt (siehe oben) versetzt und für 1 h bei RT unter ständigem Invertieren inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze zehnmal mit jeweils 400  $\mu\text{L}$  W/B-Puffer (+ 0,5 % NP40) gewaschen und die Proteine durch fünfinütige Inkubation der Matrix in 30  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer (gelegentlich rühren) spezifisch von der Matrix eluiert. Die Überstände wurden gemäß Kapitel 2.6.1 gelelektrophoretisch aufgetrennt und das SDS-Gel anschließend gemäß Kapitel 2.6.2 im Vakuumtrockner getrocknet.

#### *Detektion und Dokumentation*

Zur Detektion des radioaktiv markierten Proteins wurde das getrocknete SDS-Gel in durchsichtiger Frischhaltefolie eingewickelt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  unter einem X-OMAT AR Röntgenfilm (Kodak) mit der SDS-Gel-Seite zum Film in einer Expositionsbox für einen Tag bis mehrere Tage inkubiert. Nach der Exposition erfolgte die Entwicklung des Films durch Schwenken in Entwicklerlösung bis zur gewünschten Signalstärke, gefolgt durch jeweils einminütiges Schwenken in Wasser, Fixierlösung und erneut in Wasser. Der entwickelte Film wurde an der Luft getrocknet, anschließend deckungsgleich auf das getrocknete SDS-Gel gelegt und per *Scanner* dokumentiert.

### 2.6.9 Affinitätschromatographischer Interaktionstest

Bei dieser Methode wurde die cytoplasmatische Domäne des Cytokininrezeptors AHK3 als GST-Fusionsprotein an die Glutathion-Matrix gebunden und anschließend mit Proteinextrakt aus *A. thaliana* inkubiert, um nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine neue Interaktionspartner mittels Massenspektrometrie zu identifizieren.

#### *Überexpression von GST-AHK3 und Immobilisierung an die Glutathion-Matrix*

Für den affinitätschromatographischen Interaktionstest sollte die Glutathion-Matrix mit dem GST-AHK3 Fusionsprotein zunächst gesättigt werden. Aus diesem Grund wurde das Fusionsprotein gemäß Kapitel 2.6.4 im präparativen Maßstab exprimiert und gemäß Kapitel 2.6.5 an die Glutathion-Matrix (400 µL) gebunden und gereinigt. Der gesamte Ansatz wurde für den Interaktionstest eingesetzt.

#### *Proteinextraktion aus A. thaliana*

Die Proteinextraktion aus *A. thaliana* erfolgte im Kühlraum bei 4 °C aus 5 g Pflanzenmaterial, das gemäß Kapitel 2.5.7 kultiviert und bei -80 °C gelagert wurde. Die für den Aufschluss und für die Proteinextraktion verwendeten Materialien und Lösungen wurden für einen Tag im Kühlraum bei 4 °C vortemperiert. Das Pflanzenmaterial wurde für 5 min in 6 mL GST-Lysepuffer (20 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,3 + 150 mM NaCl + 1 mM EDTA + 0,2 % Triton X-100 + 1 mM DTT + 1 mM PMSF + 10 µg/mL Aprotinin + 10 µg/mL Leupeptin + 2 mM Benzamidin) gemörsert, der gesamte Ansatz in 2 mL Eppendorfgefäße überführt und für 10 min bei 4 °C und 13200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde ein zweites Mal zentrifugiert, der neue Überstand mittels einer 0,45 µm Membran von restlichen Zelltrümmern befreit und mit GST-Lysepuffer auf 10 mL aufgefüllt. Der affinitätschromatographische Interaktionstest wurde noch am selben Tag durchgeführt und bis dahin die Probe auf Eis gelagert.

#### *Affinitätschromatographischer Interaktionstest*

Das an die Glutathion-Matrix gebundene Fusionsprotein wurde gemeinsam mit dem Proteinextrakt aus *A. thaliana* für 1 h bei 4 °C unter Invertieren inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz viermal mit jeweils 1 mL W/B-Puffer (+ 0,5 % NP40) gewaschen und mit 150 µL Elutionspuffer eluiert. Der gesamte Elutionsansatz wurde gemäß Kapitel 2.6.1 auf einem großen SDS-Gradientengel aufgetrennt, gemäß Kapitel 2.6.2 wurden die Proteine durch Coomassie Brilliant Blau G250-Färbung visualisiert und die potentiellen Interaktionspartner aus dem Gel ausgeschnitten. Das Gel wurde in 1 mm Würfel zerlegt, mit sterilem bidest. H<sub>2</sub>O

bedeckt und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20 °C für mehrere Tage bis maximal eine Woche gelagert.

