

Biochemie

Vertiefungspraktikum I

Arbeiten mit dem Lambda-Phagen

17.04.2000 bis 03.05.2000

Betreuer: Dr. Kai Erdmann

Sven Enterlein
108 097 236 174

Gliederung:

I	Der λ-Phage	2
	Aufbau	2
	Adsorption	2
	Stadien.....	2
II	Herstellung einer Phagenbibliothek	3
	Einleitung	3
	cDNA Synthese.....	3
	Erstellen der Library	3
III	Bestimmung des Titers einer Phagenbibliothek	3
	Einleitung	3
	Durchführung	3
	Material.....	3
	Vorbereitungen.....	4
	Bakteriensuspension.....	4
	Phagensuspension	4
	Präadsorption	4
	Agar-Platten.....	4
	Titerbestimmung	4
	Ergebnisse und Auswertung	5
IV	Restriktionsanalyse und Screening	5
	Einleitung	5
	Restriktion	5
	Southern-Blot.....	5
	Nachweis der DNA-Sonde.....	6
	Durchführung	7
	Material.....	7
	Restriktion	7
	Agarose-Gelelektrophorese (I)	7
	Extraktion der DNA aus dem Gel	7
	Agarose-Gelelektrophorese (II)	8
	Southern-Blot.....	8
	Nachweis der DNA-Sonde.....	8
	Phagen-Screening (I)	9
	Feinscreening	9
	Liquid lysate.....	9
	Screening (II)	10
	Ergebnisse und Auswertung	10
	Nachweis der DNA-Sonde.....	10
	Phagen-Screening (I)	11
	Screening (II)	11
	Feinscreening.....	11
	Liquid lysate.....	11
V	Two-hybrid System	12
	Einleitung	12
	Grundlagen	12
	β -Galactosidase Assay	13
	Durchführung	13
	Material.....	13
	Vorbereiten der Hefen.....	13
	Transformation	14
	Ausplattierung.....	14
	β -Galactosidase Assay	14

Ergebnisse und Auswertung	14
Y190 - Wachstum	14
Y190 - β -Galactosidase Assay.....	15
HF7c - Wachstum	15
HF7c - β -Galactosidase Assay	15

I Der λ -Phage

Aufbau

Der Bakteriophage λ (Abb. 1) ist der am besten untersuchte Virus der Molekularbiologie. Er besteht aus einem 55 nm durchmessenden icosahedralen Kopf und einem 15 bis 135 nm langem flexiblen Schwanz, der mit einer dünnen Faser am Ende versehen ist. Das Virion enthält eine 48,502 bp lange doppelsträngige B-DNA mit bekannter Sequenz.

Adsorption

Mit Hilfe der Faser adsorbiert der Phage an ein Maltose-Transportprotein (Genprodukt des *lamB*-Gens) von *E. coli*. Durch einen noch nicht genau bekannten Mechanismus wird die λ DNA in das Bakterium inseriert und aufgrund der klebrigen Enden (12 Nukleotide lang) zirkularisiert (Abb. 2, 1 und 2). Die Superstruktur wird durch Wirtsenzyme (DNA-Ligase und –Gyrase) eingeführt.

Stadien

Der λ -Phage kann nun zwischen zwei Stadien entscheiden: dem lytischen und dem lysogenen (Abb. 2). Auf beide soll hier nur kurz eingegangen werden, da sie für den Versuch nicht entscheidend sind. Die Regulation erfolgt über ein zentrales Protein, den λ -Repressor.

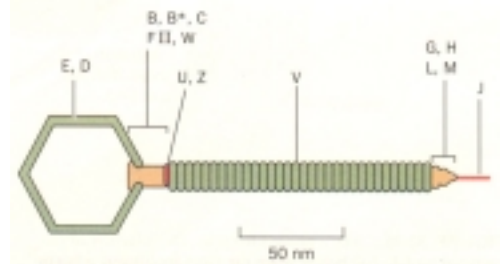


Abb. 1: Schematische Darstellung des λ -Phagen. Die Buchstaben geben die Proteine bestimmter Gene an. (Quelle: Voet/Voet: "Biochemistry", p. 1089, 2nd ed. 1995, John Wiley)

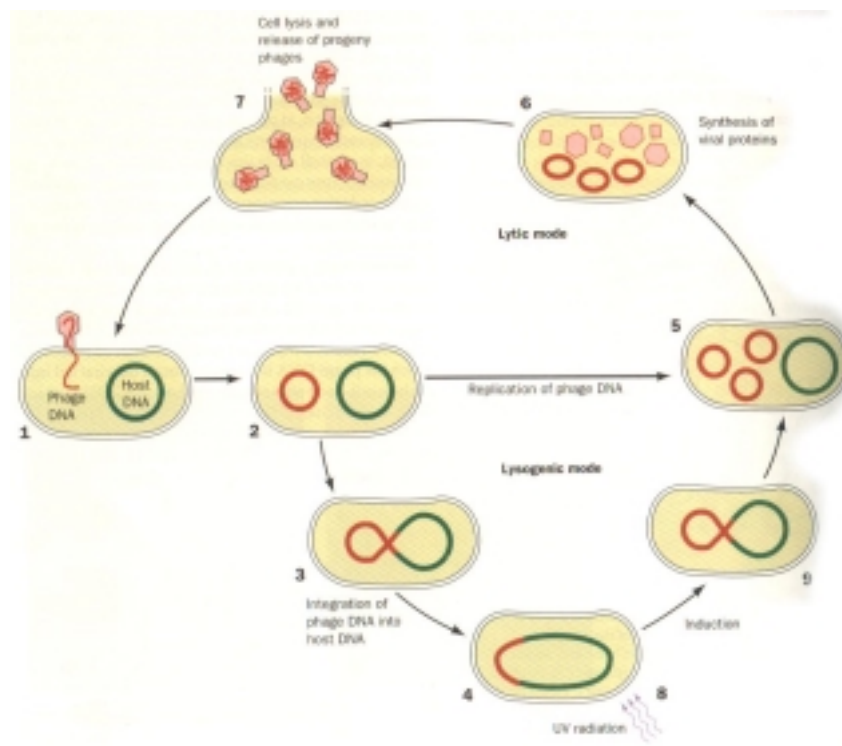


Abb. 2: Lebenszyklus des λ -Phagen. Die einzelnen Stadien sind im Text kurz angesprochen. (Quelle: Voet/Voet: "Biochemistry", p. 1090, 2nd ed. 1995, John Wiley)

Wird der *lytische Weg* eingeschlagen, so wird die λ DNA repliziert und anschließend in vielen Kopien die viralen Proteine synthetisiert (5). Diese werden zusammengebaut (6) und verlassen die Bakterienzelle, die dabei aufplatzt (7).

Beim *lysogenen Zyklus* hingegen wird die λ DNA in das Genom der Wirtszelle integriert (3) und ist inaktiv; man nennt diese dann *Prophage*. Wird in der Zelle eine SOS-Antwort ausgelöst (z.B. durch UV-Strahlung, 8, oder Nahrungsmangel), so wird der lytische Weg aktiviert (9).

II Herstellung einer Phagenbibliothek

Einleitung

cDNA Synthese

Unter einer cDNA (*complementary* oder *copy DNA*) versteht man die doppelsträngige DNA-Kopie einer mRNA. Aus der interessierenden RNA wird mit Hilfe der reversen Transkriptase eine komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Als Primer können oligo(dt) oder Zufallsprimer (6-10mere) dienen, die oftmals noch Schnittstellen für Restriktionsenzyme beinhalten. Das entstehende RNA-DNA-Hybridmolekül wird durch alkalische Behandlung (a) oder RNase H (b) *teilweise* vom RNA-Strang befreit. Den zweiten Strang erhält man durch ein Teilstück der DNA-Polymerase I, dem Klenow-Fragment; ihm fehlt die 5' \rightarrow 3' Exonuklease-Aktivität. Im Falle (a) wird die Haarnadelschleife und in Fall (b) werden kurze RNA-Fragmente, die vom RNase-Verdau übrig geblieben sind, als Primer benutzt. Bei (a, veraltet) muss die Haarnadelschleife noch durch eine S1-Nuklease aufgeschnitten werden, bei (b) müssen die Einzelfragmente durch eine Ligase verknüpft werden.

