

**Fluoreszenz-optimierte Detektion
heterologer Protein-Protein Interaktionen
in *Saccharomyces cerevisiae*
als Alternative zur
Yeast Two Hybrid Methode**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2001

vorgelegt von

Manuela Braun

Datum der mündlichen Prüfung

14. Mai 2001

Dekan

Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter

Prof. Dr. J. P. Ruppertsberg

2. Berichterstatter

Prof. Dr. D. Mecke

„Eine umfassende Bildung ist eine gut dotierte Apotheke.

Aber es besteht keine Sicherheit,
dass nicht für Schnupfen Zyankali gereicht wird.“

(Karl Kraus)

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

Danksagungen

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Peter Ruppertsberg ganz herzlich danken, der es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit bei der Firma Otogene AG über ein aktuelles, methodisch sehr interessantes Thema zu erstellen.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. D. Mecke für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit und deren Begutachtung.

Ebenso danken möchte ich der Firma Otogene AG für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Ganz besonders möchte ich hier Herrn Dr. C. Antz danken, der sich immer für mich eingesetzt hat.

Bei Frau Miriam Mattner möchte ich mich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit und die praktische Unterstützung im Labor bedanken.

Den restlichen Otogene-Mitarbeitern, v.a. aber Frau Jacqueline Schorr, Herrn Dr. Hartmut Hahn und Herrn Markus Schott, danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die fruchtbaren Diskussionen.

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. János Szöllösi, Department of Biophysics and Cell Biology, University School of Debrecen für die Hilfestellung bei den Arbeiten mit dem FRET-System. Er war immer gerne bereit Fragen bezüglich der FRET-Methode und der Auswertung der FRET-Daten zu beantworten.

Herrn Dr. Jacques Paysan, damals noch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ruppertsberg, möchte ich für die Starthilfe bei den Arbeiten mit dem Yeast Two Hybrid System sowie der Entwicklung der FRET-Methode danken.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Herrn Dr. K.-U. Fröhlich, der immer gerne dazu bereit war, mich bei Hefe-Problemen mit hilfreichen Ratschlägen zu unterstützen.

Weiterhin möchte ich auch den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Ruppertsberg, Physiologie II, für das nette Arbeitsklima danken. Ganz besonderer Dank gebührt dabei Herrn Dr. Jost Ludwig, von dem ich sehr viel über Molekularbiologie lernen konnte. Herrn Dr. Nikolaj Klöcker und Herrn Alexander Hümmer danke ich für die angeregten und hilfreichen Diskussionen und bei Frau Karin Geckle möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Abschließend danke ich meinen Eltern dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben. Bei all meinen Entscheidungen haben sie immer hinter mir gestanden und mich sowohl finanziell als auch sonst so gut es ging unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 PHAGE DISPLAY	1
1.1.1 Infektion von <i>E.coli</i> durch Ff-Phagen	1
1.1.2 Screening von Peptid-Libraries	2
1.2 DAS YEAST TWO HYBRID SYSTEM (Y2H)	3
1.2.1 Grundlagen	3
1.2.2 Einsatzmöglichkeiten	5
1.3 FLUORESZENZ RESONANZ ENERGIE TRANSFER (FRET)	6
1.3.1 Was ist FRET ?	6
1.3.2 Voraussetzungen für FRET	7
1.3.3 Quantifizierung von FRET	8
1.3.4 Einsatzmöglichkeiten	10
1.4 DAS GRÜN FLUORESZIERENDE PROTEIN (GFP)	13
1.4.1 Die Entdeckung von GFP	13
1.4.2 Struktur und Eigenschaften von GFP	14
1.4.3 Das Chromophor	16
1.4.4 GFP-Varianten	18
1.5 AUFGABENSTELLUNG	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	22
2.1.1 DNA-Matrizen	22
2.1.2 Synthetische Oligonukleotide	22
2.1.3 Plasmide	23
2.1.4 Arbeiten mit Bakterien	23
2.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	29
2.1.6 Modifikation von DNA	31
2.1.7 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA	35
2.1.8 Klonierungsstrategien	41

2.2	ARBEITEN MIT <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	42
2.2.1	Plasmide	42
2.2.2	Hefestämme	43
2.2.3	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Anlegen von Glycerolkulturen	45
2.2.4	Kreuzung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämmen (Mating)	46
2.2.5	Transformation von Plasmid-DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
2.2.6	Nachweis von α -Galaktosidase	49
2.2.7	Nachweis von β -Galaktosidase	49
2.2.8	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
2.3	PROTEINBIOCHEMIE	51
2.3.1	Expression von Proteinen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
2.3.2	Aufschluß von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels alkalischer Lyse	52
2.3.3	Aufschluß von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mittels Zymolase-Verdau	52
2.3.4	Reinigung von Proteinen über Nickel-Säulen	54
2.3.5	Proteinbestimmung nach Bradford	55
2.3.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
2.3.7	Western Blot	58
3	ERGEBNISSE	62
3.1	ERGEBNISSE IM YEAST TWO HYBRID SYSTEM	62
3.1.1	Yeast Two Hybrid Screen	62
3.1.2	Protein-Protein Interaktionen im Y2H	69
3.1.3	Identifizierung von Bindedomänen	73
3.2	ERGEBNISSE DER FRET-METHODE	76
3.2.1	Herstellung der Spektralvarianten von yEGFP	76
3.2.2	Herstellung der benötigten Konstrukte	79
3.2.3	Expression der FRET-Konstrukte in INV Sc1	81
3.2.4	FRET- Messergebnisse	87

4	DISKUSSION	99
4.1	DISKUSSION DER Y2H-SCREENING ERGEBNISSE	99
4.1.1	Identifizierung von p27-Interaktionspartnern mittels Y2H-Screen	99
4.1.2	Identifizierung der an der Bindung beteiligten p27-Domäne	101
4.2	DISKUSSION DER Y2H-INTERAKTIONSTESTS	102
4.2.1	Proteinexpression der Konstrukte	102
4.2.2	Diskussion der Y2H-Interaktionsergebnisse	104
4.2.3	Identifizierung der an der Bindung beteiligten p27-Domäne	105
4.3	DISKUSSION DER MITTELS FRET DETEKTIERTEN INTERAKTIONEN	106
4.3.1	Cytosolische Expression der FRET-Fusionskon- strukte in dem Hefestamm INV Sc1	106
4.3.2	Diskussion der Messergebnisse beider FRET- Systeme	108
4.4	VERGLEICH DER Y2H- MIT DER FRET-METHODE	111
4.5	AUSBLICK	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	115
6	LITERATURVERZEICHNIS	116
7	ANHANG	125

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
A, C, D, E, F ...	Einbuchstaben-Code für Aminosäuren: Alanin, Cystein, Aspartat, Glutamat, Phenylalanin ...
AD	Aktivierungsdomäne; auch kurz für: GAL 4 AD
Ala, Cys, Asp ...	Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren: Alanin, Cystein, Aspartat ...
Amp	Ampicillin
amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxosulfat
AS	Aminosäure
BD	Bindungsdomäne; kurz für: GAL 4 DNA-BD
bidest.	doppelt destilliert(es)
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>engl. bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CDK	<i>engl. Cyclin dependent kinase</i>
cfu	<i>engl. colony forming units</i>
cyh	Cycloheximid
C-terminal	Carboxyterminal
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl. deoxy nucleic acid</i> , Deoxynukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
etc.	et cetera

EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FACS	<i>engl. fluorescence activated cell sorter / scanner</i>
FRET	<i>engl. fluorescence resonance energy transfer</i>
G	Guanosin
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m / s}^2$
h	Stunde(n)
i.a.	im allgemeinen
kan ^r	Kanamycin-Resistenz
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasepaar(e)
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria Broth
log-Phase	logarithmisches Wachstum
Lsg.	Lösung
M	Molar
m	milli (10^{-3})
mA	Milliampere
max.	maximal
MCS	<i>engl. multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
N-terminal	Aminoterminal
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p	piko (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>engl. phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PEG 3350	Polyethyleneglycol, avg. mol. wt. = 3,350
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	<i>engl. rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAM	S-Adenosylmethionin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>engl. synthetic dropout</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl. sodium dodecyl sulfate</i>)
s.o.	siehe oben
T	Thymosin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris / Acetat / EDTA
TBS	<i>engl. Tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Saline
TBST	TBS mit Tween 20
TE	Tris / EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
tet ^r	Tetracyclin-Resistenz
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (= μmol umgesetztes Substrat pro min)
u.a.	unter anderem
UAS	<i>engl. upstream activating sequence</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
Verd., verd.	Verdünnung, verdünnt
Vol.	Volumen/Volumina
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
X- α -Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-galactopyranosid
X- β -Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YEBFP	<i>engl. yeast enhanced blue fluorescent protein</i>
YECFP	<i>engl. yeast enhanced cyan fluorescent protein</i>
YEGFP	<i>engl. yeast enhanced green fluorescent protein</i>
YEYFP	<i>engl. yeast enhanced yellow fluorescent protein</i>
Y2H	<i>engl. yeast two hybrid</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Für die pharmazeutische Industrie hat die gezielte Suche nach Wirkstoffen im Laufe der Zeit immer mehr an Bedeutung gewonnen. Heutzutage können durch den Einsatz automatisierter Testsysteme innerhalb kürzester Zeit Tausende von Substanzen in zellfreien oder zellulären Assays auf ihre Wirksamkeit, d.h. Bindung an ein Zielmolekül, untersucht werden. Dabei bedient man sich sowohl lange bekannter Testmethoden wie z.B. ELISA und Coimmunopräzipitation als auch neuer Methoden wie z.B. der Verwendung von *Biochips*, dem *Phage Display*, der *Yeast Two Hybrid*-Methode und der FRET-Technik.

1.1 Phage Display

Bei dieser *Screening* Methode werden Peptide oder Proteine in Fusion mit einem Capsid-Protein auf der Oberfläche von Bakteriophagen exprimiert.

1.1.1 Infektion von *E.coli* durch Ff-Phagen

Mittlerweile wurden zahlreiche filamentöse Phagen identifiziert, die in der Lage sind, eine Vielzahl gram-negativer Bakterien zu infizieren. Sie besitzen ein kovalent geschlossenes, einzelsträngiges DNA-Genom, das in einen etwa 7 nm breiten, 900-2000 nm langen Zylinder verpackt ist (R.E. Webster in *Phage Display of Peptides and Proteins*, 1996). Die am besten charakterisierten filamentösen Phagen sind M 13, fl und fd, die *E.coli* infizieren. Da die Genome dieser drei Phagen 98% Homologie (Van Wezenbeek et al., 1980; Beck and Zink, 1981; Hill and Petersen, 1982) aufweisen und sie ausschließlich *E.coli* infizieren können, die ein F-Plasmid (F⁺) enthalten und daher einen F-Pilus ausbilden, werden sie auch als Ff-Phagen bezeichnet. Dieser F-Pilus wird von Bakterien zur Übertragung (Konjugation) von F-Plasmiden oder chromosomaler DNA, in die das F-Plasmid integriert wurde, benötigt. Dabei erfolgt die Übertragung auf Empfänger-Bakterien, die kein F-Plasmid tragen (Willetts

and Skurray, 1987; Ippen-Ihler and Maneewanekul, 1991; Frost et al., 1994). Der Pilus ist ein Proteinkanal, der durch Polymerisation und Depolymerisation von Pilin-Untereinheiten der inneren Bakterienmembran auf- und abgebaut wird (Frost, 1993).

Bei der Infektion von *E.coli* interagiert ein Ende dieser Phagen zunächst mit der Spitze des F-Pilus der Bakterien. Durch Depolarisation des F-Pilus gelangt der Phage auf die Oberfläche der Bakterien und interagiert dort mit der Bakterien-Membran. Capsid-Proteine dringen in die Membran ein und die Phagen-DNA wird in das Bakterien-Cytoplasma abgegeben. Bakterien-Enzyme synthetisieren den komplementären Strang, wodurch doppelsträngige, *supercoiled* DNA - die replikative Form (RF)-entsteht. Dieses DNA-Molekül codiert für alle notwendigen Phagen-Proteine. Dabei werden Capsid-Proteine und Proteine die für Zusammenlagerung der Phagenpartikel benötigt werden, in die Zellmembran integriert. Sobald eine bestimmte Konzentration eines DNA-Bindeproteins in der Zelle vorliegt, wird einzelsträngige DNA davon komplexiert und nicht mehr in die replikative Form umgewandelt, sondern an neue Phagenpartikel, Capsid-Proteine, angelagert und das DNA-Bindeprotein löst sich ab. Die fertigen Phagen werden zunächst ins Medium abgegeben bis die Bakterien lysieren, wobei sich *Plaques* bilden, die bis zu 10^8 infektiöse Partikel enthalten.

1.1.2 Screening von Peptid-Libraries

Bei der Suche nach Interaktionspartnern werden *Library*-Peptide in Fusion mit einem geeigneten Capsid-Protein des Phagen auf dessen Oberfläche exprimiert. Das Zielmolekül (*Target*) wird auf einer Matrix immobilisiert, wodurch interagierende Phagen temporär immobilisiert, nicht-bindende dagegen abgewaschen werden. Die interagierenden Phagen werden anschließend in *E.coli* amplifiziert, die Vektoren isoliert und die *Library*-DNA sequenziert.

Der Phage Display kann ebenso zur Identifizierung bindender Epitope oder zur näheren Charakterisierung von Antikörpern verwendet werden.

1.2 Das Yeast Two Hybrid System (Y2H)

Das Yeast Two Hybrid System ist eine Methode mit der sich Protein-Protein Interaktionen in eukaryontischen Zellen, insbesondere in *Saccharomyces cerevisiae*, mittels genetischem Assay nachweisen lassen (Fields and Song, 1989; Fields and Sternglanz, 1994). Der entscheidende Vorteil dieser Methode gegenüber *in vitro* Techniken besteht darin, dass die Proteine in einem eukaryontischen System exprimiert und getestet werden. Das bedeutet, dass die Proteine – wie auch in Säugerzellen – posttranslationale Modifikationen tragen, die das Bindungsverhalten eines Proteins unter Umständen maßgeblich beeinflussen können.

1.2.1 Grundlagen

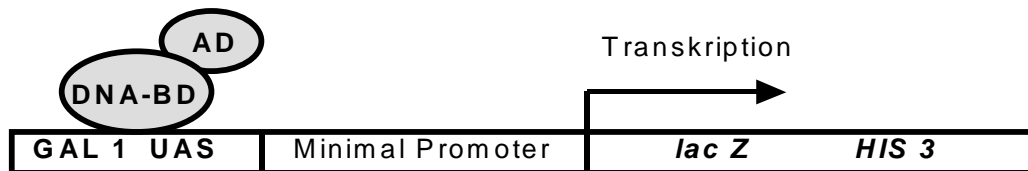
Die Grundlage für die Entwicklung dieses Systems bildete die Beobachtung, dass viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren aus funktionell unabhängigen, physikalisch trennbaren Domänen bestehen (Brent and Ptashne, M., 1985). Dabei bindet eine Domäne, die DNA-Bindedomäne (DNA-BD), spezifisch an die zugehörige *upstream activating site* (UAS; Heslot and Gaillardin, 1992). Durch eine oder mehrere Aktivierungsdomänen (AD) wird daraufhin die Transkription der unter dem Einfluss dieser UAS stehenden Gene durch den RNA-Polymerase II-Komplex initiiert (Keegan et al., 1986; Ma and Ptashne, 1987).

Werden DNA-BD und AD physikalisch getrennt in derselben Zelle coexprimiert, bindet die DNA-BD zwar an ihre Zielsequenz, kann aber ohne die AD keine Genexpression auslösen. Die AD kann ihre Funktion nicht ausüben, weil AD und DNA-BD nicht miteinander interagieren und die AD daher nicht in räumliche Nähe zur UAS gelangt (Fields and Song, 1989; Fields and Sternglanz, 1994). Werden die beiden Domänen jedoch mit interagierenden Proteinen wie z.B. dem Simian Virus 40 (SV 40) *large tumor (T) antigen* und p53 bzw. Rb (Lane and Crawford, 1979; De Caprio et al., 1988) fusioniert, und die beiden Hybridproteine, AD–SV 40 *large T antigen* und DNA-BD–p53 bzw. Rb, in einem geeigneten Hefestamm coexprimiert, so wird die AD in räumlicher Nähe zur DNA-BD und damit zur UAS lokalisiert und kann ihre Funktion ausüben

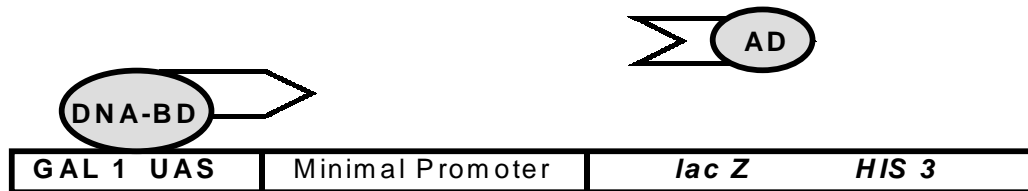
(Fields and Song, 1989).

Die am häufigsten eingesetzten Systeme verwenden die DNA-BD von GAL 4 oder Lex A in Kombination mit der AD von GAL 4 oder dem

a) natives GAL 4



b) nicht interagierende Hybride



c) interagierende Hybride

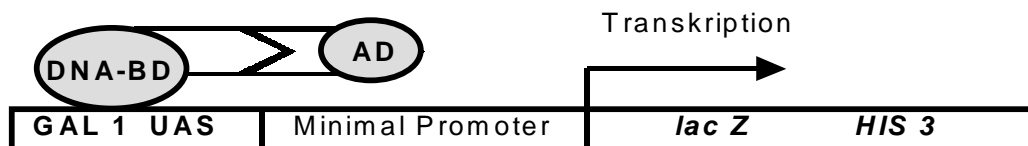


Abb. 1.1: Modell der Transkriptions-Aktivierung durch Wiederherstellung der GAL 4 Aktivität. a) natives GAL 4 Protein enthält DNA-BD und AD, Transkription der Reportergene. b) Hybrid enthält entweder DNA-BD oder AD, keine Transkription. c) Protein-Protein Interaktion zwischen den beiden Hybriden bringt DNA-BD und AD in räumliche Nähe, Transkription. (verändert nach Fields and Song, 1989)

Herpes Virus Protein VP16 (Fields and Sternglanz, 1994).

Als Reportergen dient meist das *E. coli lacZ* Gen, welches für β -Galaktosidase codiert und bei Aktivierung eine Blaufärbung der Kolonien auf X-Gal-haltigen Platten oder Filtern hervorruft (Fields and Sternglanz, 1994). Häufig werden zusätzlich Gene, die an der Aminosäure-Biosynthese beteiligt sind (*HIS3*, *ADE2*) als Reportergene verwendet, wodurch eine Wachstumsselektion auf Minimalmedium möglich wird, was vor allem beim *Library-Screening* von Vorteil ist.