#### *Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse*

Die Probenvorbereitung diente der Fragmentierung des Proteins mittels Trypsin und erfolgte in Anlehnung an die von Gobom *et al.* (2001) beschriebene Methode. Hierzu wurde das in Würfel zerlegte SDS-Gel zunächst mit 400 µL Isopropanol (25 %) versetzt und durch Inkubation bei RT für 30 min von restlicher G250-Färbelösung befreit. Anschließend wurde die Probe für 10 min im Speedvac getrocknet und in 5 µL Proben-Puffer (5 mM DTT, 5 mM n-Octylglucopyranosid (n-OGP), 20 mM Tris, pH 7,8) aufgenommen, der mit 12 ng/µL Trypsin der Firma Promega und mit Kalibrierungsstandards (Angiotensin I, 1 pmol/µL und ACTH, 2 pmol/µL), deren Autoproteolyseprodukte bekannt sind, versetzt wurde. Im Anschluss an die Inkubation üN bei 37 °C wurde dem Ansatz 5 µL 0,4 % Trifluoressigsäure (TFA) / 5 mM n-OGP beigemischt und die Inkubation bei RT für 1 h fortgesetzt. Der Ansatz wurde nach der Inkubation mit 5 µL an 0,2 % TFA / 5 mM n-OGP versetzt und bis zur Präparation der Probenplatte bei -20 °C gelagert.

#### *Vorbereitung der Probenplatte für die massenspektrometrische Analyse*

Die Probenplatte (AnchorChip 400/384, Bruker Daltonik, Bremen) ist mit einem teflonähnlichem Material beschichtet (5 µm dick) und mit einem *Array* aus 384 circularen (400 µm Durchmesser) Einbuchtungen versehen, deren Boden aus rostfreiem Stahl besteht und als Proben-Anker dient. Die Vorbereitung der Probenplatte erfolgte in Anlehnung an die von Gobom *et al.* (2001) beschriebene  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure (CHCA)-Methode, indem 100 µL der hydrophoben CHCA-Lösung (100 g/L CHCA in 90 %igem Aceton, 0,005 % TFA) auf die Probenplatte aufgetropft wurde. Ein Teflonstäbchen wurde quer über die Probenplatte aufgelegt und mit der CHCA-Lösung in Kontakt gebracht, so dass die Lösung zwischen der Probenplatte und unter der Kontaktfläche des Teflonstäbchens einen Film bildete. Der Teflonstab wurde nun, ohne abzuheben, über die gesamte Probenplatte gezogen, so dass jeder der hydrophilen Proben-Anker auf der Probenplatte eine kleine Menge der CHCA-Lösung adsorbierte. Nach dem Eintrocknen der Lösung lag das CHCA in den Anker kristallin vor und bildete die Matrix für die Proteinproben. Die mittels Trypsin verdauten und eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und durch Zugabe von TFA (0,2 % Endkonzentration) angesäuert. 0,5 µL der Probe wurde auf die CHCA-Matrix aufgetropft und nach 2 min die überschüssige Probe mittels Zellulosepapier vorsichtig entfernt. Die Proben waren nun bereit für die massenspektrometrische Analyse.

*Durchführung der massenspektrometrischen Analyse im MALDI-TOF-MS*

Die Massenspektren der Peptidfragmente wurden im Bruker Scout 384 Reflex III Instrument der Firma Bruker Daltonik und der mitgelieferten Software XMASS 5.0 aufgenommen. Für jede Probe wurden bei einer Beschleunigungsenergie von 25 kV mehrere Einzelspektren akkumuliert, die einen charakteristischen sogenannten Peptidmassenfingerprint lieferten (Gobom *et al.*, 2001). Diese wurden dann anschließend für die MS/MS Analyse im MALDI-TOF/TOF verwendet. Die MS/MS Analyse wiederum liefert durch weitere Fragmentierung selektierter Peptide sogenannte Fragmentationenfingerprints (Gobom *et al.*, 2001). Sowohl die Peptidmassenfingerprints als auch die Fragmentationenfingerprints wurden für die Proteinidentifizierung verwendet, indem die MASCOT-Software der Firma Matrix-Science und die NCBI-Proteinsequenzdatenbank (Mirgorodskaya *et al.*, 2005). Dabei wurde eine Massenabweichung von 30 ppm toleriert und Oxidationen von Methioninresten wurden als mögliche Modifikationen betrachtet (Gobom *et al.*, 2001).