Den Umweg über revers transkribierte mRNA wählt man, da eukaryontische DNA meist Introns enthält, die in prokaryontischen Systemen wie *E. coli* nicht prozessiert werden.

Erstellen der Library

Setzt man die Gesamtheit der cDNAs aller mRNAs einer Zellkolonie zur Klonierung ein, so spricht man von einer cDNA-Bibliothek.

Die Übertragung der DNA in den Wirtsorganismus erfolgt über Vektoren, die Plasmide, temperente Phagen oder Cosmide sein können. Die DNA kann entweder ein Stück Wirts-DNA ersetzen (Substitution) oder eingefügt werden (Insertion). Für Expressionsvektoren ist oftmals noch ein Promoter voranzusetzen, um die Expressionsrate zu erhöhen oder kontrollieren zu können. Für die Verknüpfung wird die Wirts-DNA mit Enzymen geschnitten, so dass zu den *sticky ends* der Vektoren komplementäre Überhänge entstehen. Hat eines der beiden DNA-Moleküle *blunt ends*, d.h. keine Überhänge, so können Linker mit einer Ligase angefügt werden, oder aber auch direkt der Vektor. Um die DNA-Moleküle in den Wirtsorganismus zu bekommen, können Phagen eingesetzt werden, die ihre DNA in die Zelle injizieren. Dafür wird die concatemere Phagen-DNA in Phagenköpfe verpackt und die Zellen anschließend infiziert.

III Bestimmung des Titers einer Phagenbibliothek

Einleitung

Für die Untersuchungen mit Hilfe von Phagen aus einer Bibliothek ist es wichtig zu wissen, wieviele Phagen tatsächlich an Bakterien adsorbieren und ihre genetische Information übertragen. Dazu bestimmt man den Titer der Phagensuspension.

Messgröße bei der Bestimmung ist die Anzahl von lysierten Bakterien, die als freie Stellen (Plaques) im Bakterienrasen sichtbar sind. Die zu berechnende Größe bezeichnet man auch als *pfu* (*plaque forming unit/ml*). Sie ergibt sich aus der Anzahl der Plaques *P*, dem Verdünnungsfaktor *VF* und dem ausplattierten Volumen V_{pl} der Verdünnung über:

$$\frac{P}{V_{pl}} \times VF = pfu / ml \quad \text{Gleichung 1}$$

Mit der *pfu*-Zahl berechnet man die Verdünnungen der Phagen-Stammlösung, um eine bestimmte Plaquedichte auf Kulturplatten oder Phagendichte in Suspension zu erhalten.

Durchführung

Material

- LB-Medium (pro Liter: 10 g NaCl, 10 g Bacto-pepton, 5 g Hefeextrakt, pH 7.4)
- 20%ige Maltoselösung (in Wasser)

- 10 mM MgSO₄-Lösung
- 1.5% Bacto-Agar in LB-Medium
- Top-Agar (0.7% Agarose in LB-Medium)
- Phagen-Suspensionsmedium (SM: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM MgSO₄, 0.1 M NaCl, 0.01% Gelatine)
- Phagen-Stammlösung (λ gt 10) mit einer cDNA-Bibliothek aus Mausgehirn
- Mikrowelle, Wasserbad, Heizblock, Inkubationsschrank
- Reagenzgläser, Greiner-Röhrchen, Eppendorfgefäße, kl. Kulturschalen
- Pasteur- und Messpipetten

Vorbereitungen

Als erstes wurden die Medien angesetzt. Zur Sterilisierung wurden das LB-Medium und die beiden Agar autoklaviert (dadurch ging auch der Agar in Lösung). Die Maltose- und Magnesiumsulfatlösung wurden über einen 0.2 μ m Filter sterilfiltriert.

Bakteriensuspension

In vier sterile Reagenzgläser wurden je 5 ml LB-Medium und 50 μ l Maltoselösung pipettiert. Von einem Bakterienausstrich (C600) wurde je eine Kolonie mit einer abgeschmolzenen Pasteurpipette abgenommen und in einem der Reagenzgläser abgelöst. Ein Reagenzglas diente als Kontrolle und wurde daher nicht mit Bakterien angeimpft. Die präparierten Gläser wurden über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Reagenzgläser in je ein Greiner-Röhrchen überführt und bei 4000 rpm (3023g) und 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Nach dem Abdekantieren wurden die erhaltenen Pellets mit einer Pipette in insgesamt 3 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und so vereinigt. Pro Reagenzglas mit Bakterien wird 1 ml 10 mM MgSO₄ benötigt.

Phagensuspension

Von der ausgegebenen Phagen-Stammlösung wurde von jedem der drei Praktikanten folgende Verdünnungsreihe aufgestellt: 1:1000, 1:10.000, ..., 1:1 \times 10⁻⁷ (alle Verdünnungen mit SM-Medium). Die erste Verdünnung erhielt man durch Zugabe von 2 μ l Stammlösung zu 1.998 ml SM-Medium. Die weiteren Verdünnungen wurden durch Zugabe von 10 μ l der vorigen Verdünnung zu 90 μ l SM hergestellt.

Präadsorption

Jeder Praktikant legte in fünf Eppendorfgefäße je 200 μ l der Bakteriensuspension vor und pipettierte je 10 μ l einer Verdünnung der Phagensuspension hinzu. Die Ansätze wurden kurz gevortext und dann ca. 30 min bei 37 °C inkubiert. In diesem Schritt adsorbieren die Phagen an die Bakterien.

Agar-Platten

Nach dem Autoklavieren ließ man den LB-Agar auf etwa 50-60 °C abkühlen und goss soviel in die Kulturschalen, dass der Boden gut bedeckt war. Nicht benötigte Platten wurden auf dem Deckel stehend bei Raumtemperatur gelagert. Vor dem Gebrauch wurden die Platten einige Zeit bei 42 oder 37 °C vorgewärmt.

Titerbestimmung

Der Top-Agar wurde in der Mikrowelle verflüssigt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Leistung der Mikrowelle nicht zu hoch und der Deckel der Flasche nur lose aufgeschraubt ist. In 15 (für jeden Praktikanten fünf) Greiner-Röhrchen wurden je 3 ml Top-Agar pipettiert und im Wasserbad auf 45 °C temperiert. Dann wurden die präadsorbierten Bakterien (s.o.) komplett in jeweils ein Greiner-Röhrchen gegeben und nach kurzem Vortexen auf eine vorgewärmte Agar-Platte gegossen. Um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen, wurde die Platte kurz hin- und herbewegt. Nachdem alle Ansätze erstarrt waren, wurden die Platten auf dem Deckel liegend bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

Die so erhaltenen Ergebnisse (s.u.) wurden benutzt, um das benötigte Volumen an Phagensuspension für das Screening abschätzen zu können. Zusätzlich wurden zur Kontrolle noch drei große Kulturplatten vorbereitet. Die Durchführung erfolgte wie bei den kleinen Platten, jedoch wurden 7 ml Top-Agar pro Platte eingesetzt. Aus dem unten angegebenen Titer wurde das benötigte Volumen Phagensuspension errechnet; es sollten etwa 40,000 pfu pro Platte aufgetragen werden:

$$\frac{40,000}{1.55 \times 10^{10}} = 2.58 \times 10^{-3} / \mu\text{l}$$

Die Stammlösung wurde 1:5,000 verdünnt (2 μ l Phagen-Stammlösung auf 10 ml SM), um viel Volumen zu bekommen, aber wenig Stammlösung einzusetzen. Davon wurden je 12.9 μ l zu den Bakterien (200 μ l) zur Präadsorption pipettiert.

Ergebnisse und Auswertung

Die Auswertung erfolgte wie erwähnt nach Gl. 1 über die Anzahl der Plaques:

Platte	Anz. Plaques	Verd.faktor	<i>pfu/ml</i>
3	1266	10^5	1.27×10^{10}
4	158	10^6	1.58×10^{10}
5	22	10^7	2.2×10^{10}
Mittelwert			1.68×10^{10}

Die Mittelwerte der anderen Praktikanten waren 1.47×10^{10} bzw. 7×10^{10} . Letzterer Wert wurde bei der Bestimmung des Titors als Ausreißer nicht berücksichtigt. Damit ergibt sich ein durchschnittlicher Titer von 1.55×10^{10} *pfu/ml*.