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch den Einfluss natürlicher Regulatorproteine zu verhindern, werden z.B. für das GAL 4 Two Hybrid System nur Hefestämme verwendet, die *gal4⁻* und *gal80⁻* (Repressor) sind (Fields and Song, 1989).

1.2.2 Einsatzmöglichkeiten

Das System wird u.a. dazu verwendet, das Bindungsverhalten bekannter Proteine, bei denen aufgrund von Strukturvorhersagen, biochemischen Daten, physiologischen Experimenten oder anderen Kriterien eine Interaktion erwartet wird, zu untersuchen.

Weiterhin eignet es sich zur Identifizierung von Domänen oder Aminosäureresten, die entscheidend für die Interaktion zweier Proteine sind. So wurden z.B. die Bereiche, die für die Bindung von p53 an SV 40 *large T antigen* essentiell sind, durch Mutagenese kleiner Bereiche von p53 gefolgt von blau/weiß *lacZ*-Screening identifiziert (Li and Fields, 1993).

Auch zur Identifizierung von Proteinen, die an ein bekanntes Zielprotein (fusioniert mit einer DNA-BD) binden, kann dieses System eingesetzt werden. Dazu wird im allgemeinen eine *Library* aus der gesamten cDNA eines Organismus oder eines Gewebes mit der DNA-Sequenz einer AD fusioniert und mit dem Zielprotein coexprimiert. Mittels auxotropher Selektion und blau/weiß *lacZ*-Screening können die positiven Klone anschließend identifiziert werden (Chien et al., 1991; Fields and Sternglanz, 1994). So wurde z.B. in einem *Screen* gegen den C-Terminus von p27 ein 38 kDa großes Protein identifiziert, welches bei Überexpression in Säugerzellen zur Translokation von p27^{Kip 1} aus dem Kern ins Cytoplasma und dort zu dessen Abbau führt (Tomoda et al., 1999).

Bisher wurden sowohl Proteine, die gewöhnlich im Kern lokalisiert sind als auch cytoplasmatische, mitochondriale, Membran-assoziierte und extrazelluläre Proteine erfolgreich im *Yeast Two Hybrid System* untersucht (Fields and Sternglanz, 1994).

1.3 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

1.3.1 Was ist FRET ?

FRET ist ein physikalischer Prozess, bei dem ein angeregtes Donor-Chromophor einen Teil seiner Elektronenanregungsenergie strahlungslos, in Form einer intermolekularen *long range* Dipol-Dipol Kopplung auf einen geeigneten Akzeptor überträgt (Förster, 1946). Ein derartiger Energietransfer kann über Distanzen von bis zu 100 Å erfolgen (Clegg, 1995).

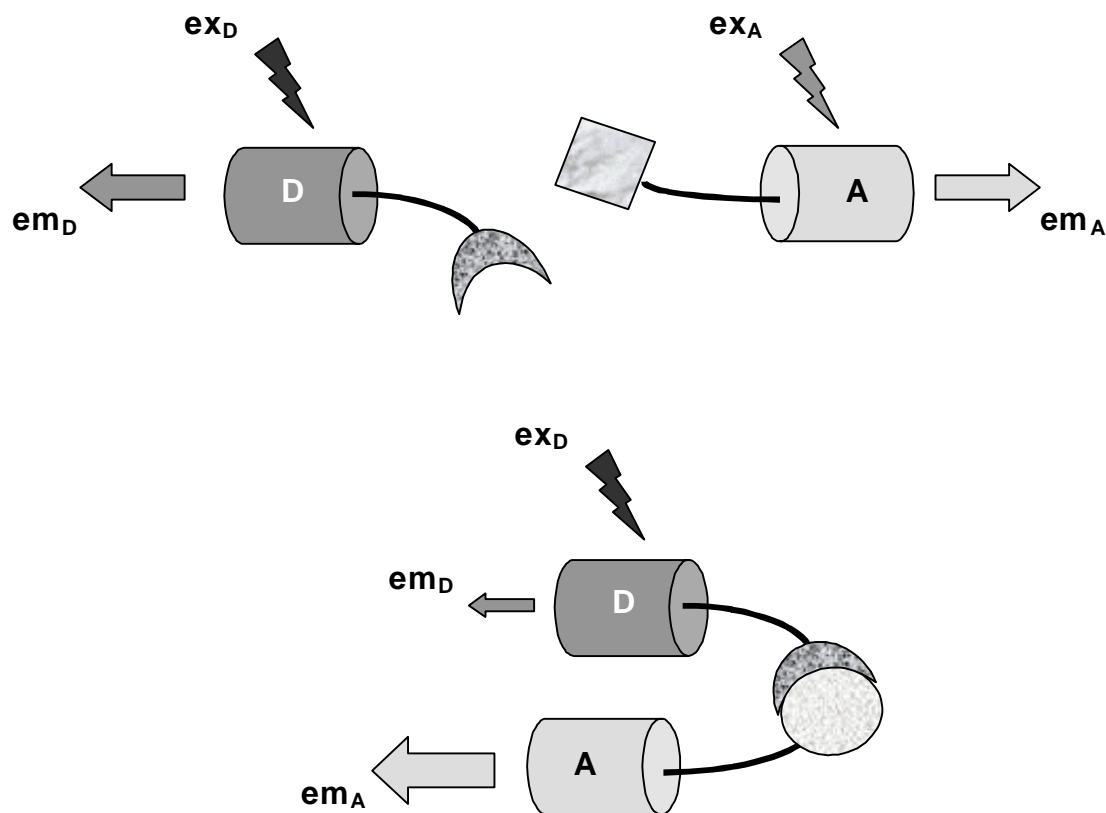


Abb. 1.2: Prinzip des Fluoreszenz Resonanz Energietransfers. Anregung und Emission von Donor (D) und Akzeptor (A) ohne Energietransfer (oben); mit Energietransfer (unten) Lichtemission durch Akzeptor nach Donor-Anregung.
ex: excitation, em: emission

Handelt es sich bei dem Akzeptor ebenfalls um ein fluoreszierendes Molekül, wird bei vorliegendem FRET nach Anregung des Donors ($\lambda_{\text{ex, max, D}}$) Fluoreszenzlicht vom Akzeptor ($\lambda_{\text{em, max, A}}$) emittiert (Förster, 1949). Die verstärkte Anregung des Akzeptor durch den Energietransfer resultiert in einer Sensibilisierung der Akzeptor-Fluoreszenz. Die Donor-Fluoreszenz hingegen wird durch den Energietransfer abgeschwächt (Förster, 1949). Weiterhin wird ein schnelleres Ausbleichen des Donors und ein langsames Bleichen des Akzeptors beobachtet (Förster, 1949).

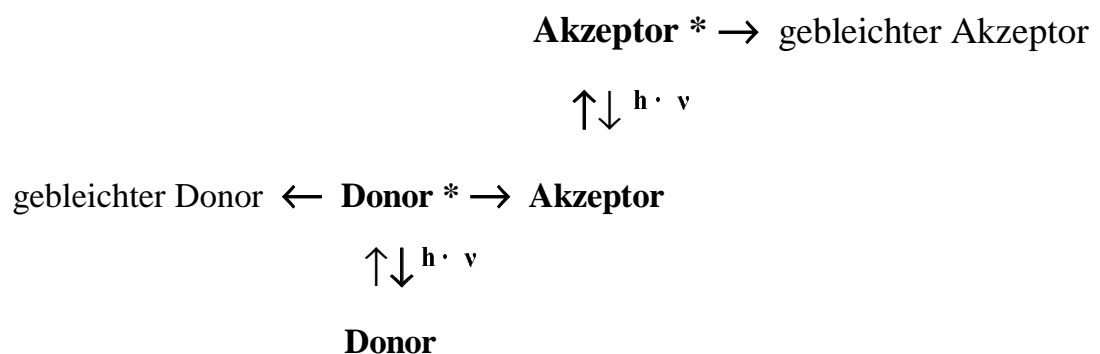


Abb. 1.3: Schema zur Verdeutlichung des Einflusses von FRET auf Quantenausbeute und Bleichverhalten von Akzeptor (A) und Donor (D). Bei vorliegendem FRET kann der angeregte Donor (D^*) einen Teil seiner Energie auf den Akzeptor übertragen, d.h. weniger $D^* \Rightarrow$ geringere Quantenausbeute, höhere Lebensdauer. Der Akzeptor liegt aufgrund zusätzlicher Anregung vermehrt im angeregten Zustand, A^* , vor \Rightarrow höhere Quantenausbeute, geringere Lebensdauer (verändert nach Förster, 1949)

1.3.2 Voraussetzungen für FRET

Der Abstand zwischen Donor- und Akzeptor-Chromophor sollte weniger als 100 Å betragen, da die FRET-Effizienz proportional zu $1/r^6$ (r = Abstand zwischen den beiden Chromophoren) abnimmt (Clegg, 1995; Stryer and Haugland, 1967).

Für einen effizienten Energietransfer über Distanzen von bis zu 100 Å, muss die Überlappung von Donor-Emissionsspektrum und Akzeptor-Anregungsspektrum ausreichend groß sein. Weiterhin sollten Quantenausbeute des Donors (Φ_D) und Absorptionskoeffizient des Akzeptors (ϵ_A) möglichst hoch sein (z.B.: $\Phi_D \geq 0,1$ und $\epsilon_A \geq 1000$; Clegg, 1995).

Da es sich bei der Dipol-Dipol Interaktion um einen vektoriellen Prozess handelt, sollten Donor und Akzeptor entweder optimal zueinander ausgerichtet sein oder aber eines der beiden Moleküle sollte einen gewissen Grad an Rotationsfreiheit besitzen (Clegg, 1995).

1.3.3 Quantifizierung von FRET

Die Effizienz des Energietransfers kann laut Förster (1948) nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$$

Dabei ist τ_d die Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors, r ist der Abstand zwischen Donor und Akzeptor und R_0 (Förster-Radius) die Distanz, bei der die FRET-Effizienz 50% beträgt (Förster, 1949; Mitra et al., 1996).

$$R_0 = \frac{\kappa^2 \Phi_d J}{n^4}$$

R_0 wiederum ist abhängig von der Orientierung des Donors und Akzeptors zueinander (κ^2), der Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit des Akzeptors (Φ_d), dem Überlappungsintegral (J), welches den Überlappungsgrad von Donor-Emissions- und Akzeptor-Anregungsspektrum repräsentiert und dem Brechungsindex des umgebenden Mediums (n) (Förster, 1949; Mitra et al., 1996).

Da meist der Abstand zwischen den Chromophoren und deren Orientierung zueinander nicht bekannt ist, kann die praktische Quantifizierung des Energietransfers mit Hilfe dieser Formel nicht erfolgen.

Es gibt jedoch drei grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten die FRET-Effizienz experimentell zu bestimmen (Stryer, 1978):

Eine Möglichkeit ist die **Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität von Donor oder Akzeptor** zunächst bei Abwesenheit und anschließend bei Anwesenheit des jeweiligen FRET-Partners. Eine Zunahme der Akzeptor-Emission bzw. Abnahme der Donor-Emission lässt hierbei auf einen vorliegenden Energietransfer schließen (siehe auch

1.3.1). Diese Methode eignet sich jedoch nur für Systeme, bei denen das zweite Chromophor direkt zu dem Ansatz, in dem die Quantifizierung des ersten Chromophors erfolgte, zugesetzt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit stellt die **Betrachtung des Bleichverhaltens von Donor oder Akzeptor** dar (Kubitscheck et al., 1991, 1993). Bei vorliegendem Energietransfer wird, wie unter 1.3.1 schon beschrieben, das Gleichgewicht des Donors zum Grundzustand, das des Akzeptors zum angeregten Zustand hin verschoben, was zur Folge hat, dass der Akzeptor bei vorliegendem Energietransfer schneller, der Donor dagegen langsamer bleicht als ohne Energietransfer. Auch hier wird zunächst die Bleichdauer beider FRET-Partner separat bestimmt und anschließend mit der Bleichdauer in einem Testansatz verglichen. Diese Methode kann auch dann verwendet werden, wenn eine eindeutige Quantifizierung der einzelnen Komponenten in dem Testansatz nicht möglich ist.

Eine einfachere Art der Quantifizierung ist die **Betrachtung des Emissionsspektrums bei Donor-Anregung** (Mitra et al., 1996; Sagot et al., 1999; Xu et al., 1998). Dabei sollte die Donor-Emission nach 1.3.1 mit zunehmendem Energietransfer schwächer, die des Akzeptors stärker werden. Diese Methode eignet sich besonders gut zur Detektion von Enzymaktivitäten. Dabei werden die Chromophore an beide Enden eines geeigneten Substrats fusioniert und die Abnahme des Energietransfers infolge Spaltung des sog. Chamäleon-Substrats detektiert (Abb. 1.4).

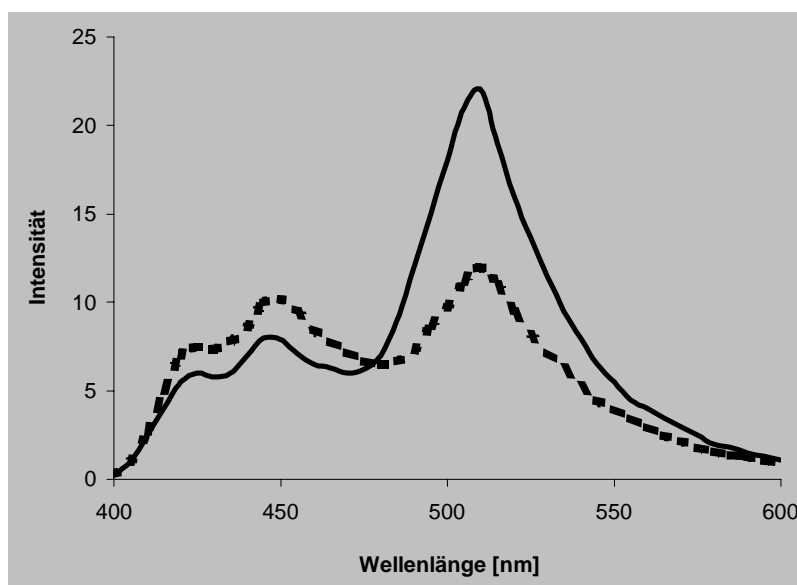


Abb. 1.4: Resonanzenergietransfer eines Chamäleon-Substrats vor (—) und nach (---) enzymatischer Spaltung. Bei vorliegendem Energietransfer ist eine Schwächung des Donorpeaks (450 nm, BFP) und eine Verstärkung der Akzeptoremission (510 nm, GFP) zu beobachten. (verändert nach Heim and Tsien, 1996)

1.3.4 Einsatzmöglichkeiten

Die FRET-Methode wird schon seit 50 Jahren eingesetzt, um auf molekularer Ebene sowohl Interaktionen als auch Distanzen quantitativ in zellfreien oder zellulären Systemen zu bestimmen.

Sie eignet sich zur Bestimmung von Interaktionen zwischen löslichen Proteinen, Membranproteinen sowie Lipidkomponenten von Membranen oder Nukleinsäuren. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Proteinkinase C mit bestimmten Lipiden interagiert (Pap et al., 1993). Auch der toxische Effekt cytolytischer Substanzen, der auf Porenbildung in der Zellmembran aufgrund Einlagerung und Aggregation von Peptiden zurückzuführen ist, wurde mittels FRET-Technik untersucht (Gazit and Shai, 1993).

Ebenso können die durchschnittlichen Abstände von Proteindomänen oder Komplex-Untereinheiten zueinander oder zur Membran bestimmt werden und wie für die Ca^{2+} -ATPase eine dreidimensionale Karte des Proteinkomplexes und gegebenenfalls dessen Lage in der Membran erstellt werden (Corbalan-Garcia et al., 1993).

Die von Yang and Söll (1974) ermittelten Distanzen zwischen 5'-Ende, 3'-Ende (Aminosäure-Bindestelle) und den drei *Loops* (u.a. Anticodon-*Loop*) eines tRNA-Moleküls stimmten sehr genau mit den kristallographisch gewonnenen Daten überein (Stryer, 1978).

Auch Strukturänderungen innerhalb eines Moleküls lassen sich mittels FRET detektieren. Diese Eigenschaft machten sich Miyawaki et al. (1997, 1999) bei der Konstruktion eines Ca^{2+} -Sensors (sog. Biosensor; siehe auch Abb. 1.7) zunutze, der die quantitative Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration u.a. in Zellorganellen ermöglicht.

Mittlerweile existieren diverse Biosensoren und Chamäleon-Substrate (siehe auch 1.3.3) für die Detektion verschiedener Substanzen oder deren Aktivitäten.

Xu et al. (1998) konstruierten ein Chamäleon-Substrat, mit dem die Aktivität von Caspase-3, einer intrazellulären Protease, die während des programmierten Zelltods aktiviert wird, detektiert werden kann. Die Verringerung des Energietransfers beruht hierbei auf Substratspaltung (Abb. 1.5).

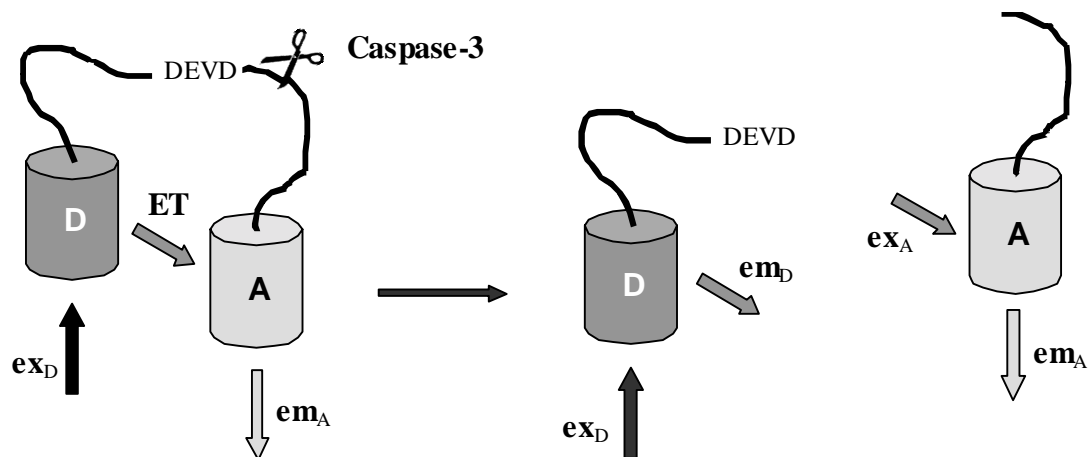


Abb. 1.5: Detektion von Enzymaktivitäten unter Verwendung von Camäleon-Substraten. Die Aktivierung von Caspase-3 infolge des einsetzenden Zelltods führt zur Spaltung des Camäleon-Substrates an der Erkennungssequenz DEVD und damit zur Abnahme des Energietransfers (Xu et al., 1998). ex: Excitation, em: Emission, ET: Energietransfer

Adams et al. (1991) verwendeten eine cAMP-abhängige Proteinkinase zur Detektion der cAMP-Konzentration (Abb. 1.6). Dafür wurde die katalytische Untereinheit mit Fluorescein (Donor), die regulatorische mit Rhodamin (Akzeptor) markiert. Im Holoenzymkomplex überträgt der Donor Elektronenanregungsenergie auf den Akzeptor. Durch Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit dissoziiert der Komplex $[(R \cdot cAMP)_2]_2 + 2 C$, wobei der Energietransfer abnimmt.