Die Kontrolle der Phagenanzahl auf den großen Platten ergab eine *pfu*-Zahl von etwa 20-30,000 pro Platte, weshalb für das eigentliche Screening (s.u.) die anderthalbfache Menge Phagensuspension eingesetzt wurde. Der Titer stellt also nur eine Näherung dar.

IV Restriktionsanalyse und Screening

Einleitung

Restriktion

Erst Restriktionsenzyme haben der Gentechnologie die rasche Entwicklung ermöglicht. Mit ihnen lassen sich DNA-Moleküle an spezifischen Stellen schneiden (Typ II). Meist handelt es sich bei den Erkennungssequenzen um eine palindromische Abfolge von Nukleotiden. Das Schneiden der Stränge kann dann entweder direkt an dieser oder einer weiter entfernten Stelle stattfinden. Die entstehenden Fragmente wiederum können glatte Enden (*blunt ends*) haben, d.h. es werden beide Einzelstränge hinter demselben Basenpaar geschnitten, oder klebrige (*sticky ends*). Hierbei erfolgt der Schnitt einer der beiden Stränge weiter vor oder hinter dem komplementären Nukleotid, bei dem der andere geschnitten wird. In unserem Versuch kommen *EcoRI* und *BamHI* zum Einsatz:

Enzym	Erkennungssequenz
<i>EcoRI</i>	G ^v AATC
	CTTAA _^ G
<i>BamHI</i>	G ^v GATCC
	CCTAG _^ G

Quelle: Stryer: "Biochemie", S. 125, 4. Aufl., Spektrum-Verlag

Eine der Anwendungsmöglichkeiten ist die Fusion eines DNA-Fragments, das bestimmte Gene enthält, mit dem Plasmid eines Bakteriums, um es so zur Expression zu bringen. Dafür werden sowohl das Plasmid als auch die Fusions-DNA entweder mit demselben Restriktionsenzym gespalten, oder mit zwei verschiedenen, die aber gleiche klebrige Enden erzeugen. Durch die klebrigen Enden kann das Fragment mit dem Plasmid unter geeigneten Bedingungen (Ligase) verknüpft werden.

Wie auch bei anderen Enzymen ist es sinnvoll, ein Maß für die katalytische Aktivität zu finden. Als Bezugssystem wählte man die DNA des Lambda-Phagen: Ein Unit ist die Menge an DNA (in μ g), die von dem Enzym in einer Stunde komplett geschnitten wird. Dabei geht die Anzahl der Schnittstellen indirekt mit ein. Um die Unitzahl für eine Problemstellung zu berechnen, benutzt man folgende Gleichung:

$$U = \frac{\text{Schnittstellen Fragment}}{\text{Schnittstellen } \lambda} \times \frac{50.000 \text{ bp}}{\text{Größe Fragment}} \times m_{\text{Fragment}} \quad \text{Gleichung 2}$$

Southern-Blot

Der Southern-Blot dient dazu, durch Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine gewünschte Sequenz hin zu untersuchen. Dazu transferiert man die im Gel enthaltene Substanz entweder durch ein elektrisches Feld (Elektroblot) oder durch die Kapillarwirkung von Filterpapier (Kapillarblot) auf eine Membran (meist Nylon oder Nitrocellulose). Auf dieser ist die DNA für Detektionsreagentien wieder erreichbar.

Ein Kapillarblot – wie er auch in unserem Versuch eingesetzt wurde – hat schematisch folgendes Aussehen:

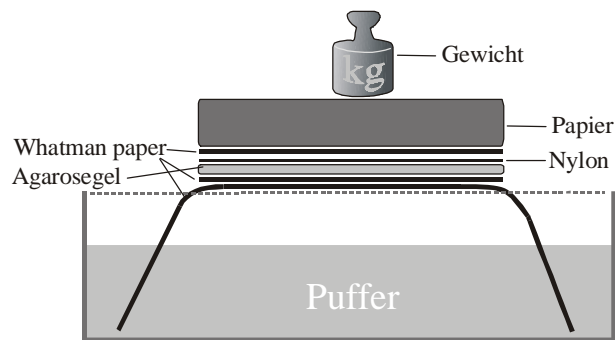


Abb. 3: Aufbau eines Kapillar-Southern-Blots.

Das unterste, lange Whatman-Papier taucht in das Pufferreservoir ein und dient als Salzbrücke; es ist mit dem Puffer (hier 20x SET) getränkt. Die weiteren Whatman-Papiersichten verstärken den Kapillareffekt. Dadurch werden die im Gel enthaltenen Substanzen herausgewaschen und auf das Nylon gebracht. Damit kein „Kurzschluss“ entsteht, also die oberen Schichten direkten Kontakt mit der Salzbrücke haben, werden diese Stellen mit altem Röntgenfilm bedeckt.

Nachweis der DNA-Sonde

Der Nachweis der durch den Blot transferierten DNA erfolgt mittels eines Digoxigenin-markierten DNA-Fragments (Abb. 4). Digoxigenin (DIG) ist ein Derivat des Digoxins und dient als Hapten. Es wird kovalent an ein dNTP gebunden und dann in die DNA als Basenanalogon eingebaut. So erzeugte DNA-Fragmente werden mit der DNA auf der Blot-Membran hybridisiert und anschließend fixiert.

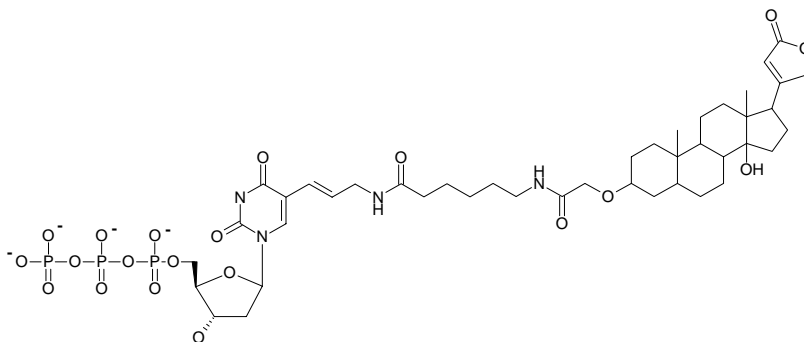


Abb. 4: Strukturformel von Digoxigenin, das an Desoxyuridin über einen Linker gebunden ist. Durch ihn wird eine Flexibilität erreicht, die den Angriff des Antikörpers erleichtert.

Durch monoklonale Antikörper, die spezifisch für DIG sind, können dann die markierten Fragmente erkannt und sichtbar gemacht werden. Die Visualisierung erfolgt gewöhnlich mit Hilfe von Enzymen, die an die Antikörper gekoppelt sind und eine leicht nachweisbare Reaktion katalysieren. Oft werden dazu eine Peroxidase (POD) oder alkalische Phosphatase (AP) eingesetzt. Für unseren Versuch wurden AP-gekoppelte Antikörper verwendet, die als Substrat CDP-StarTM umsetzen:

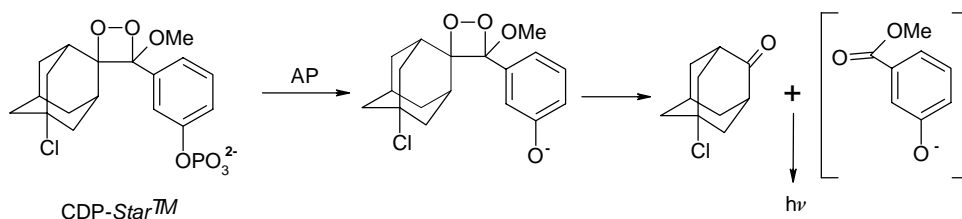


Abb. 5: Umsetzung des Substrats CDP-Star durch die alkalische Phosphatase (AP). Nachgewiesen wird das freiwerdende Licht $h\nu$.

Dabei entsteht Licht (*Chemilumineszenz*), das bei hoher Intensität mit bloßem Auge sichtbar ist. Mit einem speziellen Film, der dem Röntgenfilm ähnelt, kann das entstandene Muster zur Auswertung festgehalten werden.

Durchführung

Material

Restriktion

- DNA-Lösung (PGBT 9-Vektor; enthält die cytoplasmatische Domäne des Semaphorin)
- Enzymlösungen von *Bam*HI und *Eco*RI (10 U/ μ l)
- 2x Puffer Y+/Tango mit BSA
- DNA-Probenpuffer (Bromphenolblau, Xylenylnolblau)
- TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 ; TEB mit Borat)
- 1.5% Agaroselösung in TEB
- Elektrophoresekammer
- Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)
- Neutralisationslösung (1.0 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl)
- 20x SSC-Stammlösung (3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 7.0)
- N-Laurylsarcosin-Lösung (10% w/v in H₂O, sterilfiltriert)
- SDS Lösung (10% w/v in H₂O, sterilfiltriert)
- Maleinsäurepuffer (0.1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl, pH 7.5)
- Blocking-Reagenz-Stammlösung (10% in Maleinsäure)
- Blocking-Puffer (1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Maleinsäurepuffer)
- Waschpuffer (0.3% Tween20 in Maleinsäurepuffer)
- Waschlösung 2x bzw. 0.5x (2x bzw. 0.5x SSC, 0.1% SDS)
- Standard-Hybridisierungspuffer (5x SSC, 0.1% N-Laurylsarcosin, 0.02% SDS, 1% Blocking-Reagenz)
- Detektions-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl)
- Film (Hyperfilm EC2)

DNA-Extraktion

- QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (QIAGEN)

Southern-Blot

- 20x SET ()
- Denaturierungslösung (2.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)

Nachweis der DNA-Sonde

- Hexanukleotid random mix (10x)
- dNTP labeling mix (10x)
- Lösung von Klenow-Fragment
- Kontroll DNA
- 200 mM EDTA, pH 8.0

Restriktion

Die Restriktion wurde dreifach angesetzt, von jedem Praktikanten einmal.

In einem Eppendorfgefäß wurden 9 μ l aqua bidest und 4 μ l 2x Puffer vorgelegt. Von der zu untersuchenden DNA wurden 5 μ l, von den beiden Restriktionsenzymen je 1 μ l hinzu pipettiert. Die Restriktion erfolgte über etwa 135 min bei 37 °C. Sie wurde durch Zugabe von 5 μ l DNA-Probenpuffer gestoppt.

Agarose-Gelelektrophorese (I)

Für das Gel wurden 1.5 g Agarose mit 1x TEB auf 100 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle erhitzt. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurden von der Lösung 30 ml in ein 50 ml Falcon-Röhrchen abgefüllt und mit 2 μ l Ethidiumbromid-Lösung versetzt.

Eine große Elektrophoresekammer wurde mit einem Tropfen der Agaroselösung versiegelt, mit einem Kamm versehen und dann etwa 0.4 cm hoch befüllt. Nach dem Erkalten wurde in die Vorratskammern der Laufpuffer gefüllt und der Kamm vorsichtig entfernt. Es wurden (soweit nicht anders angegeben) 12.5 μ l der folgenden Proben aufgetragen:

Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe	RS	RS	RA	RA	RD	RD	frei	Marker 10 μ l	Marker 5 μ l

RS: Restriktion Sven, RA: Restr. Alexander, RD: Restr. Dennis, Marker: λ wt, *Eco*RI und *Hind*III geschnitten

Das Gel wurde etwa eine Stunde bei 67 V laufen gelassen.

Extraktion der DNA aus dem Gel

Das fertig gelaufene Gel wurde aus der Kammer genommen und unter UV-Licht betrachtet. Es waren hauptsächlich zwei Banden zu sehen: Eine starke, die kaum gelaufen war (der geschnittene Vektor) und eine schwächere, die weiter gelaufen war (d.h. das ausgeschnittene Fragment der DNA). Letzteres wurde mit einem Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß gelegt und gewogen.

Die Separation der DNA erfolgte mit dem QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit. Pro Volumen Agarose sollten drei Volumen des QX1-Puffers zugegeben werden. Es wurde eine Dichte des Gels von 1

angenommen, weshalb das Gewicht als Messgröße diente. Das Gelstückchen meiner Probe wog 61 mg; es wurden also 183 μ l des Puffers eingesetzt.

Da die benötigte QIAEX II-Suspension aus winzigen suspendierten Glaskügelchen besteht, wurden diese durch 30 sekündiges Vortexen resuspendiert. 30 μ l davon wurden zu dem DNA-haltigen Gelstückchen pipettiert, der Rest für die Nachweis der DNA-Sonde (s.u.) aufbewahrt. Durch Erhitzen über 10 min bei 50 °C im Heizblock wurde die Agarose verflüssigt und die so freigesetzte DNA an die Glaskügelchen gebunden. Zwischendurch wurde zur besseren Durchmischung mehrmals gevortext. Die Kügelchen wurden durch Zentrifugation in der Eppifuge (30 s) sedimentiert, und der Überstand abgenommen (und verworfen). Das Pellet wurde mit 500 μ l QX1-Puffer gewaschen (d.h. resuspendiert, 30 s abzentrifugiert und der Überstand komplett entfernt). Der Vorgang wurde zwei Mal mit PE-Puffer wiederholt. Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet 15 min an der Luft getrocknet.

Die Elution der DNA von den Glaskügelchen wurde erreicht, indem zwei Mal mit je 15 μ l Wasser gewaschen wurde. Dabei wurde im Heizblock erhitzt und nach dem Abzentrifugieren der *Überstand aufbewahrt*. Beide Überstände wurden vereinigt und auf Eis gelagert.

Agarose-Gelelektrophorese (II)

Ein zweites Gel wurde angesetzt, um die zuvor separierte DNA (aus Mausgehirn) weiter zu reinigen und für einen Southern-Blot (s.u.) vorzubereiten. Die restliche Agaroselösung des vorigen Ansatzes wurde in der Mikrowelle geschmolzen; 30 ml wurden davon abgenommen und mit 2 μ l Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Diesmal wurde eine kleine Elektrophoresekammer (wie oben beschrieben) vorbereitet. Die Proben bestanden aus jeweils 5 μ l der extrahierten DNA-Lösung, die mit 1 μ l Probenpuffer vermischt wurde. Es wurden vier Auftagungen gemacht:

Tasche	1	2	3	4
Probe	Marker 5 μ l	Alex	Dennis	Sven

Die Elektrophorese lief eine knappe Stunde bei 67 V.

Southern-Blot

Das Gel der zweiten Elektrophorese wurde zunächst für 15 min in die Denaturierungslösung gelegt, um die DNA alkalisch zu denaturieren. Eine thermische Denaturierung ist aufgrund der geringen Schmelztemperatur der Agarose nicht möglich. Dann wurde der Blot wie in der Zeichnung (S. 6) dargestellt aufgebaut. Um eine möglichst große Effizienz zu erlangen, wurde der Blot über Nacht stehen gelassen. Das Gel hatte sich dann entfärbt und war dünner geworden. Es wurde verworfen, und die Nylonmembran zum Trocknen und Fixieren in den Trockenschrank bei 80 °C gelegt.

Nachweis der DNA-Sonde

Die restliche DNA-Lösung des extrahierten Gels wurde für 10 min auf 94 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt, um die DNA zu schmelzen und die Einzelstränge erhalten zu lassen. Es wurden unter Eiskühlung jeweils 2 μ l des Hexanukleotid-Mix und des dNTP-Mix sowie 1 μ l des Klenow-Fragments zupipettiert. Nach kurzem Mixen wurde für gut 2½ Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe von 2 μ l EDTA beendete die Inkubation durch Komplexbildung der Mg^{2+} -Ionen.

Die Hybridisierung und Detektion erfolgte zusammen mit den Nylonmembranen des Phagen Screening I, das weiter unten besprochen wird. Der Blot diente als Positivkontrolle. Sämtliche Nylonmembranen wurden in einen Plastikschauch gelegt und mit 50 ml 2x SSC getränkt. Kurze Zeit später wurde die überschüssige Flüssigkeit abgegossen und 60 ml Hybridisierungspuffer eingefüllt. Der Schlauch wurde verschweißt und in eine zweite Tüte gepackt. Zur Kontrolle auf Löcher in einer der Tüten wurde ein Stück Papiertuch mit hinein gelegt und die äußere Tüte ebenfalls verschweißt. Die Membranen wurden dann für zwei Stunden bei 68 °C im Wasserbad prähybridisiert. Danach wurden die Hüllen aufgeschnitten, der Puffer ausgeschüttet und neuer Hybridisierungspuffer (auf 68 °C vortemperiert) zugegeben. Die vorbereiteten DNA-Sonden wurden kurz auf 94 °C erhitzt, um eventuell gebildete Doppelstränge zu schmelzen, und dann möglichst schnell dem Hybridisierungsansatz zugefügt. Die Hüllen wurden wieder zugeschweißt und über Nacht bei 68 °C im Wasserbad inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Hüllen aufgeschnitten und der Puffer abgegossen und aufbewahrt. Die Membranen wurden zweimal mit 2x Waschpuffer gewaschen (je 5 min, Schüttler). Es folgten zwei Waschgänge mit 0.5x Waschpuffer bei 68 °C (je 15 min). Um die überschüssigen Bindungsstellen der Nylonmembran abzusättigen, wurden 200 ml Blocking-Puffer (20 ml Blocking-Reagenz auf 180 ml Maleinsäurepuffer) zugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Puffer wurde danach abgegossen.