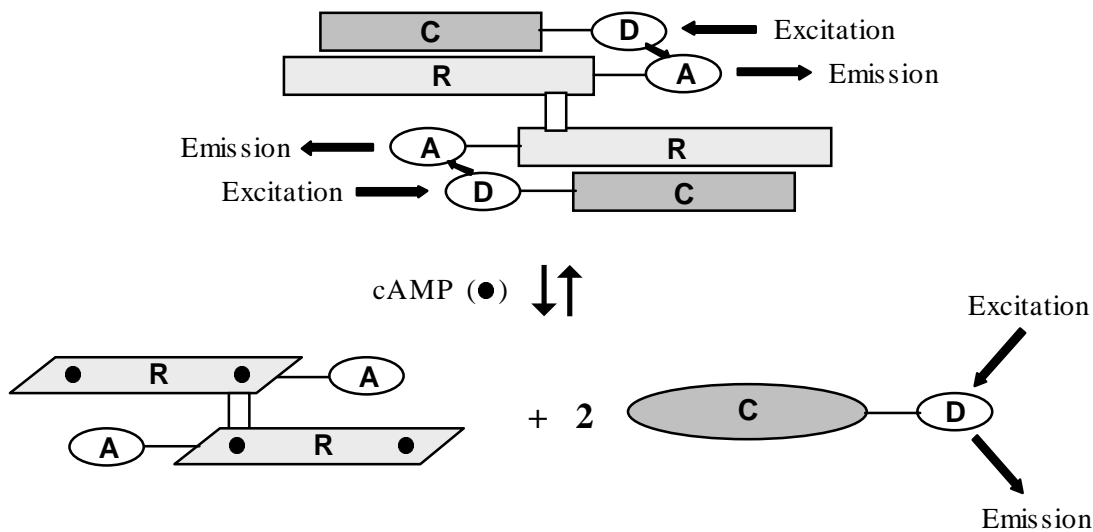


Abb. 1.6: Detektion von cAMP mittels FRET. Als Sensor wird eine cAMP-abhängige Proteinkinase verwendet, deren Untereinheiten mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Im Holoenzym-Komplex (R_2C_2) überträgt der Donor (D) einen Teil seiner Elektronenanregungsenergie auf den Akzeptor (A). Bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten (R), dissoziieren die katalytischen Untereinheiten (C) vom Enzymkomplex ab. In gleichem Maße nimmt der Energietransfer ab. (verändert nach Adams et al., 1991)

Der von Miyawaki et al. (1997, 1999) beschriebene Biosensor (Abb. 1.7) dagegen nutzt wie oben schon beschrieben die Änderung der FRET-Effizienz aufgrund von Strukturänderungen.

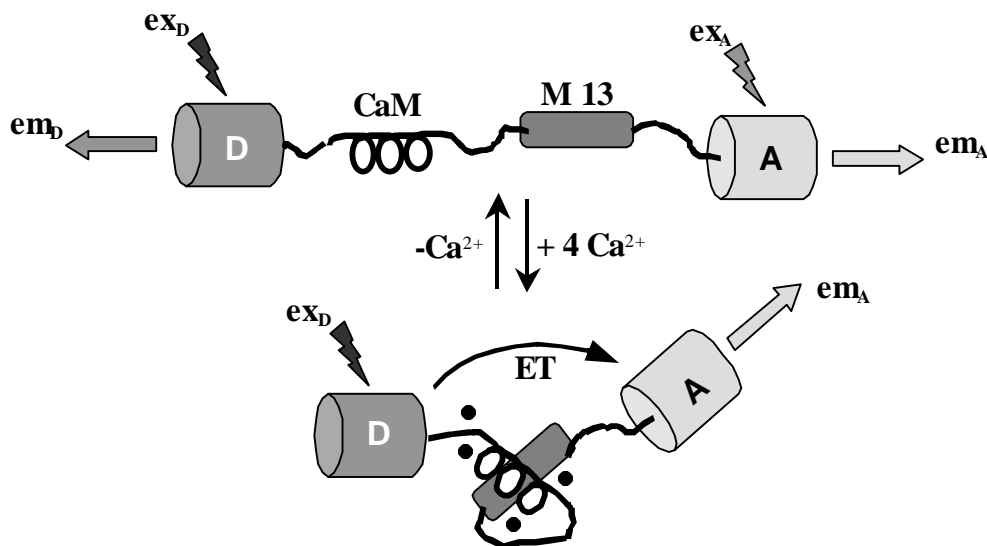


Abb. 1.7: Darstellung der Funktion eines Ca^{2+} -sensitiven Chamäleons. Durch Ca^{2+} -Bindung ändert sich die Struktur des Chamäleons, wodurch es zur Annäherung der beiden Chromophore und damit zum Energietransfer von angeregtem Donor (D) auf den Akzeptor (A) kommt. CaM: Calmodulin, M13: Calmodulin-bindendes Protein, ●: Ca^{2+} , ex: Excitation, em: Emission, ET: Energietransfer (verändert nach Miyawaki et al., 1997)

Theodor Förster beschrieb das FRET-Phänomen erstmals im Jahre 1946. Seither wurde FRET häufig eingesetzt, um quantitativ molekulare Interaktionen nachzuweisen. Einen regelrechten *Boom* erlebt diese Technik jedoch seit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP; Shimomura et al., 1962) und der Entwicklung diverser Spektralvarianten (Tsien, 1998), weil dadurch die Verwendung von FRET zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen v.a. in zellulären Systemen sehr viel einfacher wurde. Diesem faszinierenden Protein soll daher ein eigener Abschnitt gewidmet werden.

1.4 Das grün fluoreszierende Protein (GFP)

Das GFP ist ein in vielerlei Hinsicht außergewöhnliches Molekül: Es nimmt eine bisher einzigartige dreidimensionale Struktur ein, der Fluorophor wird aus modifizierten Aminosäuren der Polypeptidkette gebildet und es ist das erste Protein bei dem intramolekular ein Förster-Zyklus beobachtet wurde.

1.4.1 Die Entdeckung von GFP

Bei dem Versuch, die lumineszierende Komponente, Aequorin, aus der Qualle *Aequorea victoria* zu isolieren, stießen Shimomura et al. (1962) auf ein zweites, Licht-emittierendes Molekül, das GFP.

Dieses Molekül ermöglicht dem Meeresorganismus eine Biolumineszenz mit hoher Energieausbeute, indem es die bei einer weniger effizienten Chemilumineszenz-Reaktion des Photoproteins Aequorin freiwerdende Energie strahlungsfrei absorbiert und mit hoher Quantenausbeute abstrahlt (Johnson et al., 1963; Morin and Hastings, 1971; Morise et al., 1974; Ward, 1979).



Abb. 1. 8: *Aequorea victoria*

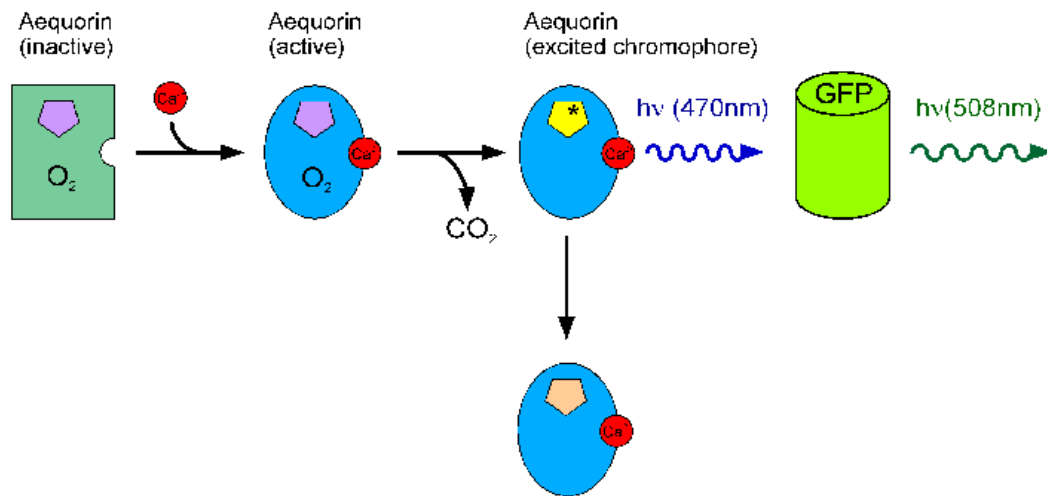


Abb. 1.9: Schematische Darstellung des Biolumineszenz-Mechanismus von *Aequorea victoria*. Aktivierung von Aequorin durch Ca²⁺-Bindung, Oxidation von Coelenterazin (violett) zu Coelenteramid (gelb), Übergang in Grundzustand durch Energietransfer auf GFP, Lichtemission durch GFP

1.4.2 Struktur und Eigenschaften von GFP

Wildtyp-GFP (wtGFP) ist ein grün fluoreszierendes, 238 Aminosäuren langes und 27 kDa schweres Protein (DNA-Sequenz: Prasher et al., 1992), das eine einzigartige dreidimensionale Struktur, sog. β -Can, einnimmt (Yang et al., 1996). Es besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die einen 40 Å langen Zylinder mit einem Durchmesser von etwa 30 Å bildet (Yang et al., 1996). Das Innere des Zylinders, der im wesentlichen aus 11 antiparallelen β -Faltblattstrukturen gebildet wird, durchzieht eine α -Helix, die nahezu im geometrischen Zentrum des Proteins von der fluorophoren Gruppe unterbrochen wird (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996). Das Fluorophor ist dabei vollständig vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt, was dessen Schutz vor Fluoreszenzlöschung, z.B. durch gelösten Sauerstoff, und damit die hohe Quantenausbeute des GFPs erklärt.

Da das Chromophor autokatalytisch aus dem Polypeptid-Rückgrat entsteht (Cubitt et al., 1995) und für dessen Bildung weder *Aequorea victoria* spezifische Enzyme noch Cofaktoren benötigt werden, ist eine rekombinante Expression in diversen Organismen möglich. So konnte GFP bisher u.a. in Bakterien (Chalfie et al., 1994), Hefen (Kahana et al.,

1995), Pflanzen (Casper and Holt, 1996), *Drosophila* (Wang and Hazelrigg, 1994), Zebrafischen (Amsterdam et al., 1996) und Säugerzellen (De Giorgi, et al., 1996; Ludin et al., 1996) erfolgreich exprimiert werden.

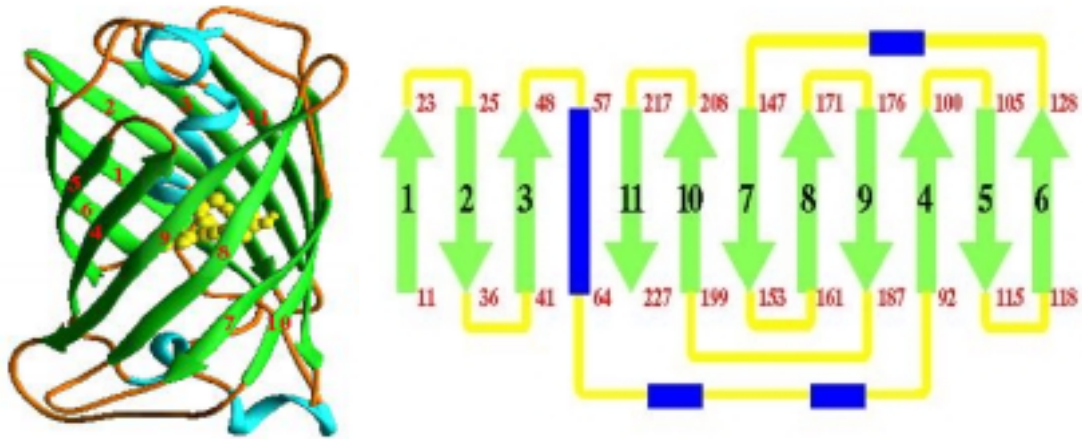


Abb. 1.10: Dreidimensionale β -Can-Struktur (links), Faltungsschema (rechts) von GFP. 11 antiparallele β -Faltblattstrukturen (grün) bilden die Wand eines Zylinders, dessen Enden durch 3 kurze α -helicale Segmente (blau) verschlossen werden. Im Zentrum dieses Zylinders befindet sich eine weitere α -Helix (blau, AS 57-64), in deren Mittelpunkt das Chromophor lokalisiert ist (links gelb dargestellt, fehlt rechts). Die verbindenden Loops sind gelb, helikale Strukturen blau dargestellt. (verändert nach Yang et al., 1996 a)

Das Protein kann sowohl N- als auch C-terminal ohne Verlust der Fluoreszenz mit anderen Proteinen fusioniert werden (Chalfie, 1995), was wahrscheinlich daran liegt, dass beide Enden des GFPs relativ flexibel aus der β -Can herausragen und daher die dreidimensionale Struktur durch das fusionierte Protein nicht maßgeblich beeinflusst wird. Deletion von mehr als der N-terminalen Aminosäure Met oder den sieben C-terminalen Aminosäuren führt jedoch zum Verlust jeglicher Fluoreszenz (Dopf and Horiagon, 1996), vermutlich weil die β -Can Struktur nicht mehr ausgebildet werden kann.

Das Spektrum von wtGFP weist ein Absorptionsmaximum bei 395 nm ($\epsilon = 30.000$ M/cm) mit einer Schulter bei 470 nm ($\epsilon = 7.000$ M/cm) auf. Das Emissionsmaximum liegt bei 509 nm (Yang et al., 1996 b).

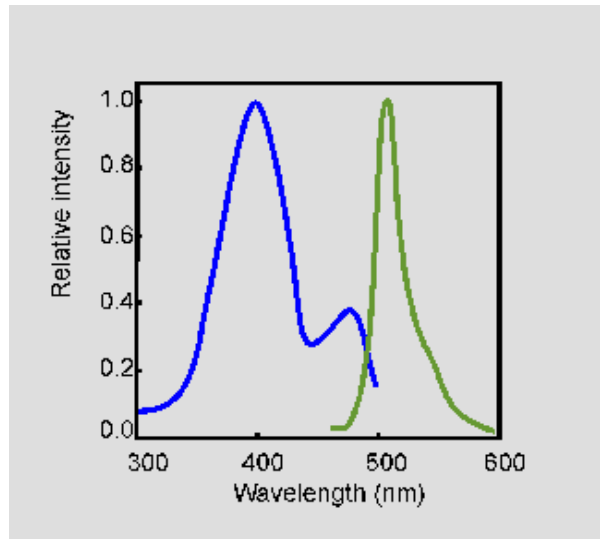


Abb. 1.11: Excitationsspektrum (blau) und Emissionsspektrum (grün) von wtGFP. (Chalfie et al., 1994)

GFP ist, vermutlich aufgrund der kompakten Struktur, ein außerordentlich stabiles Protein. Es ist über einen sehr großen pH-Bereich (pH 5-12)

stabil und denaturiert erst bei Temperaturen $> 65^{\circ}\text{C}$ (Yang et al., 1996 a). Außerdem ist es nahezu resistent gegenüber den meisten Proteasen, u.a. Trypsin, Chymotrypsin, Elastase, Papain und zeigt auch sehr hohe Stabilität in Detergenz-haltigen Lösungen wie z.B. 1% SDS, Triton X-100, Tween 80, CHAPS oder Lösungen chaotroper Substanzen wie z.B. 8 M Harnstoff, 4 M Guanidin•HCl (Ward et al., 1982).

1.4.3 Das Chromophor

GFP ist bisher das einzige fluoreszierende Protein, dessen Fluorophor nicht separat als prosthetische Gruppe synthetisiert wird, sondern aus modifizierten Aminosäuren der Polypeptidkette besteht. Mittels limitiertem Papainverdau von GFP konnte ein Hexapeptid (FSYGVQ) isoliert werden, welches dieselben spektralen Eigenschaften aufweist wie denaturiertes GFP (Chalfie, 1995; Dopf and Horiagon, 1996). Das eigentliche Chromophor jedoch entsteht aus den Aminosäuren 65-67 (Ser-*dehydro* Tyr-Gly; Cody et al., 1993). Dabei erfolgt zunächst der nukleophile Angriff der Aminogruppe von Gly 67 auf die Carbonylgruppe von Ser 65, dann bildet sich unter Eliminierung von Wasser ein Imidazolidinonring. Anschließend wird die $\text{C}^{\alpha}\text{-C}^{\beta}$ -Bindung von Tyr 66 durch Luftsauerstoff oxidiert, wodurch ein ausgedehntes delokalisiertes π -System entsteht (Heim et al., 1994).

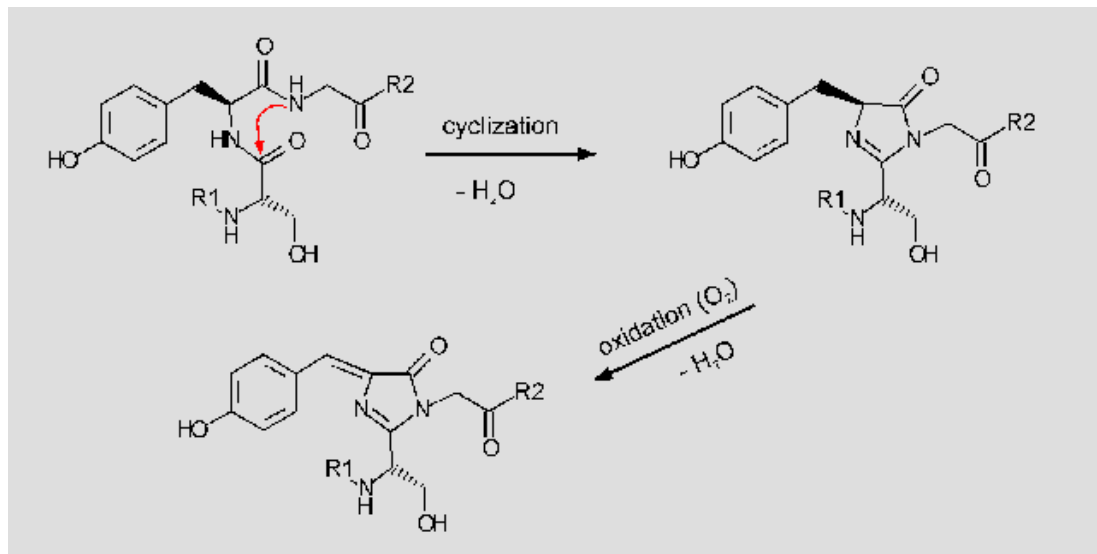


Abb. 1.12: Biosynthese des Chromophors. 1.) Zyklisierung und Dehydratisierung: nukleophiler Angriff der Aminogruppe von Gly 67 auf die Carbonylgruppe von Ser 65 mit anschließender Eliminierung von Wasser unter Bildung eines Imidazolidinonringes. **2.) Oxidation durch Luftsauerstoff:** Entstehung eines ausgedehnten delokalisierten π -Systems, p-Hydroxybenzyliden-Imidazolidon, durch Oxidation der C ^{α} -C ^{β} -Bindung von Tyr 66

In Abhängigkeit davon, ob Tyr 66 in der Hydroxyl- oder Phenolatform vorliegt absorbiert das Chromophor Licht bei 395 nm oder bei 470 nm. Die Lichtemission erfolgt jedoch ausschließlich bei 509 nm (siehe Abb. 1.11), was folgendermaßen erklärt werden kann:

Phenole reagieren bekanntlich im angeregten Zustand saurer als im Grundzustand. Daher wird angenommen, dass vorwiegend die protonierte Form des Chromophors bei 395 nm angeregt wird und anschließend unter Abgabe eines Protons in die Phenolatform (Absorption bei 470 nm) übergeht, die dann Licht bei 509 nm emittiert. Daraus resultiert ein zyklischer Prozess aus Photonabsorption, Deprotonierung, Photonemission und Aufnahme eines Protons (Abb. 1.13), der erstmals 1949 von Förster beschrieben wurde (Lossau et al., 1996).