Die folgenden Schritte wurden zuerst nur mit dem Nylon des Blots durchgeführt.

Die Anti-DIG-Antikörperlösung wurde mit Blocking-Puffer 1:20,000 verdünnt (1.5 μ l Anti-DIG auf 30 ml Blocking-Puffer) und dann zu der Nylonmembran gegeben. Es wurde 30 min auf dem Schüttler inkubiert und anschließend zweimal mit 2x Waschpuffer 15 min lang gewaschen (Antikörperlösung wurde aufbewahrt). Danach wurde mit dem Detektionspuffer 2 min äquilibriert. Das Substrat (CDP-StarTM) wurde 1:100 mit Detektionspuffer (5 μ l auf 495 μ l) verdünnt und auf die Folien gegeben; die Hüllen wurden verschweißt.

In der Dunkelkammer wurde ein Stück Film für knapp drei Minuten auf die Nylonmembran gelegt, zwei Minuten in die Entwicklungslösung, kurz in die Stopplösung und dann zwei Minuten in das Fixierbad getaucht. Da die Färbung etwas zu schwach gewesen war, wurde die Prozedur mit 5 min Belichtungszeit erneut durchgeführt.

Phagen-Screening (I)

Die Bakterien für das Screening wurden wie beim Kontrollversuch vorbereitet (15 Ansätze); es wurden aber 19.35 μ l der 1:5,000 verdünnten Phagenstammuspension zu 200 μ l Bakteriensuspension gegeben.

Zehn Nylonmembranen wurden auf die Größe der Platten zugeschnitten, und es wurde der Hybridisierungspuffer angesetzt. Bei zehn Platten wurde je eine Nylonmembran vorsichtig aufgelegt und mit einer glühenden Kanüle die Position eindeutig markiert, indem an drei Stellen ein, zwei bzw. drei Löcher eingestochen wurden. Danach folgte die Isolation der DNA aus den adsorbierten Phagen.

Vorbereitend dafür wurden auf dem Arbeitsplatz zwei Bahnen Frischhaltefolie ausgebreitet und Whatmanpapier darauf gelegt. Das erste der Papiere wurde ausreichend mit Denaturierungslösung, das andere mit Neutralisierungslösung getränkt. Die ausgebackenen Folien wurden mit der nicht phagenbehafteten Seite nach unten zunächst für fünf Minuten auf das erste Papier (Denat.), dann fünf Minuten auf das zweite (Neutr.) und anschließend in einen Umschlag aus Whatmanpapier gelegt. Nachdem alle Folien so behandelt worden waren, wurden die Umschläge für eine Stunde in den Trockenschrank bei 80 °C gelegt, um zu trocknen und die DNA zu fixieren.

Die weitere Behandlung (Hybridisierung und Detektion) wurde oben beschrieben. Aufgrund der größeren Oberfläche der Folien wurden 44 ml von der Antikörperlösung (2.2 μ l Anti-DIG auf 44 ml Blocking-Puffer) und vom Substrat 15 ml der 1:100 Verdünnung eingesetzt.

Feinscreening

Über die Färbung des Films konnten die Plaques ermittelt werden, die aller Wahrscheinlichkeit nach die gewünschte DNA enthalten (vgl. Auswertung). Um die entsprechenden Plaques zu isolieren, wurden die Filme mit den Nylonmembranen zur Deckung gebracht und die Markierungen übertragen. Nach diesen Markierungen konnten dann die Kulturplatten auf die Folie gelegt und die gewünschten Plaques mit der weiten Öffnung einer Pasteurpipette ausgestochen werden.

Die DNA wurde wie folgt isoliert. Pro ausgestochenem Plaque wurden in einem Eppendorfgesäß 500 μ l SM und ein Tropfen Chloroform vorgelegt. Die Plaques wurden hinein gegeben und nach kurzem Vortexen zwei Stunden stehen gelassen. In dieser Zeit löste sich die DNA aus dem Agar heraus. Pro Plaque wurden zwei Verdünnungsreihen angesetzt: Eine, die 10 *pfu* pro Platte enthalten sollte, und eine mit 100 *pfu* pro Platte:

In 500 μ l befinden sich ca. 3.6×10^6 Phagen, was 6,000 *pfu*/ml entspricht. Es sollten höchstens 20 μ l Phagensuspension zugegeben werden, weshalb die Ansätze 1:1,200 verdünnt wurden (8 μ l auf 9.6 ml SM). Die Reihe mit 10 *pfu* pro Platte wurde durch eine 1:10 Verdünnung der vorigen Verdünnung erstellt (20 μ l zu 180 μ l SM).

Die ersten drei Ansätze (beider Verdünnungen) wurden mit je 200 μ l Bakterien vom Vortag inkubiert, die restlichen mit älteren:

Ansatz	1a/1b	2a/2b	3a/3b	4a/4b	5a/5b	6a/6b
<i>pfu</i>	10/100	10/100	10/100	10/100	10/100	10/100
Bakterien		Vortag			ältere Kolonien	

Da die Kultivierung auf kleinen Platten erfolgen sollte, wurden 5 ml Top-Agar pro Ansatz verwendet. Im übrigen wurde wie zuvor verfahren, um die Bakterienstämme zu kultivieren.

Am nächsten Tag wurden auch hier wurden Filterabzüge von einigen Platten angefertigt (1b – 6b). und die Plaques der Platten 4b – 6b ausgezählt, um die Verdünnung für das *liquid lysate* zu bestimmen; die Ergebnisse sind unten (Tabelle 1) aufgeführt.

Liquid lysate

Aus der Tabelle sind auch die Volumina zu entnehmen, die zu 100 μ l Bakterien (in einem Reagenzglas) pipettiert wurden, um etwa 10^6 *pfu* pro Ansatz zu erhalten. Zur Präadsorption wurde 15 min bei

37 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 5 ml LB-Medium pro Ansatz wurde 4 h im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Beobachtungen sind unter den Ergebnissen aufgeführt.

Die Lösung war klar geworden, und die restlichen Bakterien wurden durch 2 Tropfen Chloroform abgetötet, wobei nach 15 min bei 37 °C geschüttelt wurde. Die Bakterien und die Zellüberreste wurden bei 4,000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Dem abgenommenen Überstand wurde ein Tropfen Chloroform zugegeben und auf Eis gelagert.

Die durch die Lyse der Bakterien frei gewordene DNA und RNA wurde mit je 10 μ l DNase I (6 mg/ml) und RNase A (100 mg/ml) bei 37 °C eine halbe Stunde inkubiert und dadurch hydrolysiert. Es wurden je 5 ml einer Lösung aus 20% (w/v) PEG 6,000 mit 2 M NaCl in SM zugegeben und über Nacht auf Eis gestellt, um die Phagen zu präzipitieren.

Diese wurden am nächsten Tag 20 min bei 12,000 rpm und 4 °C abzentrifugiert (HB 40). Die Überstände wurden vorsichtig entfernt und die Reagenzgläser zum Trocknen auf dem Kopf stehend eine Stunde gelagert. Die Pellets wurden in je 700 μ l TE pH 7.5 resuspendiert und in je ein Eppendorfgefäß überführt. Es wurde zweimal mit 700 μ l Chloroform extrahiert, bis keine Zwischenphase mehr sichtbar war. Das restliche PEG konnte dadurch entfernt werden. Die Lyse der Phagenköpfe wurde durch 10 minütiges Inkubieren mit 10 μ l 10% SDS bei 68 °C vereinfacht. Anschließend wurde 15 μ l 5 M NaCl zugegeben, und es erfolgte die eigentliche Lyse durch aufeinanderfolgende Extraktion mit je 700 μ l: Phenol, Chloroform/Phenol und Chloroform. Durch Zugabe von 700 μ l Isopropanol wurde die DNA ausgefällt und nach kurzem Invertieren durch Zentrifugation bei 14,000 rpm (Eppifuge, 4 °C) für 20 min gewonnen. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und für 5 min bei 14,000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA an der Luft getrocknet. Zur Aufbewahrung wurden die DNA-Pellets in je 20 μ l H₂O aufgenommen und eingefroren (-20 °C).