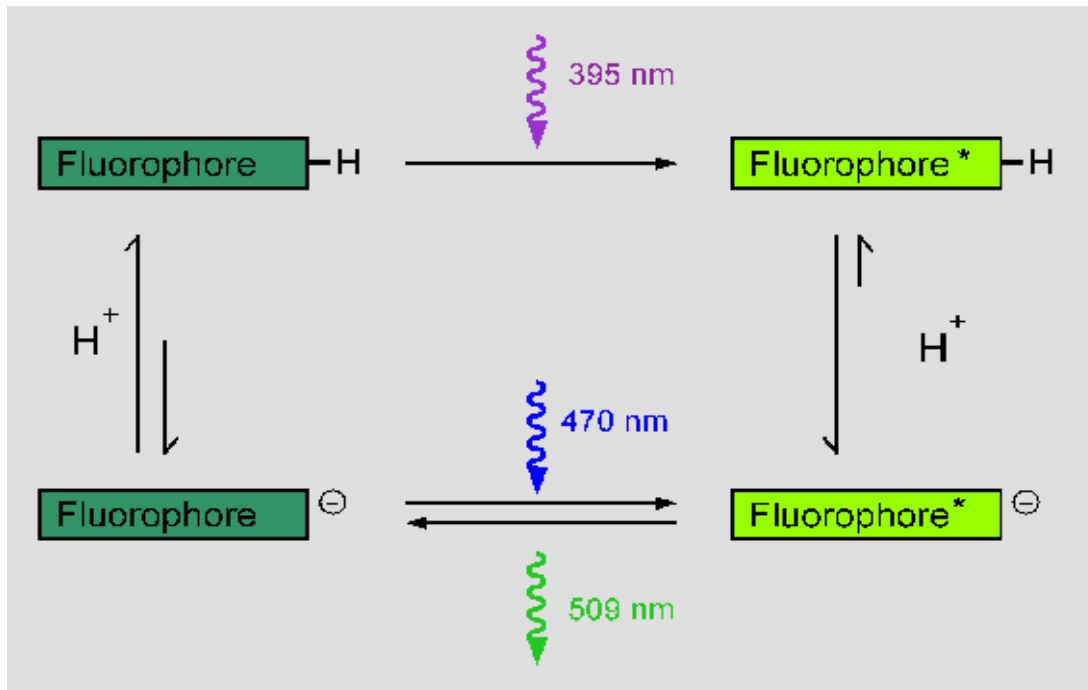


Abb. 1.13: Schematische Darstellung des Förster-Zyklus. Das Fluorophor im Grundzustand (links oben) absorbiert Licht bei 395 nm. Unter Aufnahme eines Photons erfolgt der Übergang in den saureren angeregten Zustand (rechts oben). Die Lichtemission erfolgt durch die angeregte, deprotonierte Form (rechts unten) bei 509 nm mit anschließender Protonenaufnahme. Ein Teil des Fluorophors liegt auch im Grundzustand in der deprotonierten Form vor (links unten) und absorbiert Licht bei 470 nm (Schulter des Absorptionsspektrums, Abb. 1.11). (verändert nach Lossau et al., 1996)

Obwohl das Chromophor autokatalytisch bei der Proteinfaltung entsteht und dieses Motiv (SYG) auch in einer Vielzahl weiterer Proteine gefunden wurde, liegt es in diesen nicht fluoreszierenden Molekülen weder in zyklisierter Form vor, noch ist das Tyrosin oxidiert. Demnach spielt die Primärstruktur des Moleküls eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Chromophors (Lossau et al., 1996).

1.4.4 GFP-Varianten

Aufgrund der ungewöhnlichen Stabilität, der erfolgreichen heterologen Expression in nahezu allen Organismen und dem daher großen Interesse an GFP, wurden gezielt oder mittels *DNA-Shuffling* (Cramer et al., 1996; Matsumura and Ellington, 1996) zahlreiche Varianten mit verbesserten Eigenschaften hergestellt (Chalfie and Kain, Green Fluorescent Protein: S. 284-286).

So existieren mittlerweile Varianten, die auch bei Temperaturen $> 20^{\circ}\text{C}$ eine hohe Faltungseffizienz aufweisen (Kimata et al., 1997; Siemering et al., 1996). Andere Mutationen, z.B. F64L¹, erhöhen zusätzlich die Löslichkeit in Bakterien (Cormack et al., 1996; Zerniacka-Goetz et al., 1997). Häufig führt auch die Anpassung der *Codon-Usage* auf den jeweiligen Organismus zu verbesserter Expression, z.B. Hefe-optimiertes GFP (yEGFP *mut 3* [S65G, S72A]; Cormack et al., 1997).

Durch Mutation des Chromophors (AS 65-67) oder dessen direkter Umgebung lassen sich zudem Spektralvarianten wie z.B. *blue*, *cyan* und *yellow fluorescent protein* (BFP, CFP, YFP) herstellen.

Alle bisher bekannten GFP-Varianten können in sieben Klassen eingeteilt werden (Tsien, 1998):

Klasse I bildet wie wtGFP eine Mischung aus neutralem Phenol und Phenolat-Anion, woraus ein Spektrum mit zwei Absorptionsmaxima resultiert (Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1994).

Bei der II. Gruppe liegt das Chromophor fast ausschließlich als Anion vor. Diese Varianten besitzen daher nur ein Absorptionsmaximum, das im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Rotverschiebung aufweist. Zu dieser Gruppe gehört u.a. EGFP *mut 1* mit den Mutationen F64L und S65T, die 35-mal stärker fluoresziert als wtGFP (Cormack et al., 1996).

Die Ionisierung des Chromophors wird durch die vorliegenden Mutationen, wie z.B. T203I bei den Varianten der Klasse III unterdrückt, da durch diese Mutation eine OH-Gruppe aus der direkten Umgebung des Chromophors verschwindet und das Phenolat-Anion nicht mehr ausreichend stabilisiert werden kann. Im Grundzustand liegt daher ausschließlich die Phenolform vor, die nach Anregung bei etwa 395 nm aber dennoch deprotoniert wird und daher Licht bei etwa 510 nm emittiert (Ehrig et al., 1995; Heim et al., 1994).

Wird Thr 203 durch eine aromatische Aminosäure (His, Trp, Phe, Tyr) ersetzt und liegt zusätzlich an Position 65 Gly oder Thr anstelle von Ser vor, wodurch die Deprotonierung des Chromophors gefördert wird, so

¹ **Nomenklatur für Mutationen:** original Aminosäure – Positionsnummer – Mutation (neue Aminosäure); verwendet wird dafür der Einbuchstaben-Code; z.B. F64L: Phenylalanin wurde bei dieser Mutation ersetzt durch Leucin

verschieben sich Absorptions- und Emissionsmaximum um etwa 20 nm zu größeren Wellenlängen (Ormö et al., 1996). Bei diesen gelb fluoreszierenden Spektralvarianten (*yellow fluorescent proteins*, YFP) liegt das Chromophor deprotoniert vor, wobei zusätzlich durch das *Stacking* der π -Elektronensysteme von Chromophor und Aminosäure 203 eine Anregung bei größeren Wellenlängen möglich wird (Klasse IV; Wachter et al., 1998).

Bei GFP-Varianten der Klasse V wurde Tyr 66 durch Trp ersetzt, wodurch ein Indol anstelle des Phenols oder Phenolat-Anions im Chromophor vorliegt (Heim et al., 1994). Absorptions- und Emissionsmaximum dieser *cyan fluorescent proteins* (CFP) liegen bei 436 und 476 nm und damit zwischen den Maxima der neutralen Phenolform oder der anionischen Phenolatform des Chromophors. Aufgrund der Größe des Indols sind allerdings noch weitere Mutationen in der Umgebung des Chromophors nötig, um eine ausreichende Quantenausbeute zu gewährleisten (Heim and Tsien, 1996).

Wird Tyr 66 dagegen durch His ersetzt, verschiebt das Imidazol (Klasse VI; Heim et al., 1994) Absorptions- und Emissionsmaximum nur auf 383 und 447 nm. Die *blue fluorescent proteins* (BFP) zeigen allerdings nur eine geringe Quantenausbeute und bleichen sehr schnell aus (Rizzuto et al., 1996).

Über die Varianten der Klasse VII ist nicht viel bekannt, da sie praktisch kaum eingesetzt werden. Sie tragen an Position 66 Phenylalanin und absorbieren und emittieren daher bei kürzeren Wellenlängen als wtGFP (Cubitt et al., 1995).

1.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten mittels *Yeast Two Hybrid Screen* Interaktionspartner für p27 gesucht werden. p27 interagiert mit diversen Cyclin/CDK-Komplexen und ist u.a. ein potenter Inhibitor des Cyclin A/CDK 2-Komplexes (Pines, 1993; Reed, 1992; Sherr, 1993), der den Übergang von der G1- in die S-Phase auslöst. Die katalytische Aktivität der CDK wird durch zwei Regulationsmechanismen kontrolliert: Durch Assoziation mit regulatorischen Untereinheiten – Cyclinen und CDK-Inhibitoren wie z.B. p27 – sowie durch Phosphorylierung (Coleman and Dunphy, 1994; Sherr and Roberts, 1995). Durch Assoziation des Zellzyklus-abhängig exprimierten Cyclins mit der entsprechenden, konstitutiv exprimierten CDK bildet sich ein Komplex, der durch Phosphorylierung eines CDK-Threoninrestes in die aktive Form übergeht (Solomon, 1993). Dabei wird die Blockierung des aktiven Zentrums durch die inhibitorische Domäne aufgehoben (Debondt et al., 1993; Jeffrey et al., 1995). p27 kann sowohl den aktiven Komplex blockieren als auch die Aktivierung verhindern. Werden normale Zellen bis zu hoher Zelldichte kultiviert, stellen sie das Wachstum ein und gehen in Zellzyklusarrest, wobei sie erhöhte p27-Konzentrationen aufweisen (Coats et al., 1996; Firpo et al., 1994; Nourse et al., 1994). Andererseits kann durch Überexpression von p27 auch ein G1-Arrest ausgelöst werden (Toyoshima and Hunter, 1994). Die Otogene AG, mit deren Unterstützung diese Arbeit angefertigt wurde, dagegen hat sich das Ziel gesetzt, einen Wirkstoff zu finden, der durch Blockierung von p27 die Zellen zur Zellteilung anregt und damit die Regeneration von Zellen im Innenohr ermöglicht.

Weiterhin sollte ausgehend vom *Yeast Two Hybrid* System ein auf FRET basierendes System in Hefe aufgebaut werden, das aufgrund der Fluoreszenz-Detektion der Interaktion eventuell später als *High Throuput Screening*-Methode eingesetzt werden könnte. Dafür mußten zunächst ausgehend von einem Hefe-optimierten yEGFP geeignete Spektralvarianten mittels gezielter Mutation durch PCR hergestellt werden. Für die Kalibrierung des Systems mußten außerdem geeignete Kontrollen konstruiert werden. In diesem System sollten dann ebenfalls die schon im *Yeast Two Hybrid* System untersuchten Zellzyklus-Proteine getestet werden. Geeignete Proben sollten dafür in einem Fluoreszenz-Spektrometer vermessen und auf eine Interaktion hin überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 DNA-Matrizen

DNA	Größe	Accession	Vektor	Mutationen
yEGFP <i>mut 3</i>	714 bp		pUC 19	[S65G, S72A]; optimiert auf die <i>Codon-Usage</i> von Hefe (Cormack et al., 1997)
human p27 ^{Kip1}	594 bp	U 10906	CS 2+	109 Val (GTC) → Gly (GGC)
human p38	1002 bp	U 65928	SK -	127 Val (GTG) → Val (GTT) 129 His (CAC) → Arg (CGC) 189 Tyr (TAC) → Tyr (TAT) 248 Asn (AAT) → Asn (AAC)
human CDK 2	897 bp	X 61622	CS 2+	177 Ser (TCG) → Cys (TGC)
human Cyclin A	1296 bp	X 51688	CS 2+	wie Originalsequenz

Tab. 2.1: Verwendete DNA-Matrizen mit Angaben zu Abweichungen von den Originalsequenzen

Die p27-, CDK 2- und Cyclin A-DNA wurde von Otogene Inc. USA bereitgestellt.

Dr. Jost Ludwig, AK Ruppertsberg, Universität Tübingen, stellte für die Firma p38-DNA aus der mRNA einer menschlichen Mandel her.

Die yEGFP *mut 3*-DNA stellte freundlicherweise Dr. Alistair J.P. Brown vom Institute of Medical Science, University of Aberdeen zur Verfügung.

2.1.2 Synthetische Oligonukleotide

(Liste der verwendeten Oligonukleotide im Anhang)

2.1.3 Plasmide

Plasmid	Größe	Beschreibung	Accession
pUC 19	2,7 kb	Amp ^r zur Selektion in <i>E.coli</i>	L 09137
pUC 19 (-Nde I)	2,7 kb	Nde I-Schnittstelle durch Auffüllen der kohäsiven Enden mit anschließender <i>blunt end</i> -Ligation zerstört	

Tab. 2.2: Klonierungsvektoren; Plasmide für die Proteinexpression in Bakterien

(weitere Plasmide siehe 2.2.1)

2.1.4 Arbeiten mit Bakterien

2.1.4.1 Bakterienstamm

Escherichia coli-Stamm XL1-blue Stratagene
[Bullock et al. (1987)]

2.1.4.2 Kultivierung von *E. coli*, Anlegen von Glycerolkulturen

Glycerol (autoklavieren) Merck

Luria Broth (LB) Medium, pH 7,5:

Pepton aus Casein	10 g/l	Roth
Hefeextrakt	5 g/l	Difco
NaCl	10 g/l	Roth

bei 121°C für 20 min autoklavieren

LB-Agarplatten, pH 7,5:

LB-Medium (fertige Mischung)	25 g/l	Gibco
Agar	15 g/l	Roth

bei 121°C für 20 min autoklavieren

Antibiotika-Lösungen:

	Stammlösung:	Endkonzentration:	
Ampicillin	100 mg/ml (H ₂ O)	100 µg/ml LB-Medium	Sigma
Kanamycin	30 mg/ml (EtOH)	30 µg/ml LB-Medium	Sigma
Tetracyclin	15 mg/ml (EtOH)	15 µg/ml LB-Medium	Sigma

Antibiotika dürfen dem autoklavierten Medium erst nach Abkühlen auf etwa 50°C zugesetzt werden.

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgt im allgemeinen über Nacht in gegebenenfalls Antibiotikum-haltigem LB-Medium bei 37°C und 220 rpm in Erlenmeyerkolben (evtl. mit Schikanen).

5 ml-Übernachtkulturen werden in sterilen Reagenzgläsern mit Aluminiumkappen oder 15 ml-Falconröhrchen angesetzt. Angeimpft werden die 5 ml-Kulturen jeweils mit nur einer einzelnen *E. coli*-Kolonie.

Zum Anlegen von **Glycerol-Kulturen** werden die Bakterienzellen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 (logarithmisches Wachstum) in LB-Medium gegebenenfalls mit Antibiotikum kultiviert. Die Zellen werden bei 5.000 x g für 5-10 min pelletiert und das Pellet in demselben Volumen LB-Medium mit 10% Glycerin (+ Antibiotikum) resuspendiert. Die Aliquots werden bei -80°C gelagert.

2.1.4.3 Kultivierung von *E. coli* zur Gewinnung einer ausreichenden Menge Library Plasmid-DNA (Solid State Amplification)

MATCHMAKER Random Peptide Library Clontech

2 x LB-Agarose, pH 7,0:

Bacto-Trypton	20 g/l	Difco
Hefeextrakt	10 g/l	Difco
NaCl	10 g/l	Roth
SeaPrep [®] Agarose ²	3 g/l	Biozym

pH-Wert einstellen und 20 min bei 121°C autoklavieren.

² SeaPrep[®] Agarose geliert erst bei 8-17°C und bleibt dann auch bei Temperaturen bis zu 50°C gelartig.

Die *Random Peptide Library* von Clontech besteht aus $\geq 1 \times 10^7$ unabhängigen Klonen. Jeder Klon codiert für ein anderes 16er Peptid, welches in Hefe als Fusionsprodukt mit der Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsaktivators exprimiert wird. Die *Library* wird als *E. coli* DH10B-*Stock* geliefert und muß zur Gewinnung einer ausreichenden Menge Plasmid-DNA zunächst amplifiziert werden. Um zu gewährleisten, daß alle 10^7 Klone gleichermaßen wachsen können, dürfen die Bakterienzellen nicht in Flüssigmedium kultiviert werden. Da die Kultivierung auf einer ausreichenden Anzahl Agarplatten (ca. 150 Platten, 150 mm Ø) aber sehr aufwendig ist, werden die Bakterien hier in einer Art Gelee kultiviert.

Zunächst muß der Bakterientiter der original *Library* bestimmt werden. Dazu wird der *Library* ein Aliquot entnommen und mehrere Verdünnungen ($1:10^4$, 10^5 , 10^6 und 10^7) angesetzt. $2 \times 100 \mu\text{l}$ jeder Verdünnung werden auf LB/Amp-Platten ausplattiert, über Nacht kultiviert und anschließend der Titer (cfu/ μl) bestimmt.

Die LB-Agarose (2x) wird nach dem Autoklavieren unter ständigem Rühren auf 25-30°C abgekühlt, Ampicillin (100 $\mu\text{g/ml}$) und Bakterien (1000 cfu/ml) zugesetzt und ein 100 μl -Aliquot zur Titerbestimmung abgenommen. Anschließend wird die noch flüssige Kultur in eisgekühlte 50 ml-Falconröhrchen (max. 20 ml/Röhrchen; ausreichende Belüftung) oder andere geeignete Gefäße gefüllt. Die Agarose sollte dabei möglichst schnell gelieren, um ein Absetzen der Bakterienzellen zu verhindern. Die Kulturen werden mindestens 24 h bei 37°C inkubiert bis kugelförmige Bakterienkolonien sichtbar werden. Die Bakterien sollten in dem Agarosegelee „schweben“ und sich nicht am Boden abgesetzt haben. Anschließend werden die Bakterien bei 6.000 x g und **Raumtemperatur** 15 min zentrifugiert. Die Kultur sollte dabei noch möglichst warm sein, um größere Verluste durch zu fest werdende Agarose zu vermeiden. Das Zellpellet wird in einer geeigneten Menge LB/Amp-Medium 15-30 min bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt anschließend wie unter (2.1.7.5.2) beschrieben.

2.1.4.4 Herstellung kompetenter Bakterien

SOB-Medium, pH 7,0:

Casein-Hydrolysat, säurehydrolysiert	20 g/l		Roth
Hefeextrakt	5 g/l		Difco
NaCl	10 mM		Roth
KCl	2,5 mM		Roth

pH-Wert einstellen und bei 121°C 20 min autoklavieren.

TB-Puffer, pH 6,7:

PIPES	3,0 g/l	10 mM	Sigma
CaCl ₂	1,66 g/l	15 mM	Sigma
KCl	18,6 g/l	250 mM	Roth

mit KOH auf pH 6,7 einstellen, anschließend

MnCl ₂	10,9 g/l	55 mM	Sigma
-------------------	----------	-------	-------

zugeben und die Lösung steril filtrieren (0,2 µm).

Mg²⁺-Lösung:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	10,1 g/50 ml	2M	Merck
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	12,3 g/50 ml	2 M	Merck

steril filtrieren (0,2 µm)

DMSO (für Zellkultur)			Sigma
-----------------------	--	--	-------

Bei -80°C gelagerte XL1-blue langsam auf Eis auftauen, auf einer LB- oder LB/Tet-Platte ausstreichen (Verdünnungsausstrich) und über Nacht bei 37°C inkubieren. Am nächsten Tag 2 x 125 ml SOB-Medium mit je 5-6 Kolonien animpfen, zu jedem Ansatz 1,25 ml Mg²⁺-Lösung pipettieren und die Bakterien bei 22-25°C und 225 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 wachsen lassen (ca. 24 h). Die Übernachtskulturen auf Eis 10 min abkühlen lassen, in eisgekühlte 50 ml-Falconröhrchen füllen und bei 2.500 x g und 4°C 10 min zentrifugieren. Das Pellet jeder Kultur vorsichtig in 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendieren, 10 min auf Eis inkubieren und nochmals zentrifugieren. Jedes Pellet in 10 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendieren, 750 µl DMSO zugeben, 10 min auf Eis inkubieren und aliquotieren. Die Aliquots sofort in flüssigem Stickstoff schockfrieren und anschließend bei -80°C lagern.

Es ist darauf zu achten, daß die Zellen ständig gut gekühlt werden. Falconröhrchen und Eppendorfcups sollten mindestens 1 h auf Eis vorgekühlt, Pipettenspitzen und Pipetten über Nacht in den Gefrierschrank gelegt werden. Die kompetenten Zellen sollten mindestens eine Transformationseffizienz von 1×10^6 cfu pro μg transformierter Plasmid-DNA aufweisen.

2.1.4.5 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

(Hanahan, 1985)

Die bei -80°C gelagerten kompetenten Zellen werden auf Eis langsam aufgetaut. 50 μl Zellen werden vorsichtig mit 5 μl Ligationsansatz (immer 1/10) gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach werden die Transformationsansätze 90 s bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Zu jedem Ansatz werden 250 μl LB-Medium (ohne Antibiotikum) pipettiert und bei 37°C und 550 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Dabei richtet sich die Inkubationsdauer nach der jeweiligen Antibiotika-Resistenz des transformierten Plasmids. 150 μl des Transformationsansatzes werden auf einer Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

minimale Inkubationsdauer in LB-Medium (ohne Antibiotikum) in Abhängigkeit von der Antibiotika-Resistenz:

Ampicillin	Amp	20-30 min, kann auch direkt ausplattiert werden
Kanamycin	Kan	30-45 min
Tetracyclin	Tet	30-45 min

2.1.4.6 Transformation von Plasmid-DNA in superkompetente *E. coli*

Soll Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert werden, so empfiehlt sich die Isolation mit dem „Yeast DNA Isolation System“ von Stratagene (siehe 2.2.7). Dabei wird eine einzelne Hefekolonie innerhalb von 10 min aufgeschlossen, kurz bei $10.000 \times g$ in einer Tischzentrifuge (Heraeus) zentrifugiert und ein Aliquot des Überstands in superkompetente XL1-blue transformiert. Anschließend wird vorgegangen wie unter 2.1.7 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA beschrieben.

superkompetente XL1-blue

Stratagene

β-Mercaptoethanol-Stammlösung:

β-Mercaptoethanol	1,42 M	Sigma
-------------------	--------	-------

Mg²⁺-Lösungen:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 M	Merck
--	-----	-------

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 M	Merck
--	-----	-------

beide Lösungen steril filtrieren (0,2 μm).

Glucose-Lösung:

Glucose	2 M	Merck
---------	-----	-------

steril filtrieren (0,2 μm).

NZY⁺ Broth:

Casein-Hydrolysat, säurehydrolysiert	10 g/l	Roth
--------------------------------------	--------	------

Hefeextrakt	5 g/l	Difco
-------------	-------	-------

NaCl	5 g/l	Roth
------	-------	------

bei 121°C 20 min autoklavieren und vor Gebrauch pro Liter folgendes zusetzen:

je 12,5 ml der beiden Mg²⁺-Lösungen und 10 ml Glucose-Lösung

Die bei -80°C gelagerten superkompetenten XL1-blue werden auf Eis langsam aufgetaut, vorsichtig gemischt und jeweils 75 μl in eisgekühlte 15 ml-Falconröhrchen (Falcon® 2059 polypropylene tubes) vorgelegt. Es werden jeweils 1,3 μl β-Mercaptoethanol (Endkonz.: 25 mM) dazupipettiert und 10 min auf Eis inkubiert, wobei jeder Ansatz zu Beginn und dann alle 2 min vorsichtig durchmischt wird. Danach werden 2 μl eines Hefezellysats (2.2.8) dazupipettiert und alles 20-30 min auf Eis inkubiert. Für die Kontrolltransformation wird anstelle des Zellysats 0,1 ng eines Kontrollplasmids dazupipettiert. Die Zellen werden anschließend 40 s in einem 42°C warmen Wasserbad erhitzt, dann sofort auf Eis gestellt und 2 min inkubiert. Jedem Ansatz werden 400 μl NZY⁺ Broth zugesetzt und die Zellen 1 h bei 37°C und 225-250 rpm inkubiert. 5 μl der Kontrolltransformation werden auf einer LB/Amp-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die restlichen Transformationsansätze werden komplett auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und ebenfalls bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei der

Kontrolltransformation sollten 100-500 Kolonien, bei den restlichen Transformationen 10-200 Kolonien auf den LB-Agarplatten wachsen.

2.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die *polymerase chain reaction* (PCR) ermöglicht die spezifische *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten. Die zu amplifizierende DNA-Sequenz wird dabei durch zwei Primer (Oligonukleotide) festgelegt, die sequenzspezifisch an die hitzedenaturierte Template-DNA binden und gleichzeitig die 5'-Enden von codierendem und nicht-codierendem Strang bilden.

2.1.5.1 Standard PCR

Taq-Polymerase	Synthese von 1000 bp/min	Stratagene
Vent-Polymerase		Stratagene
Pfu-Polymerase	Synthese von 500 bp/min	Stratagene
Deoxynukleotid Mix	100 mM; jedes dNTP 25 mM	Stratagene
Primer	100 μ M	Gibco BRL
Robo Cycler Gradient 96		Stratagene

Reaktionsansatz:

5 μ l 10 x PCR-Puffer (wird mit DNA-Polymerase mitgeliefert)
 1 μ l 5'-Primer (100 μ M)
 1 μ l 3'-Primer (100 μ M)
 1 μ l dNTPs (jedes dNTP 25 mM)
 0,5 μ g Template-DNA
 2-3 U DNA-Polymerase³
 mit autoklaviertem H₂O_{bidest} auf 50 μ l auffüllen und sofort in den Thermocycler stellen

³ Um eine möglichst hohe Lesegenauigkeit zu gewährleisten wird im allgemeinen entweder nur Pfu-Polymerase oder ein Taq/Vent-Gemisch (15:1) verwendet.

1 Zyklus:

94 °C	3 min	Denaturierung
-------	-------	---------------

15-25 Zyklen:

94 °C	30-60 s	Denaturierung
30-65 °C	30-60 s	Hybridisierung (Temperatur je nach Primer)
72 °C	s-min	Synthese (Dauer richtet sich nach Produktlänge und verwendeter Polymerase)

1 Zyklus:

72 °C	10 min	Auffüllen der Enden
-------	--------	---------------------

Mittels analytischer Agarose-Gelelektrophorese wird überprüft, ob das PCR-Produkt die erwartete Größe aufweist. Die DNA wird mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und anschließend eluiert (2.1.7.3, 2.1.7.4).

Faustregel zur Berechnung der Hybridisierungstemperatur eines Primers:

$$T_m = 4 (G/C) + 2 (A/T) - 3$$

2.1.5.2 PCR zur Herstellung spezifischer Mutationen

Sollen spezifische Mutationen in ein DNA-Fragment eingebracht werden, so müssen zunächst zwei Mutationsprimer konstruiert werden, die die gewünschte Mutation komplementär tragen. Dabei ist zu beachten, daß nur der 3' von der Mutation gelegene Bereich in die Berechnung der Hybridisierungstemperatur eingehen darf. Mit jedem Mutationsprimer und dem dazugehörigen Randprimer (begrenzt das zu mutierende DNA-Fragment) wird eine Standard PCR durchgeführt. Die Produkte dieser beiden PCRs dienen als Template-DNA für die folgende PCR:

5 µl	10 x PCR-Puffer
1-2 µl	Template-DNA (codierender Strang; Beginn → Mutation)
1-2 µl	Template-DNA (nicht-codierender Strang; Mutation → Ende)
1 µl	dNTPs (jedes dNTP 25 mM)
2-3 U	DNA-Polymerase

mit autoklaviertem H₂O_{bidest} auf 50 µl auffüllen und sofort in den Thermocycler stellen.

2 Zyklen:

94 °C	5 min	Denaturierung
37 °C	5 min	Hybridisierung
72 °C	5 min	Vervollständigung der Template-DNA

Im Anschluß daran wird je 1 µl der beiden Randprimer bei 94°C zugesetzt und eine Standard PCR durchgeführt.

2.1.6 Modifikation von DNA**2.1.6.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen	Boehringer, MBI Fermentas, New England Biolabs
EDTA, Dinatriumsalz	Sigma

Es wurden Restriktionsendonukleasen von den oben aufgeführten Firmen verwendet. Reaktionspuffer und sonstige evtl. benötigte Reagentien wie z.B. BSA, SAM, etc. werden gewöhnlich von den Firmen mitgeliefert. Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen erfolgt im allgemeinen nach Herstellerangaben. Eingesetzt werden 0,5-1,0 µg DNA und 1-10 U Enzym in 10-20 µl. Dabei ist darauf zu achten, daß nie mehr als 10 Vol.-% Enzym eingesetzt werden, da der Glyceringehalt im Reaktionsansatz 10% nicht überschreiten darf.

Soll ein DNA-Fragment mit zwei Restriktionsenzymen verdaut werden, so kann der Verdau häufig simultan in einem für beide Enzyme geeigneten Puffer (Herstellerangaben) durchgeführt werden. Ist das nicht möglich, so muß der Verdau mit den beiden Enzym sequentiell erfolgen. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Zuerst wird der Verdau in dem geringer konzentrierten Puffer durchgeführt und anschließend so viel des anderen Puffers zugesetzt, daß die Salzkonzentration für den Verdau mit dem zweiten Enzym geeignet ist.
2. Nach dem Verdau mit dem ersten Enzym wird der verwendete Reaktionspuffer durch Phenol/Chloroform-Extraktion (2.1.7.1) mit anschließender Ethanol-fällung (2.1.7.2) entfernt. Daraufhin erfolgt der Verdau mit dem zweiten Enzym in einem dafür geeigneten Puffer.

Der Verdau wird mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.1.7.3, 2.1.7.4) auf seine Vollständigkeit hin überprüft und gleichzeitig von den störenden DNA-Fragmenten befreit.

Partialverdau:

Soll bei einem Plasmid z.B. eine von mehreren identischen Schnittstellen eliminiert werden, so darf die DNA nur linearisiert und nicht vollständig verdaut werden. Die geeignete Enzym- und DNA-Menge sowie Inkubationsdauer dafür müssen in einem Test ermittelt werden. Dabei ist es äußerst wichtig den Restriktionsverdau effektiv abzustoppen. Am besten komplexiert man die gesamte im Puffer enthaltene Mg^{2+} -Menge durch einen Überschuß an EDTA. Der Partialverdau wird durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die gewünschte Bande eluiert (2.1.7.3, 2.1.7.4). Zum Entfernen der Schnittstelle durch Zerstörung der palindromen Erkennungssequenz werden die *sticky ends* durch T4 DNA-Polymerase aufgefüllt (2.1.6.5) und anschließend *blunt end* ligiert (2.1.6.2).

2.1.6.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyenden von doppelsträngiger DNA. Sie ligiert sowohl DNA mit kohäsiven als auch mit glatten Enden.

Reaktionsansatz:

T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	1 µl	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligasepuffer (10x)	1 µl	MBI Fermentas

Plasmid-DNA

Fragment-DNA (Insert)

mit autoklaviertem H_2O_{bidest} auf 10 µl auffüllen und 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubieren.

Plasmid- und Fragment-DNA wurden immer in einem molaren Verhältnis von 1:10 bis 1:100 (Vektor : Insert) eingesetzt.

2.1.6.3 Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten, für die keine Matrize vorliegt, müssen komplementäre Oligonukleotide der gewünschten Sequenz konstruiert werden. Dabei werden die überhängenden Enden dieser synthetischen Oligonukleotide komplementär zu den kohäsiven Enden der zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme gewählt. Auch die Klonierung kleiner DNA-Fragmente (< 100 bp), die bei 366 nm kaum sichtbar sind und deswegen nur schlecht mittels präparativer Gelelektrophorese aufgereinigt werden können, läßt sich auf diese Weise erleichtern.

Hybridisierungspuffer, pH 8,0:

Tris/HCl	10 mM	Sigma
EDTA, Dinatriumsalz	1 mM	Sigma
NaCl	50 mM	Roth

Die synthetischen Oligonukleotide werden in Hybridisierungspuffer aufgenommen (200 pmol/ μ l). Je 20 μ l (4 nmol) der komplementären Oligonukleotide werden zusammen in ein Eppendorfcup pipettiert, in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 95°C für 5 min inkubiert und im ausgeschalteten Heizblock langsam auf RT abgekühlt. Die entstandenen doppelsträngigen DNA-Fragmente können anschließend sofort in ein entsprechend verdautes Plasmid ligiert (2.1.6.2) werden.

2.1.6.4 Dephosphorylierung gespaltener linearisierter DNA

Bei Klonierungen mittels Schnittstellen, deren kohäsive Enden komplementär sind (z.B. Eco RI und Mun I) sollte die Plasmid-DNA vor der Ligation dephosphoryliert werden. Ansonsten werden vorwiegend die Enden des Plasmids miteinander ligiert.

Für die Dephosphorylierung von 0,5-1 µg gespaltener DNA wird folgendes zu einem 20 µl-Restriktionsansatz⁴ pipettiert:

2 µl 10 x Reaktionspuffer für Alkalische Phosphatase	Boehringer
2 µl Alkalische Phosphatase (1 U/µl)	Boehringer
16 µl autoklaviertes H ₂ O _{bidest}	

Der Ansatz wird 30 min bei 37°C in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert und das gewünschte DNA-Fragment anschließend mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt (2.1.7.3, 2.1.7.4).

2.1.6.5 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit DNA-Polymerase

Die T4 DNA-Polymerase katalysiert die Synthese von DNA an einer Matrize in 5' → 3'-Richtung. Überhängende 5'-Enden können daher mit Hilfe dieses Enzyms aufgefüllt werden. So können z.B. palindrome Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zerstört werden (siehe auch 2.1.6.1 Partialverdau).

Reaktionsansatz:

0,5-1 µg	DNA mit kohäsiven Enden	
1 µl	dNTPs (2 mM, jedes dNTP)	MBI Fermentas
2 µl	T4-DNA-Polymerase-Puffer (5x)	MBI Fermentas
0,5-1 µl	T4-DNA-Polymerase (5 U/µl)	MBI Fermentas

mit autoklaviertem H₂O_{bidest} auf 10 µl auffüllen und 10 min bei RT inkubieren

⁴ Die Restriktionsenzyme sollten möglichst vorher nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert werden.

2.1.6.6 Kinasieren der 3'-Enden linearisierter DNA mit T4 Polynukleotid-Kinase

Sollen hybridisierte synthetische Oligonukleotide in dephosphorylierte Vektoren ligiert werden, so müssen sie zuvor kinasiert werden.

Reaktionsansatz:

1-40 pmol	dephosphorylierte DNA	
20 pmol	ATP	MBI Fermentas
2 µl	T4 Polynukleotidkinase Puffer A (10x)	MBI Fermentas
2 µl	T4 Polynukleotidkinase (10 U/µl)	MBI Fermentas

mit autoklaviertem H₂O_{bidest} auf 20 µl auffüllen und 30 min bei 37°C inkubieren.

2.1.7 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA

2.1.7.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Phenol/Chloroform-Lösung (1:1):

Phenol	für Molekularbiologie	Sigma
	gesättigt mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA	
Chloroform	für Molekularbiologie	Sigma
8-Hydroxychinolin		Sigma

Der Phenol/Chloroform-Lösung (1:1) werden 4-5 Kristalle 8-Hydroxychinolin zugesetzt. Dadurch färbt sich die Lösung schwach gelb. Bei Umschlagen der Indikatorfarbe nach Rot sollte die Lösung nicht mehr verwendet werden. Bei 4°C lagern.

DNA-Lösung mit demselben Volumen der Phenol/Chloroform-Lösung (1:1) versetzen, 1 min vortexen, 2 min bei 10.000 x g in einer Tischzentrifuge (Heraeus) zentrifugieren und die wässrige (obere) Phase in ein neues Gefäß überführen. Dabei ist darauf zu achten, dass weder organische noch Interphase mitgeschleppt wird.