Von den DNA-Proben des *liquid lysates* wurden je 20 μ l zur Restriktion eingesetzt. Hinzu kamen 2 μ l *EcoRI*, 2.5 μ l 10x *EcoRI*-Puffer und 0.5 μ l H₂O. Nach gut einer Stunde Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auftragung auf ein 1% Agarosegel:

Tasche	1	2	3	4
Probe	Marker 5 μ l	4b	5b	6b

Da während der Elektrophorese das Gel schrumpfte (s. Auswertung), wurde diese unterbrochen, um eine Regeneration des Gels zu ermöglichen. Insgesamt lief die Elektrophorese 1 h bei 67 V.

Screening (II)

Für ein weiteres Screening wurde eine neue Restriktion wie zuvor angesetzt. Sie diente zur Gewinnung der DNA-Sonde. Auch die weiteren Schritte zur Synthese der DNA-Sonde wurden wie vorher besprochen durchgeführt; die verwendete DNA enthielt die Rezeptordomäne des Sema WN29 PGBI9, Klon 4/6 in einer Konzentration von 1 mg/ml. Da keine neuen dNTPs mehr zur Verfügung standen, wurde die Lösung des Vortags benutzt, die allerdings bei Raumtemperatur aufbewahrt worden war (s. auch Auswertung).

Erneut wurden Bakterien mit Phagen inkubiert. Zur Präadsorption wurden zwei Ansätze mit 200-300 Phagen (Ansätze 1 und 3) und zwei mit 20-30 Phagen (Ansätze 2 und 4) pro kleiner Platte vorbereitet. Es wurden eine 1:50,000 (1 μ l Phagen-Stammlösung auf 50 ml SM) und eine 1:500,000 Verdünnung (1 ml der 1:50,000 Verd. in 9 ml SM) der Phagen-Stammlösung hergestellt und jeweils 1.9 μ l davon zu 200 μ l Bakterien pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C.

Ergebnisse und Auswertung

Nachweis der DNA-Sonde

Auf dem Film des Southern-Blots (rechts) sind deutlich die drei Banden der aufgetragenen DNA-Fragmente zu erkennen. Das weist auf eine erfolgreiche Hybridisierung mit der DIG-markierten DNA-Sonde hin. Bei der

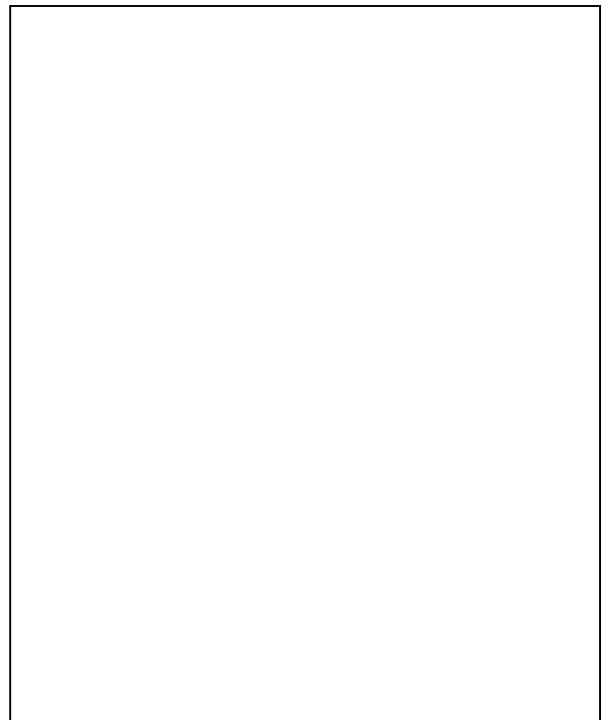


Abb. 6: Kopie des vom Southern-Blot belichteten Films. Bei allen drei Proben ist die spezifische DNA zu erkennen.

Restriktion ist demnach das gesuchte Fragment ausgeschnitten worden. Ebenso haben die folgenden Schritte (DNA-Extraktion, Southern-Blot) funktioniert. Aus diesem Grund konnte die Hybridisierung der Phagen-DNA ebenfalls ausgewertet werden.

Phagen-Screening (I)

Die belichteten Filme der Phagenabzüge weisen einige schwarze Punkte auf, die jedoch zum großen Teil eher auf Fehlmarkierungen als auf markierte Plaques zurückzuführen sind. Ein Hinweis auf eine mit Phagen infizierte Bakterienkolonie ist, wenn die Färbung (durch das Abziehen der Membran vom Agar) leicht verschmiert ist. Es wurden sechs Plaques ausgestochen.

Screening (II)

Die Filme, die von den Nylonmembranen dieses Screenings aufgenommen wurden, zeigten eine viel zu geringe Anzahl an positiven Plaques. Dies bestätigt die Annahme, dass die DIG-markierten dNTPs während der Aufbewahrung bei Raumtemperatur kaputt gegangen sind. Möglich ist auch, dass falsche Plaques, d.h. nicht die gesuchte DNA, ausgestochen worden sind.

Feinscreening

Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse und Auswertung der Plaqueauszählung wieder.

Ansatz	4b	5b	6b
Plaques	1488	1352	600
10^6 pfu/ml	89	81	36
μ l auf 100 μ l	11.2	12.3	28
Bakterien			

Tabelle 1: Auswertung des Feinscreenings für das *liquid lysate*.

Wie man erkennt, liegt die Anzahl bei jeder Platte weit über dem gewünschten Wert von 100 Phagen (*pfu*) pro Platte. Der Grund dafür liegt in der nur groben Abschätzung der Ausgangskonzentrationen der Phagensuspensionen.

Liquid lysate

Die Trübung der Suspensionen, die ein Maß für die enthaltenen, intakten Bakterien ist, nahm während der ersten 160 min zu, da die Bakterien eine kürzere Replikationsdauer haben, als die Phagen zur Infektion benötigen; außerdem wurde ein großer Überschuss Bakterien eingesetzt, die nicht alle sofort infiziert werden konnten. Doch auch schon während dieser Zeit war das Ausfallen von Debrise sichtbar, was auf die Lyse einiger Bakterien zurückzuführen ist. Die Suspension wurde zunehmend viskoser, und mehr Debrise war zu sehen. Nach drei Stunden war die erste Aufklärung zu erkennen; nun hat das Phagenwachstum das der Bakterien überstiegen hat. Nach vier Stunden war die Suspension nahezu klar. Zu diesem Zeitpunkt sind fast alle Bakterien lysiert und die Infektion kann gestoppt werden. Dies ist darauf zurück zu führen, dass pro infiziertem Bakterium etwa 1000 Phagen freigesetzt werden, die Bakterien an sich sich nur verdoppeln.

Die Gelelektrophorese nach der Restriktion bereitete einige Schwierigkeiten. Da die Agarose anstatt in Puffer nur in Wasser angesetzt worden war, verzerrte sich das Gel während der Elektrophorese. Auch der Versuch, das Gel im Puffer zu äquilibrieren brachte keine sichtbare Verbesserung (vgl. Abb. 7). Aus diesem Grund sind auch nur schlecht die einzelnen Banden zu erkennen. Das Bild ist Seitenverkehrt, der Marker befindet sich also rechts. In der angrenzenden Tasche sind neben einer dicken, verschmierten Bande noch weitere schmale erkennbar, die aber wahrscheinlich auf übergegangenen Marker zurückzuführen sind (die Taschen waren undicht). Die dritte Tasche lässt zwei Banden erkennen; eine ist wie bei den anderen beiden Proben dick und verschmiert, die andere nur sehr schwach. Letztere könnte vom gesuchten Restriktionsfragment stammen. Bei der letzten Probe ist diese Bande nur zu erahnen.