2.1.7.2 Ethanolpräzipitation von DNA

Natriumacetat	Merck
Ethanol	Sigma

Die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Na-Acetatlösung, pH 4,8 versetzen, das dreifache Volumen Ethanol (100%) zugeben, vortexen und auf Eis mindestens 10 min inkubieren. Anschließend mindestens 5 min bei 10.000 x g und 4°C in einer kühlbaren Tischzentrifuge (Heraeus) zentrifugieren, das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol waschen, erneut zentrifugieren und das Ethanol vollständig abnehmen. Das Pellet in 20 µl autoklaviertem H₂O_{bidest} aufnehmen.

2.1.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird eingesetzt, um Reinheit, Größe oder Konzentration einer DNA-Lösung zu überprüfen (analytisch) oder um gezielt DNA-Fragmente zu isolieren und sie dadurch von unerwünschter DNA zu befreien (präparativ).

Horizontalelektrophoresesystem	Gibco BRL
mit Power Supply, Gelkammern, Gelträgern und diversen Kämmen	
Image Master [®] VPS (312 nm)	Pharmacia Biotech
UV-Transluminator (366 nm)	NeoLab

TAE-Puffer, pH 8,0 (50x):

Tris/HCl	2 M	Sigma
Essigsäure	1 M	Merck
EDTA, Dinatriumsalz	0,5 M	Sigma

Agarose-Lösung (100 ml):

Agarose	1-2 %	Roth
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	3-4 µl	Roth

Die Agarose wird in 1 x TAE-Puffer unter Kochen gelöst und das Ethidiumbromid nach Abkühlen auf etwa 50°C zugesetzt.

Probenpuffer (6x):

Bromphenolblau	0,2 %	Boehringer
Xylencyanol FF	0,2 %	Roth
Glycerol	60 %	Merck
EDTA, Dinatriumsalz	60 mM	Sigma

DNA-Längenstandard:

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	MBI Fermentas

analytische Agarose-Gelelektrophorese:

Je nach Größe der zu analysierenden DNA, werden 1-2%-ige Agarosegele mit 5 µl-Probentaschen hergestellt. Die DNA-Proben werden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und zusammen mit einem geeigneten Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung (100-120 V) in 1 x TAE-Puffer. Durch Interkalation des zugesetzten Ethidiumbromids kann die DNA mittels UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

präparative Agarose-Gelelektrophorese:

Die präparative Gelelektrophorese erfolgt nach dem gleichen Prinzip wie die analytische Gelelektrophorese. Es werden allerdings Gele mit Probentaschen bis zu 100 µl verwendet und das Ausschneiden der DNA-Banden (Skalpell) erfolgt möglichst schnell bei weniger energiereichem UV-Licht (366 nm), um die DNA nicht zu zerstören. Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgt nach 2.1.7.4.

2.1.7.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

UV-Transluminator (366 nm)	NeoLab
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen

Nach Auftrennung der Proben mittels präparativer Gelelektrophorese werden die DNA-Banden möglichst schnell bei UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgt unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kits“ von QIAGEN nach Herstellerangaben.

2.1.7.5 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.1.7.5.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

Diese Methode dient der schnellen und preiswerten Isolierung von Plasmid-DNA für analytische Untersuchungen.

Ethanol Sigma

Phenol/Chloroform-Lösung (1:1):

Zusammensetzung und Herstellung der Lösung siehe 2.1.7.1

<u>Resuspensionspuffer, pH 8,0:</u>	(Puffer 1)	
Tris/HCl	25 mM	Sigma
Glucose	50 mM	Merck
EDTA, Dinatriumsalz	10 mM	Sigma
<u>Lysepuffer:</u>	(Puffer 2)	
NaOH	200 mM	Roth
SDS	1 %	Merck
<u>Neutralisationspuffer, pH 5,5:</u>	(Puffer 3)	
Kaliumacetat	3 M	Merck

Puffer 1 wird steril filtriert (0,2 µm), Lösung 2 und 3 werden bei 121°C 20 min autoklaviert.

1,5 ml einer 5 ml-Übernachtskultur (2.1.4.2) werden in ein Eppendorfcup überführt. Die Zellen werden 10 s bei 10.000 x g in einer Tischzentrifuge (Heraeus) abzentrifugiert, das Pellet in 50 µl Puffer 1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 60 µl Puffer 2 lysiert. Der Ansatz darf hier nur ganz vorsichtig durch Invertieren der Cups gemischt werden und sollte auch nicht länger als 2-3 min stehen. Die Neutralisation erfolgt durch Zugabe von 75 µl Puffer 3. Die ausgefallene genomische DNA wird 10 min bei 10.000 x g und 4°C in einer kühlbaren Tischzentrifuge (Heraeus) pelletiert, der Überstand in ein frisches Cup überführt und mit 180 µl Phenol/Chloroform extrahiert (2.1.7.1). Die Präzipitation der

Plasmid-DNA erfolgt mit 500 µl Ethanol (100%). Das Pellet wird mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen, das Ethanol vollständig abgenommen und das Pellet in 20 µl autoklaviertem H₂O_{bidest} gelöst.

2.1.7.5.2 Plasmid-Präparation über Anionenaustauscher-Chromatographie

Die Plasmid-Präparation mittels Anionenaustauscher-Chromatographie dient der Gewinnung großer Mengen sehr reiner Plasmid-DNA.

QIAGEN Plasmid Maxi Kit		Qiagen
QIAGEN Plasmid Giga Kit		Qiagen
Isopropanol		Merck
Ethanol		Sigma
<u>Resuspensionspuffer (P1); pH 8,0:</u>		Qiagen
Tris/HCl	50 mM	Sigma
EDTA, Dinatriumsalz	10 mM	Sigma
RNase A	100 µg/ml	Qiagen
<u>Lysepuffer (P2):</u>		Qiagen
NaOH	200 mM	Roth
SDS	1 %	Merck
<u>Neutralisationspuffer (P3); pH 5,5:</u>		Qiagen
Kaliumacetat	3,0 M	Merck
<u>Äquilibrierungspuffer (QBT); pH 7,0:</u>		Qiagen
MOPS	50 mM	Sigma
NaCl	750 mM	Roth
Isopropanol	15 %	Merck
Triton [®] X-100	0,15 %	Merck

<u>Waschpuffer (QC); pH 7,0:</u>		Qiagen
MOPS	50 mM	Sigma
NaCl	1,0 M	Roth
Isopropanol	15 %	Merck
<u>Elutionspuffer (QF); pH 8,5:</u>		Qiagen
Tris/HCl	50 mM	Sigma
NaCl	1,25 M	Roth
Isopropanol	15 %	Merck
<u>Tris/EDTA-Puffer (TE); pH 8,0:</u>		Qiagen
Tris/HCl	10 mM	Sigma
EDTA, Dinatriumsalz	1 mM	Sigma

Puffer, die MOPS oder Isopropanol enthalten dürfen nicht autoklaviert, sondern müssen sterilfiltriert (0,2 µm) werden. Die anderen Lösungen werden 20 min bei 121°C autoklaviert. Alle Lösungen sowie die Anionenaustauschersäulen sind sowohl in den oben aufgeführten Kits enthalten als auch einzeln bei QIAGEN erhältlich.

Für eine **Plasmid Maxi Preparation (300-500 µg Plasmid-DNA)** werden bei *high copy* Plasmiden 200 ml und bei *low copy* Plasmiden 400 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit 2-3 ml einer Vorkultur angeimpft.

Für eine **Plasmid Giga Preparation (7,5-10 mg Plasmid-DNA)** werden bei *high copy* Plasmiden 3.000 ml und bei *low copy* Plasmiden 6.000 ml Antibiotikum-haltiges LB-Medium mit 5-10 ml einer Vorkultur angeimpft.

Am nächsten Tag wird die Übernachtkultur bei 5.000 x g und 4°C 10 min zentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml/125 ml⁵ P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml/125 ml P2 werden die Zellen lysiert. Der Ansatz wird hierfür vorsichtig durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml/125 ml eiskaltem P3 wird der Ansatz neutralisiert und gleichzeitig die genomische DNA präzipitiert. Für eine möglichst vollständige Fällung wird der Ansatz 20 min/30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die genomische DNA bei ≥ 20.000 x g, 4°C in 30 min abzentrifugiert. Währenddessen wird eine QIAGEN-tip 500/10.000 Anionenaustauschersäule mit 10 ml/75 ml QBT äquili-

⁵ Volumenangaben für Plasmid Maxi Preparation / Plasmid Giga Preparation

briert. Der Überstand der Zentrifugation wird über einen Faltenfilter auf die Anionenaustauschersäule aufgetragen. Die Säule wird zweimal mit 30 ml/300 ml QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml/75 ml QF eluiert. Durch Zugabe von 10 ml/52 ml Isopropanol wird die Plasmid-DNA gefällt und durch Zentrifugation bei $\geq 15.000 \times g$, 4°C in 30 min pelletiert. Das DNA-Pellet wird mit 5 ml/10 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und weitere 10 min bei $\geq 15.000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird 10 min/10-20 min luftgetrocknet, in 500 μl /5 ml autoklaviertem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder TE (1:4 verdünnt) aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.1.8 Klonierungsstrategien

2.1.8.1 Subklonierung von PCR-Produkten

- Aufreinigung der PCR; präparative Gelelektrophorese, Gelelution
- Restriktionsverdau von PCR-Produkt und Vektor
- evtl. Dephosphorylierung des Vektors
- Aufreinigung der verdauten DNA; präparative Gelelektrophorese, Gelelution
- Ligation von Vektor und Fragment (Insert)
- Transformation in *E. coli*
- Mini-Präparation von Plasmid-DNA
- Überprüfung der Klone durch Kontrollverdau
- Plasmid Präparation positiver Klone (Maxi / Giga)

2.1.8.2 Subklonierung bereits klonierter DNA-Fragmente

Die Vorgehensweise entspricht weitgehend der unter 2.1.8.1 beschriebenen Subklonierung von PCR-Produkten. Hier muß allerdings das DNA-Fragment zunächst enzymatisch aus einem anderen Plasmid herausgeschnitten werden.

2.1.8.3 Subklonierung synthetischer Oligonukleotide

- Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide
- Restriktionsverdau des Vektors
- evtl. Dephosphorylierung des Vektors; Kinasieren der hybridisierten Oligonukleotide
- Aufreinigung des verdauten Vektors; präparative Gelelektrophorese, Gelelution
- Ligation von Vektor und Oligonukleotiden

Weitere Vorgehensweise wie schon unter 2.1.8.1 Subklonierung von PCR-Produkten beschrieben.

2.2 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 Plasmide

Plasmid	Größe	Beschreibung	Referenzen
GAL4 AD-Plasmide:			
pGAD GH	7,9 kb	<i>LEU2</i> -Gen zur Selektion in <i>Leu</i> ⁻ Hefen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	van Aelst et al., 1993
pGAD T7	8,0 kb	<i>LEU2</i> -Gen zur Selektion in <i>Leu</i> ⁻ Hefen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	Clontech
GAL4 DNA-BD-Plasmide:			
pGBT 9	5,5 kb	<i>TRP1</i> -Gen zur Selektion in <i>Trp</i> ⁻ Hefen Amp ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	Access.: U 07646 Bartel et al., 1993
pGBK T7	7,3 kb	<i>TRP1</i> -Gen zur Selektion in <i>Trp</i> ⁻ Hefen Kan ^r zur Selektion in <i>E. coli</i>	Clontech Louret et al., 1997

Tab. 2.3: Yeast Two Hybrid-Klonierungsvektoren (Clontech).

Plasmid	Beschreibung	Referenzen
pCL 1	Wildtyp GAL4-Gen <i>LEU2</i> -Gen zur Selektion in <i>Leu⁻</i> Hefestämmen <i>Amp^r</i> zur Selektion in <i>E. coli</i>	Fields & Song, 1989
PGAD T7-T	SV 40 <i>large T antigen</i> (84-708) in pGAD T7	Clontech
PGBK T7-53	Maus p53 (72-390) in pGBK T7	Clontech
PGBK T7-Lam	Human Lamin C (66-230) in pGBK T7	Clontech

Tab. 2.4: Yeast Two Hybrid-Kontrollplasmide (Clontech).

Plasmid	Größe	Beschreibung
pYES 2	5,9 kb	GAL1-Promoter, Proteinexpression Galaktose-induzierbar <i>URA3</i> -Gen zur Selektion in <i>Ura⁻</i> Hefestämmen <i>Amp^r</i> zur Selektion in <i>E. coli</i>
pYES 3	5,9 kb	GAL1-Promoter, Proteinexpression Galaktose-induzierbar <i>TRP1</i> -Gen zur Selektion in <i>Trp⁻</i> Hefestämmen <i>Amp^r</i> zur Selektion in <i>E. coli</i>

Tab. 2.5: Galaktose-induzierbare Expressionsvektoren (Invitrogen).

2.2.2 Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae: **HF7c** (Feilotter et al., 1994)

Genotyp: *MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4-542*, *gal80-538*,

LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,

URA3::GAL4_{17mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ

Reportergene: *HIS3*, *lacZ*

auxotrophe Marker: *trp1*, *leu2*, *cyh^r2*

***Saccharomyces cerevisiae*: Y187** (Harper et al., 1993)

Genotyp: *MAT α* , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4 Δ* , *met*, *gal80 Δ* ,

URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ

Reportergene: *lacZ*

auxotrophe Marker: *trp1*, *leu2*

***Saccharomyces cerevisiae*: PJ69-2A** (James et al., 1996)

Genotyp: *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* ,

LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,

GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2

Reportergene: *HIS3*, *ADE2*

auxotrophe Marker: *trp1*, *ura3*, *leu2*

***Saccharomyces cerevisiae*: AH109** (James et al., 1996)

Genotyp: *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* ,

LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,

GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,

ura3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

Reportergene: *HIS3*, *ADE2*, *lacZ*

auxotrophe Marker: *trp1*, *ura3*, *leu2*

***Saccharomyces cerevisiae*: INV Sc1**

Genotyp: *MAT α* , *his3 Δ 1*, *leu2*, *trp1-289*, *ura3-52*

auxotrophe Marker: *trp1*, *ura3*, *leu2*, *his3*

2.2.3 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*, Anlegen von Glycerolkulturen

Glycerol (autoklavieren)	Merck
Kanamycin	Sigma
Agar, für Platten	Difco
YPD Medium	Clontech/Anachem
Minimal SD Base	Clontech/Anachem
Minimal SD Base / Gal / Raf	Clontech/Anachem
<u>DO-Supplemente:</u>	Clontech/Anachem

-His, -Leu, -Trp, -Ura, -His/-Trp, -Leu/-Trp, -Trp/-Ura,
-Leu/-Trp/-His, -Leu/-Trp/-His/-Ade

Das Kompletmedium (YPD) wird nach Herstellerangaben in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst, mit NaOH pH 5,8 eingestellt und in einem Autoklaven mit Schnellrückkühlung (HICLAVE HV-85, NeoLab) bei 121°C 15 min autoklaviert.

Zur Herstellung von Selektionsmedium (*synthetic dropout, SD*) wird Minimal SD Base bzw. Minimal SD Base/Gal/Raf zusammen mit dem gewünschten DO Supplement nach Herstellerangaben in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst, mit NaOH pH 5,8 eingestellt und in einem Autoklaven mit Schnellrückkühlung bei 121°C 15 min autoklaviert.

Zur Herstellung von Agar-Platten wird dem Flüssigmedium 20 g/l Agar zugesetzt, **anschließend** der pH-Wert mit NaOH oder HCl auf 5,8 eingestellt und in einem Autoklaven mit Schnellrückkühlung bei 121°C 15 min autoklaviert.

Bei Bedarf kann dem Medium nach dem Autoklavieren 15 µg/ml Kanamycin (Stammlösung: 30 mg/ml in EtOH) zugesetzt werden. Dabei sollte das Medium aber schon abgekühlt sein (max. 50°C).

Die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt im allgemeinen über Nacht in Flüssigmedium bei 30°C und 220 rpm in Schikanekolben.

Zum Anlegen von **Glycerol-Kulturen** werden die Hefezellen bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,7 (logarithmisches Wachstum) in Flüssigmedium kultiviert. Die Zellen werden bei 5.000 x g für 5-10 min pelletiert und das Pellet in demselben Volumen Flüssigmedium mit 25% Glycerin resuspendiert. Die Aliquots werden bei -80°C gelagert.

2.2.4 Kreuzung von *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen (Mating)

Die Zellen zweier Hefestämme mit passendem *mating type* (MAT α , MAT α) können zu einem diploiden Hefestamm, mit den Eigenschaften beider Stämme, verschmelzen.

Von jedem der beiden vortransformierten Hefestämme wird eine 2-3 mm große Kolonie (< 2 Monate alt) gepickt und in 500 μ l YPD-Medium (mit 15 μ g/ml Kanamycin) in einem 1,5 ml Eppendorfcup resuspendiert. Die Zellen werden ca. 20 h bei 30°C und 200 rpm kultiviert, auf SD-Mediumplatten ausplattiert und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.5 Transformation von Plasmid-DNA in *Saccharomyces cerevisiae*

Heringssperma-DNA	10 mg/ml	Stratagene
DMSO	100 %	Sigma

PEG-Stammlösung:

PEG 3350	50 %	Sigma
----------	------	-------

bei 121°C 20 min autoklavieren.

TE-Puffer (10x), pH 7,5:

Tris/HCl	0,1 M	Sigma
EDTA, Dinatriumsalz	10 mM	Sigma

bei 121°C 20 min autoklavieren.

LiAc (10x), pH 7,5:

Lithiumacetat	1 M	Sigma
---------------	-----	-------

pH-Wert einstellen und bei 121°C 20 min autoklavieren.

PEG / LiAc-Lösung: immer frisch aus den Stammlösungen ansetzen

	<u>Endkonz.:</u>	<u>für 10 ml Lösung:</u>
PEG 3.350	40 %	8 ml 50 % PEG
TE-Puffer (10x)	1 x	1 ml 10 x TE
LiAc	1 x	1 ml 10 x LiAc

2.2.5.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

	Transformation Scale		
	<u>Small</u>	<u>Large</u>	<u>Library</u>
• YPD-Medium am Tag vor der Transformation mit 2-3 Hefekolonien (2-3 mm Durchmesser) in Erlenmeyer-Kolben mit Schikanen animpfen	50 ml	50 ml	150 ml
• 16-18 h bei 30°C und 200 rpm bis zur stationären Phase ($OD_{600} > 1,5$) kultivieren			
• Teil der Übernachtskultur in frisches Medium überführen → $OD_{600} = 0,2-0,3$	300 ml	300 ml	1 Liter
• weitere 2-4 h bei 30°C und 220 rpm kultivieren, bis zu $OD_{600} = 0,4-0,8$			
• Zellen 5 min bei 1.000 x g und RT pelletieren			
• Zellpellet in H ₂ O resuspendieren (vortexen)	25-50 ml	25-50 ml	500 ml
• Zellen 5 min bei 1.000 x g und RT zentrifugieren			
• Zellpellet in frisch hergestelltem, sterilem 1 x TE/LiAc resuspendieren	1,5 ml	1,5 ml	8 ml

Kompetente Hefezellen können einige Stunden bei RT gelagert werden. Bei *Library-Screens* sollten sie aber sofort verwendet werden, um möglichst gute Ergebnisse zu erzielen.

2.2.5.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Hefezellen

	<i>Transformation Scale</i>		
	<i>Small</i>	<i>Large</i>	<i>Library</i>
• sterile PEG/LiAc-Lösung herstellen	10 ml	10 ml	100 ml
• in jedem Cup vorlegen, gut mischen:			
BD-Vektor mit <i>bait</i> :	0,1 µg	20-100 µg	0,2-1,0 mg
AD-Vektor mit <i>Library</i> :	0,1 µg	10-50 µg	0,1-0,5 mg
Carrier DNA ⁶ (10 mg/ml):	0,1 mg	2 mg	20 mg
• zu jedem Ansatz die kompetenten Hefezellen zugeben und gut mischen (nicht vortexen)	0,1 ml	1 ml	8 ml
• PEG/LiAc-Lösung zugeben, vortexen	0,6 ml	6 ml	60 ml
• 30 min bei 30°C und 220 rpm inkubieren			
• DMSO zugeben, vorsichtig mischen	70 µl	700 µl	7 ml
• Hitzeschock: bei 42°C für 15 min inkubieren; <i>Large</i> und <i>Library Scale</i> gelegentlich mischen			
• Zellen auf Eis abkühlen			
• Zellen bei 1.000 x g und RT pelletieren	5 s	5 min	5 min
• Überstand abnehmen			
• Zellen in 1 x TE-Puffer resuspendieren	0,5 ml	1,0 ml ⁷ oder 10,0 ml	10 ml
• jeweils 100 µl / 200 µl auf einer Agarplatte (SD; Ø 100 mm / 150 mm) ausplattieren			

⁶ Heringssperma Carrier-DNA vorher ca. 10 min bei 95 °C kochen, dann sofort auf Eis abkühlen

⁷ 1,0 ml bei simultaner Kotransformation, 10 ml bei sequentieller Transformation

2.2.6 Nachweis von α -Galaktosidase

Dieser Test wird eingesetzt, um Protein-Protein-Interaktionen in *S. cerevisiae* nachzuweisen. Der qualitative Nachweis erfolgt mittels Bildung eines blauen Spaltprodukts (5-Brom-4-chlor-3-indol) beim enzymatischen Abbau von X- α -Gal durch sekretierte α -Galaktosidase.

X- α -Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-galactopyranosid)	Clontech
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma

X- α -Gal-Stammlösung:

2 mg/ml X- α -Gal in DMF

aliquotieren und bei – 20 °C im Dunkeln lagern.

Frisch transformierte oder frisch gekreuzte (*mating*) Hefezellen werden auf SD-Mediumplatten ausplattiert und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

Pro zu testender Hefepatte werden einige Kolonien (2-3 mm \varnothing) mit jeweils 20-50 μ l X- α -Gal-Stammlösung beträufelt und anschließend bei 30°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen werden die Platten auf eine Farbreaktion hin überprüft und der Zeitpunkt notiert.

2.2.7 Nachweis von β -Galaktosidase

(Colony Lift Assay; Breeden & Nasmyth, 1985)

Auch dieser Test wird eingesetzt, um Protein-Protein-Interaktionen in *S. cerevisiae* nachzuweisen. Der qualitative Nachweis erfolgt hier durch zelluläre β -Galaktosidase, die im Gegensatz zu α -Galaktosidase nicht sekretiert wird. Die Hefezellen müssen daher zunächst lysiert werden.

X- β -Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid)	PeqLab
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma

Z-Puffer, pH 7,0:

Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	16,1 g/l	Sigma
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5,5 g/l	Sigma
KCl	750 mg/l	Roth
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	246 mg/l	Merck

pH-Wert einstellen und steril filtrieren; frisch ansetzen.

X-β-Gal-Stammlösung:

50 mg/ml X-β-Gal in DMF

aliquotieren und bei -20 °C im Dunkeln lagern.

Z-Puffer / X-β-Gal -Lösung:

100 ml Z-Puffer

270 µl β-Mercaptoethanol Sigma

2 ml X-β-Gal-Stammlösung (Endkonzentration: ~ 2,5 µM)

frisch ansetzen.

Frisch transformierte oder frisch gekreuzte (*mating*) Hefezellen werden auf SD-Mediumplatten ausplattiert und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

Pro zu testender Hefepatte wird ein steriler Whatman #5 Rundfilter in eine frische 100 mm- oder 150 mm-Petrischale gelegt und mit 2-5 ml Z-Puffer/X-β-Gal-Lösung getränkt. Mit sterilen Whatman #5 Rundfiltern wird von jeder Hefepatte ein Abdruck gemacht und die Filter zum Aufschließen der anhaftenden Hefekolonien zweimal in flüssigen Stickstoff getaucht, bis sie komplett durchgefroren sind. Die Filter sollten dazwischen völlig auftauen. Anschließend werden sie mit der Zellseite nach oben auf die zuvor getränkten Filter in die Petrischalen gelegt und bei 30°C inkubiert. In regelmäßigen Abständen werden die Filter auf eine Farbreaktion hin überprüft und der Zeitpunkt notiert.

2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

„Yeast DNA Isolation System“

Stratagene

Eine Hefe-Kolonie (\varnothing 2-3 mm) wird in 20 μ l Lysepuffer in einem 1,5 ml Eppendorfcup resuspendiert, 30 s in flüssigen Stickstoff getaucht und bei 37°C aufgetaut. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95°C wird die Membranfraktion 30 s bei 14.000 x g in einer Tischzentrifuge (Heraeus) pelletiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfcup überführt. 2 μ l des Plasmid-haltigen Überstands werden wie unter 2.1.1.6 beschrieben in superkompetente *E. coli* transformiert. Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge Plasmid-DNA wird vorgegangen wie unter 2.1.7.5.1 Präparation und Reinigung von DNA beschrieben.

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 Expression von Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Expression von Proteinen in *Saccharomyces cerevisiae* sollten möglichst hoch exprimierende, induzierbare Vektoren, z.B. pYES 2, verwendet werden. Sollen Proteine exprimiert werden, die toxisch auf Hefe wirken, muss allerdings auf schwächer exprimierende Vektoren zurückgegriffen werden.

Nach Transformation des gewünschten Vektorkonstrukts werden die Hefen zunächst auf nicht induzierenden SD-Agarplatten ausplattiert. Die Hefezellen einer 50-100 ml-Übernachtskultur (SD-Induktionsmedium, z.B. SD Base Gal/Raf; pYES 2) werden nach 2.3.2 aufgeschlossen und die Proteinexpression mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.3.6) überprüft. Anschließend werden die Hefen über Nacht im Großansatz (2-3 l) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,2 (je nach Hefestamm) kultiviert, nach 2.3.3 aufgeschlossen und das Protein anschließend z.B. über Nickelsäulen (2.3.4, Protein mit *HisTag*) angereinigt.

2.3.2 Aufschluß von *Saccharomyces cerevisiae* mittels alkalischer Lyse

Der Aufschluß erfolgt nach einer Vorschrift von Silve et al. (1991) durch alkalische Lyse mit anschließender Proteinfällung.

TCA	50 %	Sigma
Tris/HCl, pH 6,8	1 M	Merck

Lyselösung:

NaOH	1,85 M	Merck
β -Mercaptoethanol	7 %	Sigma

β -Mercaptoethanol immer frisch zusetzen.

Die Hefezellen bis zur frühen log-Phase ($\approx 1 \times 10^7$ Zellen/ml) in Flüssigkultur wachsen lassen und bei $OD_{600} = 1,0$ (in YPD) bzw. 0,8 (in SD Base) 3 ml der Zellsuspension 5 min bei $14.000 \times g$ zentrifugieren. Das Zellpellet mit 1 ml H_2O_{bidest} waschen, in 100 μ l frisch hergestellter Lyse-lösung resuspendieren und 10 min auf Eis inkubieren. Anschließend werden die Proteine durch Zusatz von 50% TCA und 5-minütiger Inkubation auf Eis gefällt und bei $> 12.000 \times g$ in 10 min pelletiert. Das Pellet wird durch Zugabe von 500 μ l Tris-Puffer (1 M) neutralisiert (Pellet **nicht** resuspendieren). Das Pellet in 50-100 μ l H_2O_{bidest} aufnehmen, evtl. beschallen, die Proteinkonzentration nach Bradford (2.3.5) bestimmen und mittels SDS-PAGE (2.3.6) und Western Blot (2.3.7) analysieren.

2.3.3 Aufschluß von *Saccharomyces cerevisiae* mittels Zymolase-Verdau

PBS, pH 7,5:

$Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$	7 mM	Sigma
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	3 mM	Sigma
NaCl	150 mM	Roth

Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5:

K ₂ HPO ₄	1 M	Sigma
KH ₂ PO ₄	1 M	Sigma

Sorbitol-Lösung:

Sorbitol	2 M	Sigma
----------	-----	-------

Zymolase-Lösung:

20 mg/ml Zymolase 20T (ICN #320921) in Wasser; frisch ansetzen

Puffer A (10 x):

KH ₂ PO ₄	350 mM	Sigma
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	65 mM	Merck

pH-Wert mit K₂HPO₄ auf 6,5 einstellen

Lösung B [pro ml]: 1,2 M Sorbitol in Puffer A

600 µl	Sorbitol (2 M)
100 µl	Puffer A (10x)
300 µl	dest. Wasser

Lösung C [pro ml]:

100 µl	Zymolase-Lösung
100 µl	Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5 (1 M)
600 µl	Sorbitol (2 M)
200 µl	dest. Wasser

PBS mit Inhibitoren, pH 7,5 [pro 10 ml]:

		Stammlösung:	Endkonz.:	
Pepstatin A	3 ml	1 mg/ml (in DMSO)	0,1 mg/ml	Sigma
Leupeptin	30 µl	1 mg/ml	1 µg/ml	Sigma
Benzamidin	3 ml	1,5 M	150 mM	Sigma
Aprotinin	30 µl	2,5 mg/ml	2,5 µg/ml	Sigma
PMSF	30 µl	100 mM	0,1 mM	Sigma
EDTA	300µl	0,1 M	1 mM	Sigma

Die aufzuschließenden Hefezellen werden bei 5.000 x g 5 min abzentrifugiert und das Pellet in demselben Volumen Lösung B resuspendiert. Die Zellen werden erneut pelletiert, in demselben Volumen Lösung C resuspendiert und 1h bei 37°C inkubiert (Verdau der Zellwand → Spheroplasten). Die empfindlichen Spheroplasten werden bei 3.500 x g und 4°C 5 min abzentrifugiert und anschließend in PBS mit Inhibitoren (1/2 des Zellvolumens) resuspendiert. Durch Beschallen (3-5 x, jeweils 20-30s) mit einem Ultraschallstab werden die Spheroplasten unter **Eiskühlung** aufgeschlossen. Die Membranfraktion wird bei 20.000 x g, 4°C in 20-30 min pelletiert.

2.3.4 Reinigung von Proteinen über Nickel-Säulen

Ni-NTA Superflow	Qiagen
TALON 2 ml Disposable Gravity Column	Clontech

Waschpuffer, pH 8,0:

100 mM	NaCl	Roth
20 mM	Tris/HCl, pH 8,0	Merck
20 mM	Imidazol	Sigma

Elutionspuffer I, pH 8,0:

100 mM	NaCl	Roth
20 mM	Tris/HCl, pH 8,0	Merck
50 mM	Imidazol	Sigma

Elutionspuffer II, pH 8,0:

100 mM	NaCl	Roth
20 mM	Tris/HCl, pH 8,0	Merck
100 mM	Imidazol	Sigma

Elutionspuffer III, pH 8,0:

100 mM	NaCl	Roth
20 mM	Tris/HCl, pH 8,0	Merck
500 mM	Imidazol	Sigma

Elutionspuffer IV, pH 8,0:

1 M	Imidazol	Sigma
-----	----------	-------

Regenerierungspuffer, pH 5,0:

0,5 M	MES	Sigma
-------	-----	-------

Die Säule mit 5-10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ durchspülen, das Säulenmaterial vorsichtig aufschütteln, etwa 1 ml in die Säule füllen und absetzen lassen. Die befüllte Säule zweimal mit 1 ml Waschpuffer spülen, die Probe auftragen und 5 min inkubieren. Anschließend zweimal mit jeweils 1 ml Waschpuffer waschen und die Probe mit jeweils 1 ml Elutionspuffer I, II und III schrittweise von der Säule eluieren. Den Durchlauf, sämtliche Waschfraktionen und Eluate getrennt sammeln. Mit 1-2 ml Elutionspuffer IV kann vor Regenerierung der Säule der letzte Rest Protein heruntergespült werden. Dann wird sie mit 3 x 1 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 5 ml MES (20 mM) regeneriert. Die Säule kann nach Zugabe von 1-2 ml Waschpuffer bei 4°C gelagert werden.

2.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Dieser Test wurde 1976 von Bradford entwickelt und eignet sich für Proteinbestimmungen in Lösungen, die Pufferchemikalien und reduzierende Stoffe enthalten. Für Proben, die Detergenzien wie Triton X-100 o.ä. enthalten ist dieser Test jedoch ungeeignet.

Spektrophotometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
BSA-Eichstandard	Boehringer

Bradford-Reagens (5x):

0,1 g	Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva
50 ml	Ethanol, 50 % (v/v)	Merck
100 ml	Phosphorsäure, 85 %	Merck

mit destilliertem Wasser auf 250 ml auffüllen.

Diese Lösung muß vor Gebrauch 1:5 verdünnt und durch einen Faltenfilter filtriert werden und sollte außerdem mindestens 4 Wochen stehen.

Zu 1,0 ml Bradfordreagenz in einer Küvette werden 50 µl Probenlösung pipettiert. Das Ganze wird gut gemischt und nach 10 min wird die Absorption der Probenlösung bei 595 nm bestimmt. Die Probenlösung sollte 5 bis 50 µg Protein enthalten. Als Leerwert werden 50 µl des zur Probenverdünnung verwendeten proteinfreien Puffers anstelle der Probenlösung pipettiert. Ein Serumalbumin-Standard sollte im Bereich von 1 µg bis 70 µg aufgenommen werden.

2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Thermomixer	Eppendorf
Mini Protean II™	Biorad
Spacer und Teflonkämme	Biorad
Mikroliterspritze, 100 µl	Hamilton
Electrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech
Image Master® VPS	Pharmacia Biotech

Lösungen für Tris/Glycin-SDS-PAGE:

Gelpuffer A:

1,5 M Tris/HCl	Boehringer
pH-Wert auf 8,8 einstellen	

Gelpuffer B:

1,0 M Tris/HCl	Boehringer
pH-Wert auf 6,8 einstellen	

Ultra Pure Protogel

30 % (w/v) Acrylamid	Biozym
0,8 % (w/v) Bisacrylamid	

TEMED	Sigma
-------	-------

10 % (w/v) SDS	Serva
----------------	-------

10 % (w/v) Ammoniumperoxosulfat (APS) (immer frisch ansetzen, da nicht lange haltbar !)	Merck
--	-------

Probenpuffer, reduzierend (5x):

250 mM	Tris/HCl	Boehringer
10 % (w/v)	SDS	Serva
10 % (w/v)	DTT	Merck
25 % (v/v)	Glycerin	Merck
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau	Boehringer
pH-Wert auf 6,8 einstellen		

Markergemisch:

<i>Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range</i>	BioRad
Phosphorylase B (106 kDa), BSA (81 kDa), Ovalbumin (47,5 kDa), Carboanhydrase (35,3 kDa), Sojabohnentrypsininhibitor (28,2 kDa), Lysozym (20,8 kDa)	

Elektrodenlaufpuffer (10x):

25 mM	Tris	Boehringer
2 M	Glycin	Serva
1 % (w/v)	SDS	Serva
pH-Wert muß nicht eingestellt werden		

Es werden SDS-Gele folgender Zusammensetzung verwendet:

	Sammelgel	Trenngel
	5 %	12 %
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	--	5,0 ml
1,0 M Tris/HCl, pH 6,8	0,75 ml	--
Aqua dest.	4,1 ml	6,6 ml
30% (w/v) Acrylamid-Mix	1,0 ml	8,0 ml
TEMED	0,006 ml	0,008 ml
10% (v/v) SDS	0,06 ml	0,2 ml
10% (v/v) APS	0,06 ml	0,2 ml

Tab. 2.6: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgele

Zunächst wird das Trenngel gegossen, auf dessen Oberkante noch vor der Polymerisation etwas Isopropanol gegeben wird; die Kante wird dadurch schön glatt. Ist das Trenngel polymerisiert, wird das Isopropanol abgegossen, ein Teflonkamm zwischen die Glasplatten geschoben und

das Sammelgel gegossen. Das Sammelgel sollte etwa 0,5-0,75 cm lang sein. Fertige Gele können, eingeschlagen in feuchtes Papier und verpackt in Frischhaltefolie, mehrere Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Für die Elektrophorese werden die Gele vertikal in die Gelkammer eingespannt und Elektrodenlaufpuffer in Pufferkammer und Probenaschen gefüllt. Die Proben werden mit Probenpuffer versetzt, 5-10 min gekocht und mit einer Hamiltonspritze in die Taschen pipettiert. Um Aussagen über die Größe der einzelnen Proteinbanden machen zu können wird ein Standard (BioRad) aufgetragen.

Die Elektrophorese wird bei 25-30 mA pro Gel (100-150 V; Spannungsquelle: *Electrophoresis Power Supply EPS 300*; Pharmacia Biotech) durchgeführt. Nach 30-45 min ist die Elektrophorese beendet und die Gele können geblottet werden.

2.3.7 Western Blot

Hofer SemiPor (Blotapparatur)	Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech
Trans-Blot Transfer Medium, <i>Pure Nitrocellulose</i> , 0,45 µm	BioRad
Whatman 3 MM-Filterpapier	Whatman

Transferpuffer:

20 mM	Tris	Boehringer
150 mM	Glycin	Serva
20 % (v/v)	Methanol	Merck
0,01% (w/v)	SDS	Serva
	pH-Wert auf 8,3 einstellen	

6 x Whatman 3 MM-Filterpapier und 1 x Nitrocellulose-Membran auf Gelgröße zuschneiden und alles in Transferpuffer einweichen. 3 Blatt Filterpapier in die Blotapparatur legen und die Membran blasenfrei darauflegen. Nach Abtrennen der Taschen, das Proteingel auf die Membran und darauf 3 Blatt Filterpapier legen. Die Apparatur schließen und 1 h bei 100 mA blotten.

2.3.7.1 Ponceau S-Färbung

Image Master[®] VPS Pharmacia Biotech

Ponceau S-Lösung:

0,5 % (w/v)	Ponceau S	Roth
1,0 % (v/v)	Essigsäure	Sigma

Nach dem Blotten wird die Membran in Ponceau S-Lösung gefärbt und gegebenenfalls dokumentiert. Danach wird die Farbe mit H₂O_{bidest} sorgfältig wieder abgewaschen.