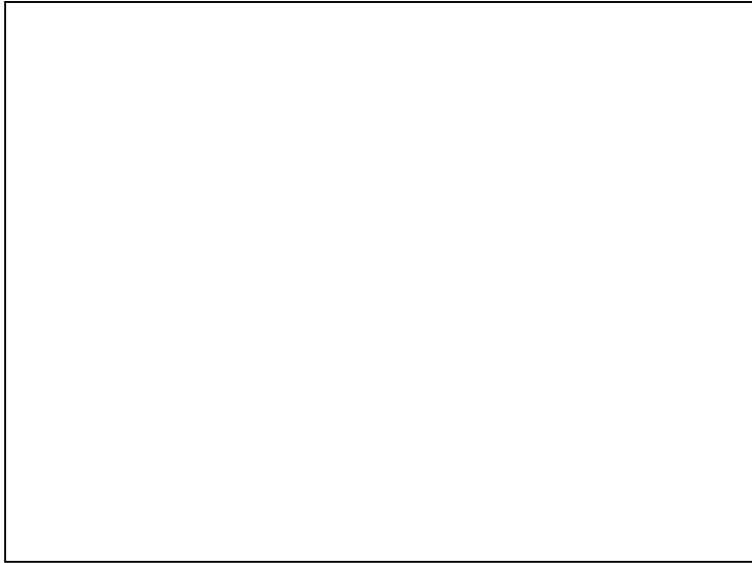


Abb. 7: Aufnahme des Gels nach Restriktion der aus den Phagen isolierten DNA.

V Two-hybrid System

Einleitung

Grundlagen

Mit dem Two-hybrid System wurde ein recht einfaches und doch mächtiges Werkzeug zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen geschaffen. Als Wirtssystem dienen speziell entwickelte Hefestämme. Selektionsmerkmale sind zum einen das Wachstum auf defizienten Nährböden, zum anderen die Expression eines leicht nachzuweisenden Genprodukts (wie bspw. β -Galactosidase). Im Verlauf des Praktikums werden Versuche mit zwei verschiedenen Hefestämmen durchgeführt: Der erste ist Y190, der zweite HF7c. Die nachstehende Tabelle wurde der Anleitung zum „MATCH-MAKER GAL4“ Two-hybrid System der Firma CLONTECH entnommen.

Stamm	Reportergene	Mating-Typ	Transformationsmarker	Anwendung
Y190	<i>HIS3, lacZ</i>	<i>MATa</i>	<i>trp1, leu2, cyh2</i>	Two-hybrid library screening mit Cycloheximid-selektion und quantitativem β -Gal Assay
HF7c	<i>HIS3, lacZ</i>	<i>MATa</i>	<i>trp1, leu2</i>	Two-hybrid library screening mit hochsensitivem <i>HIS3</i> Reporter

Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten Hefestämmen Y190 und HF7c. Das *lacZ* Reportergen von HF7c ist etwas schwächer als das von Y190. Dafür ist bei Y190 der Promoter des *HIS3* Reportergens „leaky“, was zu einer Hintergrundexpression führt.

Das Prinzip des Two-hybrid Systems soll im Folgenden beschrieben werden.

Bei Hefe handelt es sich um eukaryotische Zellen. Der für die Transkription verantwortliche Transkriptionsfaktor (hier: GAL4) lässt sich in zwei Domänen spalten: Die eine bindet an die Promoterregionen der DNA und heißt DNA-Bindungsdomäne (DB), die andere aktiviert die RNA-Polymerase (Transkriptions-Aktivierungsdomäne, TA). Die Gene für die beiden Domänen befinden sich auf dem eingeführten Vektor. Direkt an sie sind die Gene für das Köder- (DB) und Beuteprotein (TA) angefügt. Der von uns verwendete Vektor beinhaltet die in Tabelle 3 aufgeführten Domänen.

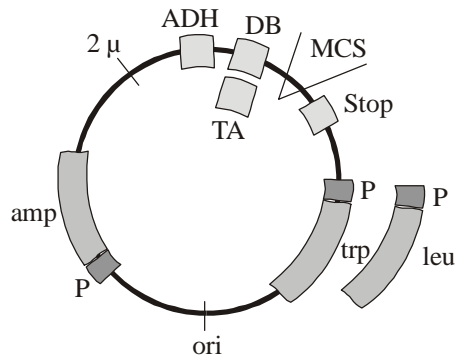


Abb. 8: Schema des eingesetzten Expressionsvektors. P: Promoter, MCS: multiple cloning site, DB: DNA-Bindungsdomäne, TA: Transkriptions-Aktivierungsdomäne, ori: Startpunkt der Replikation, ADH:

An die DNA-Bindungsdomäne der Vektoren werden vier verschiedene Köderproteine gesetzt. Bei drei von ihnen ist das Beuteprotein aus drei Domänen des PSD95 (3PDZ) zusammengesetzt. Als Vergleich dient ein anderes Beuteprotein (Phospholipase C, PLC γ), das in Zellmembranen vorkommt:

Probe	Köderprotein	entscheidende AS-Sequenz	Beuteprotein
1	NR2B	ESDV	3PDZ
2	NR2BM	ESDA	3PDZ
3	P75	TSPV	3PDZ
4	NR2B	ESDV	PLC γ

Tabelle 3: Eingesetzte Köder- und Beuteproteine zur Untersuchung auf Interaktion.

Im ersten Ansatz wird der Wildtyp des NMDA-Rezeptors eingesetzt, im zweiten eine Mutante. Der dritte Ansatz soll zeigen, dass ein SXV-Motiv nicht zur Interaktion zwischen Rezeptor und Protein ausreichend ist. Im vierten Ansatz wird die Interaktion eines ganz anderen Proteins untersucht.

β -Galactosidase Assay

Galactosidasen spalten Disaccharide in Monosaccharide. Setzt man jedoch spezielle Substrate ein (wie z.B. X-Gal), so wird durch die Spaltung eine Blaufärbung induziert. Dies kann als empfindlicher Nachweis für die Expression des *lacZ* Gens dienen. Im Two-hybrid System wird so die Interaktion zweier Proteine bestimmt.

Durchführung

Da mit beiden Hefestämmen gleich verfahren worden ist, wird hier im weiteren nur von Hefe gesprochen. Bei den Beobachtungen wird natürlich auf den entsprechenden Hefestamm verwiesen.

Material

Hefekulturen

- Platte mit Y190-Hefe
- Platte mit HF7c-Hefe
- YPD-Medium
- SD-Medium

Transformation

- aqua bidest.
- salmon sperm DNA
- Expressionsvektoren (s. Tabelle 3)
- 1x TE (s.o.)
- LiAc/TE-Lösung (1 ml 10x LiAc, 1 ml 10x TE, 8 ml H₂O)

- sterile PEG/LiAc-Lösung (0.5 ml 10x LiAc, 0.5 ml 10x TE, 4 ml PEG 50%)

- DMSO

Ausplattierung

- Platte mit SD-Medium
- Platte mit TL-Medium
- Platte mit TLH-Medium

β -Galactosidase Assay

- X-Gal-Lösung (20 mg X-Gal in 500 μ l DMSO)
- Z-Puffer (50 mM K₃PO₄ pH 7.0)
- fl. Stickstoff

Vorbereiten der Hefen

Von dem Hefeausschlag wurden mit der rundgeschmolzenen Spitze einer Pasteurpipette einige Zellen entnommen und in einem Reagenzglas in 5 ml YPD-Medium gelöst. Über Nacht wurden die Hefen bei 30 °C im Schüttler inkubiert. 45 ml YPD-Medium wurden in einem ausgebackenen Erlenmeyerkolben vorgelegt, 5 ml einer der ÜN-Kulturen zugegeben und vier Stunden bei 30 °C inkubiert.

Transformation

Die inkubierten Hefen wurden in ein Falcon-Tube überführt und zur Absetzung der Zellen für 4 min bei 2,500 rpm (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, und die Zellen in 50 ml Wasser resuspendiert. Die Zellen wurden wie zuvor abzentrifugiert, in 500 μ l 1x LiAc/TE-Lösung aufgenommen und 10 min bei RT stehen gelassen.

In vier Eppendorfgläsern wurden je 10 μ l der denaturierten Lachssperma-DNA mit 0.5 μ g der verschiedenen Expressionsplasmide (vgl. Tabelle 3) versetzt und gut gemischt.

Je 100 μ l der Hefezellsuspensionen wurden zu den DNA-Ansätzen pipettiert und vermischt. Nach der Zugabe von 600 μ l steriler PEG/LiAc-Lösung zu jedem Ansatz wurde gevortext und anschließend 30 min im Schüttler bei 30 °C inkubiert. Zur Besseren Aufnahme der Plasmide in die Zellen wurden je 70 μ l DMSO zugegeben und für 10 min auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock). Durch die anschließende Schockkühlung auf Eis und 15 sekundiges Zentrifugieren bei 14,000 rpm wurden die Zellen abgesetzt. Der Überstand wurde abdekantiert und die Zellen in 500 μ l 1x TE resuspendiert.

Ausplattierung

Von jedem Ansatz wurden 100 μ l auf je eine große SD-Medium Kulturplatte pipettiert und mit einem gebogenen Glasstab sorgfältig verteilt. Zum Wachsen wurden die Platten in den Brutschrank bei 30 °C gestellt (über Nacht).

Die Kontrolle der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf zwei Wegen, wie in der Einleitung angesprochen. Dafür wurden von jeder Hefeplatte drei unabhängige Kolonien auf zwei Kulturplatten ausgestrichen. Die eine Platte enthielt ein Medium ohne Trp und Leu (TL), die andere zusätzlich kein His (TLH). Die folgende Abbildung zeigt das Auftragungsschema auf.

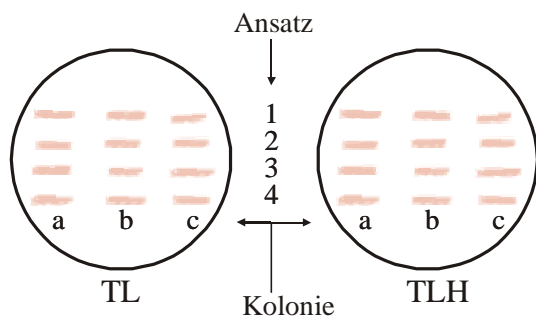


Abb. 9: Auftragungsschema zur Interaktionskontrolle. Zuerst wird ein Teil einer Kolonie der Stammpalte auf die TL-Platte übertragen und dann ein weiterer Teil derselben Kolonie auf die TLH-Platte. Dies wird mit zwei weiteren Kolonien wiederholt. So kann zum einen das Wachstum auf der TLH-Platte untersucht werden und zum anderen mit einem Abzug der TL-Platte ein β -Galactosidase Assay durchgeführt werden (s.u.)

Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und auf dem Kopf liegend im Brutschrank übers Wochenende bei 30 °C inkubiert.

β -Galactosidase Assay

Von der TL-Platte, auf der die Hefe gut wachsen sollte (auch der Fall war, vgl. Ergebnisse), wurde ein Filterabzug gemacht. Dazu wurde ein Stück Nitrocellulose auf die Größe der Platte zurecht geschnitten und vorsichtig auf diese gelegt. Kurze Zeit später wurde sie vorsichtig abgezogen und mit der hefebeschichteten Seite nach oben für 30 s in flüssigen Stickstoff gelegt.

Ein Whatmanpapier wurde mit einer Lösung aus 180 μ l X-Gal-Lösung und 10 ml Z-Puffer getränkt. Die Nitrocellulose wurde nach dem Auftauen darauf gelegt und über Nacht im Brutschrank bei 30 °C inkubiert.

Ergebnisse und Auswertung

Y190 - Wachstum

Die Ausstriche des Hefestammes Y190 auf TLH-Medium zeigten das gleiche Wachstum wie die auf TL-Medium. Eine Selektion aufgrund der Interaktion zwischen den Beute- und Köderproteinen kann daher nicht erfolgt sein. Eine wahrscheinliche Ursache dafür ist der verwendete Promoter des *HIS3*-Gens. Er ist „leaky“, was bedeutet, dass immer eine gewisse Grundexpression stattfindet. Zusätzlich zu der His-Defizienz des Mediums hätte eine weitere Selektion erfolgen müssen: Gewöhnlich bestimmt man über eine Verdünnungsreihe die Konzentration an 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT), die eine gewünschte Expression noch zulässt. 3-AT hemmt kompetitiv das *HIS3*-Protein, so dass genauer kontrolliert werden kann. Unseren Platten fehlte jedoch die zweite Wachstumsregelung, wodurch die Grundexpression zum Wachstum ausreichend war.

Y190 - β -Galactosidase Assay

Der Farbnachweis über die Galactosidase-Aktivität verlief erfolgreich, wie auf dem folgenden Bild zu sehen ist. In allen Banden sind vereinzelt blaue Punkte zu erkennen, die auch auf spontan zerfallenes X-Gal zurückzuführen sein können.

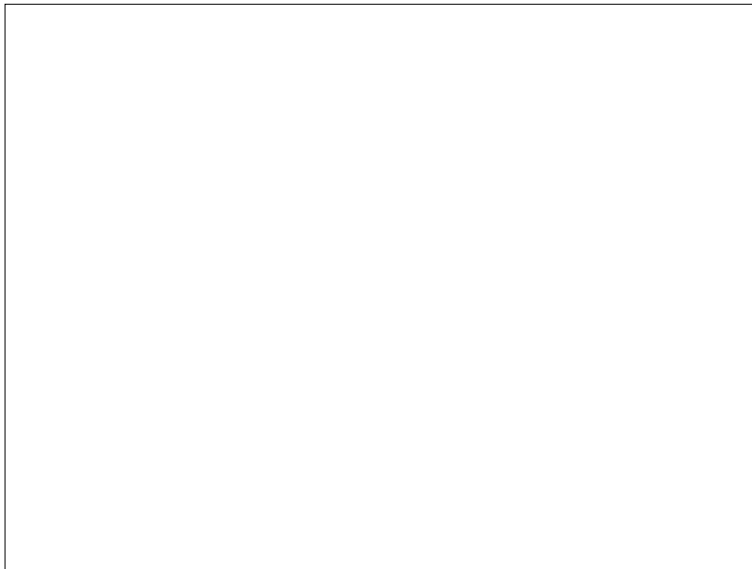


Abb. 10: Foto der Nitrocellulosemembran, auf der Y190 Zellen adsorbiert sind. Die oberen dunklen Banden sind Kolonien des ersten Ansatzes, bei dem die Interaktion von NR2B mit 3PDZ untersucht werden sollte.

Die dunklen Banden sind die aufgrund der stattgefundenen Interaktion der Proteine blau angefärbten. Wie zu erwarten war, zeigt nur der erste Ansatz eine Interaktion zwischen Köder- (NR2B) und Beuteprotein (3PDZ). Die Mutation NR2BM (2. Ansatz) sowie das P75 (3. Ansatz) zeigen keine Interaktion mit 3PDZ. Die PLC γ scheint ebenfalls nicht mit dem NR2B interagiert zu haben, da keine signifikante Blaufärbung zu erkennen ist.

Vergleicht man die Ergebnisse mit den Aminosäuresequenzen der Motive aus Tabelle 3, so erkennt man, dass das SXV-Motiv nicht ausreichend spezifisch ist (wie folgende Tabelle zusammenfasst).

Probe	Köderprotein	entscheidende AS-Sequenz	Beuteprotein	Nachweis
1	NR2B	ESDV	3PDZ	positiv
2	NR2BM	ESDA	3PDZ	negativ
3	P75	TSPV	3PDZ	negativ
4	NR2B	ESDV	PLC γ	negativ

Tabelle 4: Ergebnisse der Nachweisreaktion.

Würde ein SXV-Motiv ausreichend sein, so hätten auch die Ansätze 3 und 4 positive Reaktionen im Two-hybrid System zeigen müssen. Beim Genprodukt der 3PDZ-Domäne handelt es sich demnach um ein für NR2B hochspezifisches Protein, das eine starke Interaktion mit diesem aufweist, auf andere vorkommende Proteine allerdings nicht reagiert.

HF7c - Wachstum

Bei diesem Hefestamm war auf der TLH-Platte ein unterschiedliches Wachstum zu erkennen: Der erste Ansatz zeigte ein deutlich besseres Wachstum. Der Promoter des *HIS3* Gens funktioniert hier besser, d.h. die Grundexpression ist wesentlich geringer. Deshalb sind die von den übrigen Ansätzen entnommenen Kolonien nur sehr schwach angewachsen; sie waren nicht in der Lage, die His-Defizienz des Mediums auszugleichen.

HF7c - β -Galactosidase Assay

Die Ergebnisse diese Assays stimmen mit dem des Y190-Stammes überein. Es wurden keine Aufnahmen angefertigt.