2.3.7.2 Immundetektion

Primärantikörper, monoklonal:

GAL 4 AD *Monoclonal Antibody* Clontech

Mouse IgG2b, κ

Verdünnung im Western Blot: 1:1000

GAL 4 DNA-BD *Monoclonal Antibody* Clontech

Mouse IgG1, κ

Verdünnung im Western Blot: 1:1000

p27^{Kip1} (*Mitotic Inhibitor/Suppressor Protein*) Ab-1 NeoMarkers
monoclonal Mouse IgG₁ (Clone DCS-72.F6)

Verdünnung im Western Blot: 1:400

cdk 2 (*Cyclin-Dependent Kinase*) Ab-4 NeoMarkers
monoclonal Mouse IgG_{2b} (Clone 2B6) + IgG_{2a} (Clone 8D4)

Verdünnung im Western Blot: 1:400

Cyclin A (*S- and G 2-phase Cyclin*) Ab-1 NeoMarkers
Monoclonal Mouse IgG_{2a} (Clone E23)

Verdünnung im Western Blot: 1:500

Primärantikörper, polyklonal:

Jab 1 (*Jun-activation domain-binding protein 1*) N-17 Santa Cruz
Polyclonal Goat IgG
 Verdünnung im Western Blot: 1:500

Sekundärantikörper:

Horseradish Peroxidase Conjugate BioRad
Goat Anti Mouse IgG (H+L)
 Verdünnung im Western Blot: 1:1000

Peroxidase Conjugate Dianova
Pure Rabbit Anti Goat IgG (H+L)
 Verdünnung im Western Blot: 1:5000
 (Jackson Immuno Research Laboratory Inc.)

TBS:

10 mM Tris/HCl Boehringer
 150 mM NaCl Merck
 pH-Wert auf 7,3 einstellen

TBST-Puffer:

0,05% (w/v) Tween 20 Serva
 in TBS, pH-Wert auf 7,3 einstellen

Milchpulver HL-Markt

Die Membran wird dreimal je 5 min mit TBST-Puffer gewaschen. Um unspezifische Wechselwirkungen der Antikörper mit der Membran zu verhindern wird sie 30-60 min in Blockierungspuffer (3% Milchpulver in TBS) geschwenkt. Daraufhin erfolgt die Inkubation mit Primärantikörper für mindestens 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur. Die Antikörperkonzentration richtet sich nach den Angaben des Herstellers. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5-10 min in TBST, erfolgt die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper. Die Antikörper werden i.a. in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung in Blockierungspuffer eingesetzt. Die Inkubation erfolgt wiederum für mindestens 1 h unter schütteln bei Raumtemperatur. Daraufhin wird die Membran dreimal für

jeweils 5 min in TBST, dann zweimal in TBS gewaschen und eine ECL-Entwicklung (Amersham, 1991) angeschlossen (2.3.7.3).

2.3.7.3 ECL-(enhanced chemiluminescence)-Entwicklung (Amersham, 1991)

ECL-Detektionskit	Amersham
Hyperfilm ECL	Amersham
Filmentwickler X-Ray Film Processor RG II	Fuji
Image Master [®] VPS	Pharmacia Biotech

Dieses Detektionssystem beruht auf einer Anregung von Luminol mittels einer Oxidationsreaktion, die von der an den Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase katalysiert wird. Das beim Übergang in den Grundzustand emittierte Licht (Chemilumineszenz) reicht aus, um einen aufgelegten sensitiven Film zu schwärzen. Die Membran wird dafür für 1 min in ECL-Reagenz (1 Vol. Lösung 2 + 1 Vol. Lösung 1) überführt. Anschließend wird die Membran mit destilliertem Wasser abgespritzt oder abgetupft und in Frischhaltefolie verpackt. In einer Dunkelkammer werden ECL-Filmstreifen auf die Membran aufgelegt und die Filme in einer Entwicklermaschine entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse im Yeast Two Hybrid System

3.1.1 Yeast Two Hybrid Screen

Mittels der *Yeast Two Hybrid* Methode sollte eine käuflich erworbene *Random Peptide Library* (Clontech), die für $\geq 1 \times 10^7$ verschiedene 16er Peptide codiert, auf Interaktionspartner für p27 bzw. p27-Fragmente hin untersucht werden.

3.1.1.1 Herstellung der benötigten Konstrukte

Die gewünschten DNA-Fragmente, p27 und p27 (AS 80-197) wurden zunächst, wie unter 2.1.5.1 beschrieben, durch Standard PCR amplifiziert und anschließend über EcoRI/BamHI in den schwach exprimierenden Hefvektor pGBT 9 (*TRP1*, Amp^r) und den hoch exprimierenden pGBK T7 (*TRP1*, Kan^r) subkloniert (2.1.8.1). Die hergestellten Konstrukte pGBT 9-p27 und pGBK T7-p27 bzw. -p27 (AS 80-197) wurden vor ihrer experimentellen Verwendung sequenziert (4 BaseLab, NMI, Reutlingen; Medi Genomix, Martinsried, München), um sicherzustellen, dass kein *Frameshift* und keine Punktmutationen vorliegen.

3.1.1.2 Heterologe Proteinexpression

Um die Expression der Fusionsproteine, GAL 4 DNA-BD-p27 bzw. -p27 (AS 80-197), in Hefe zu überprüfen, wurden die hoch exprimierenden DNA-Konstrukte zunächst nach 2.2.5 (*Small Scale*) in HF7c transformiert. Mit den nach 2-3 Tagen gewachsenen Kolonien wurden 50-100 ml Flüssigmedium (SD/-Trp) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 kultiviert. Die Hefezellen wurden mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und der Proteingehalt des Lysats nach Bradford bestimmt (2.3.2; 2.3.5). Auf einem 12%-igen Acrylamidgel wurden die Lysate (10 µg Protein/Lane) aufgetrennt (2.3.6) und mittels Western Blot die Proteinex-

pression überprüft (2.3.7). Als Primärantikörper wurde dafür der monoklonale GAL 4 DNA-BD Antikörper von Clontech verwendet.

Als Kontrolle wurden außerdem noch zwei weitere Konstrukte in HF7c exprimiert und aufgeschossen. Zum einen der leere Vektor (pGBK T7), der für die GAL 4 DNA-BD (kurz: BD) codiert und das von Clontech als Kontrolle mitgelieferte Vektorkonstrukt pGBK T7-Lam, welches für das Fusionsprotein BD-*human* Lamin C codiert.

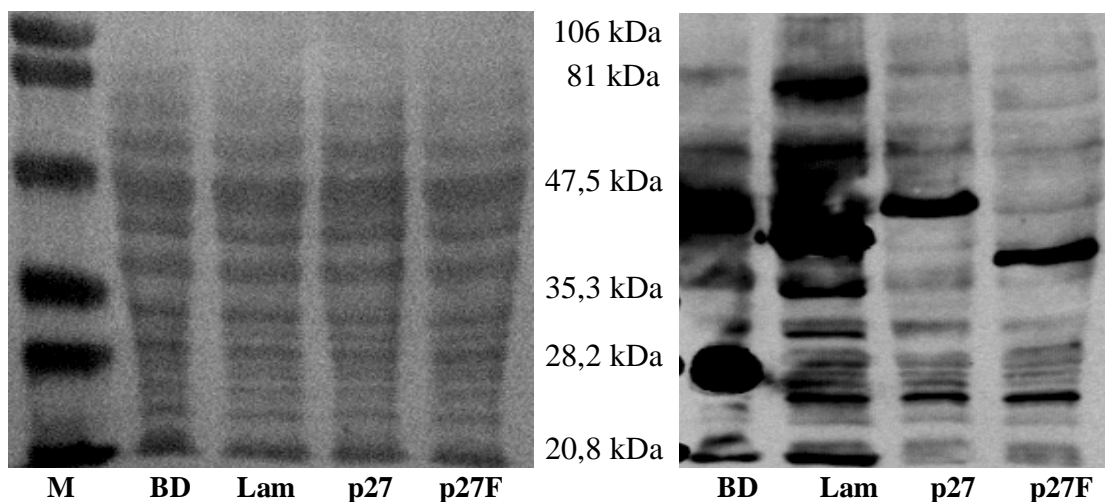


Abb. 3.1: Proteinexpression in HF7c. Blotmembran: Ponceau S-Färbung (links), Immundetektion mit GAL 4 DNA-BD Primärantikörper und Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (*Goat Anti Mouse*, rechts). M: Marker, BD: GAL 4 DNA-BD, Lam: BD-Lamin C, p27: BD-p27, p27F: BD-p27 (AS 80-197)

Auf der gefärbten Blotmembran (Abb. 3.1, links) ist deutlich zu erkennen, dass in jeder Spur etwa dieselbe Menge Protein aufgetragen wurde. Die Stärke der Protein-Banden sollte daher mit der Expressionsstärke korrelieren. Das BD-Monomer (147 AS) sollte eigentlich bei 16 kDa laufen (auf dem Gel nicht mehr sichtbar). Das Dimer (Fields and Sternglanz, 1994) zeigt eine Bande bei etwa 30 kDa. Die dicke Bande bei etwa 45 kDa kann eventuell auf herübergelaufenes BD-Lamin C zurückgeführt werden, zumal eine vergleichbare Bande bei Abb. 3.2 fehlt. BD-*human* Lamin C (312 AS), dessen Bande bei ca. 34 kDa liegen sollte, läuft etwas zu hoch (ca. 40 kDa) und zeigt ebenfalls gute Expression. Das Fusionsprotein aus BD und p27 (197 AS) zeigt wie erwartet eine Bande etwas unterhalb des 47,5 kDa Markers. Das p27-Fragment läuft etwa 10 kDa darunter. Beide Konstrukte werden in diesem Hefestamm deutlich schwächer exprimiert als die BD oder BD-Lamin C.

Da reine Hefestämme ohne Selektionsdruck kultiviert werden, wurde in regelmäßigen Abständen deren Phänotyp überprüft, um sicherzustellen, dass der Stamm nicht durch andere Laborstämme oder Wildtyp-Hefen (wachsen auch auf Minimalmedium) verunreinigt ist. Dazu wurden die Hefen auf diversen Selektionplatten ausplattiert und 3-5 Tage bei 30°C kultiviert. Der für die *Screens* verwendete Hefestamm, HF7c, sollte auf YPD und SD/-Ura wachsen, auf SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-His und YPD mit Cycloheximid (cyh, 1 µg/ml) nicht. Auf SD/-His und YPD + cyh wurde aber dennoch häufig ein Wachstum beobachtet. Das liegt bei SD/-His daran, dass die Expression des *HIS3*-Gens nicht vollkommen abgeschaltet werden kann. Die eventuell auftretende Cycloheximid-Resistenz beruht auf spontan auftretender Mutation des *Cyh^S*-Gens

Häufig kann auch schon anhand der Färbung der Hefen eine Verunreinigung erkannt werden. Frische HF7c-Kolonien (3-5 Tage) zeigen eine Rotfärbung, die mit zunehmendem Alter immer dunkler wird.

3.1.1.3 Untersuchung auf autonome Reporterogenaktivität und Interaktion mit GAL 4 AD

Bevor ein *Screen* mit einem Konstrukt (*Bait*) durchgeführt wird, muss weiterhin überprüft werden, ob das Protein selbst eine Transkriptionsaktivierung und dadurch eine Expression der Reporterogene hervorruft oder ob eine Bindung an die AD vorliegt.

Dafür wurden die DNA-Konstrukte separat in den Hefestamm transformiert oder mit einem AD-Vektor (pGAD T7: *LEU2*, Amp^r) cotransformiert (2.2.5, *Small Scale*). Nach 3-5 Tagen wurden die Kolonien (2-3 mm Ø) auf β-Galaktosidase-Aktivität (Reportergen: *lacZ*) hin überprüft (2.2.7). Dabei wurden immer zwei Kontrollen mitgetestet. Die Positivkontrolle, p53 (pGBK T7-p53) coexprimiert mit *SV40 large T antigen* (pGAD T7-T), weist im allgemeinen bei frisch angesetzten Lösungen schon nach 2-4 h eine deutliche Blaufärbung auf. Als Negativkontrolle wurden die beiden Vektoren, pGAD T7 und pGBK T7, coexprimiert. Weiterhin kann auch das Wachstum auf His-Mangelmedium Aufschluss über vorliegende Reporterogenaktivität (*HIS3*) geben.

Beide Konstrukte, BD-p27 und BD-p27 (AS 80-197), zeigen keine autonome Reporterogenaktivität, wenn sie separat in HF7c exprimiert werden. Auch bei Coexpression mit dem AD-Vektor bleibt eine positive Reaktion aus. Das eventuell auftretende schwache Wachstum auf His-Mangelmedium ist auf die unzureichende Kontrolle der *HIS3*-Genaktivität zurückzuführen.

3.1.1.4 Ergebnisse der Y2H-Screens

Nach Abschluss aller benötigten Tests, einschließlich der Überprüfung des HF7c-Phänotyps, wurde mit den Vorbereitungen für den eigentlichen *Screen* begonnen.

Die *Random Peptide Library* von Clontech wird als *E. coli* DH10B-*Stock* geliefert und muss zur Gewinnung einer ausreichenden Menge *Library*-DNA zunächst wie unter 2.1.4.3 beschrieben amplifiziert werden. Dabei sollte die Konzentration 1.000 cfu / ml LB/Amp-Agarosegel nicht überschreiten, um zu gewährleisten, dass alle 10^7 Klone gleichermaßen wachsen können. Die Plasmidpräparation erfolgte unter Verwendung des Qiagen Plasmid Giga Kits (2.1.7.5.2).

Acht 3 l-Ansätze (*Solid State Amplification*) lieferten $2,6 \times 10^7$ Klone und 18 mg pGAD GH-*Library* (*LEU2*, Amp^r). Die *Bait*-Plasmide wurden ebenfalls im Giga-Maßstab aufgereinigt. Insgesamt wurden aus jeweils zwei 3 l-Ansätzen ca. 18 mg pGBK T7-p27 und 15 mg pGBK T7-p27 (AS 80-197) gewonnen. Vier 4 l-Ansätze lieferten 16 mg pGBT 9-p27.

Für einen *Screen* wurden die Hefen nach 2.2.5 (*Library Scale*) mit *Bait*- und *Library*-DNA cotransformiert. Ein Aliquot wurde jeweils auf einer SD/-Trp, SD/-Leu und SD/-Trp/-Leu Agarplatte (Ø 150 mm) ausplattiert, um die Transformationseffizienz der einzelnen Plasmide sowie die Effizienz der Cotransformation und damit die Anzahl der getesteten Klone zu bestimmen. Die restlichen Hefen wurden auf SD/-Trp/-Leu/-His-Agar (Ø 150 mm) ausplattiert und 3-7 Tage bei 30°C kultiviert.

Täglich wurden die Platten kontrolliert, gewachsene Kolonien nummeriert und mit dem Datum versehen. Diese Kolonien wurden auf frischen

Platten ausplattiert und auf Reportergenaktivität hin untersucht (2.2.7). Die positiven Klone wurden isoliert, nach 2.2.8 aufgeschlossen und die Plasmid-DNA in superkompetente *E.coli* transformiert. Durch Ausplattieren auf LB/Amp-Agarplatten wurde in *E.coli* auf Amp^r-tragende *Library*-Plasmid selektioniert. Bei pGBT 9 (Amp^r) als *Bait*-Vektor gestaltete sich die Isolierung deutlich aufwendiger, da i.a. beide Plasmide in einem Bakterienklon enthalten waren. Die *Library*-Plasmide wurden mittels Plasmid-Minipräparation (2.1.7.5.1) isoliert, mittels BamHI/EcoRI-Testverdau überprüft und sequenziert. Da Hefen mehrere Plasmide jeder Sorte aufnehmen können, muss überprüft werden, ob auch wirklich das für die Interaktion verantwortliche *Library*-Plasmid gefunden wurde. Daher wurden sie erneut mit dem *Bait* coexprimiert und getestet. *Bait*- und *Library*-Plasmid wurden dafür zunächst separat in Y187 (MAT α) und PJ69-2A (MAT α) transformiert, die beiden Stämme fusioniert (2.2.4, *Mating*), auf SD/-Leu/-Trp-, SD/-Leu/-Trp/-His- und SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade-Agar ausplattiert und mittels β -Galaktosidase *Assay* (2.2.7) auf Reportergenaktivität hin untersucht. Die Hefestämme müssen auch hier zunächst überprüft werden. Dabei sollte Y187 nur auf SD/-Ura und YPD, nicht aber auf SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-His, SD/-Ade, SD/-Met und YPD + cyh wachsen. Bei PJ69-2A sollte kein Wachstum auf SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-His, SD/-Ade und SD/-Ura beobachtet werden. Dieser Stamm sollte nur auf YPD wachsen. Auch bei diesen beiden Stämmen wird meist ein schwaches Wachstum auf SD/-His beobachtet.

Die durchschnittliche Coransformationseffizienz der *Screening*-Ansätze lag bei $5,2 \times 10^3$ cfu/ μ g *Library*-DNA. Insgesamt wurden $1,0 \times 10^7$ unabhängige Klone im *Screen* mit pGBT 9-p27 getestet. Davon sind 498 auf Leu/Trp/His-Mangelmedium gewachsen und bei drei dieser Klone (21, 47, 70) konnte im β -Galaktosidase *Assay* Reportergenaktivität nachgewiesen werden. Von $5,3 \times 10^6$ gegen pGBK T7-p27 (AS 80-197) getesteten unabhängigen Klonen sind 190 auf Leu/Trp/His-Mangelmedium gewachsen und zehn davon (16, 30, 34, 35, 42, 63, 66, 67, 73, 102) wiesen β -Galaktosidase-Reportergenaktivität auf.

Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 kurz zusammengefaßt.

Screen Nr.	I	II	III
Hefestamm	HF7c	HF7c	HF7c
Library-DNA	1,0 mg	1,0 mg	1,0 mg
Bait-Plasmid	2,0 mg pGBT 9-p27	1,6 mg pGBT 9-p27	2,0 mg pGBK T7-p27 Frag.
Cotransformationseffizienz [cfu/ μ g Library-DNA]	$2,8 \times 10^3$	$7,4 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$
Anzahl der getesteten Klone	$2,8 \times 10^6$	$7,4 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$
isolierte Klone (nach 4 Tagen)	165	333	190
im β -Galaktosidase Assay positive Klone [Klon Nr.]	21; 47; 70	keine posi- tiven Klone	16; 30; 34; 35; 42; 63; 66; 67; 73; 102

Tab. 3.1: Übersicht über die durchgeführten Screens und die ersten β -Galaktosidase Assays. Verwendete Library: Random Peptide Library (Clontech); p27-Frag.: p27 (AS 80-197)

Nach erfolgreicher Isolierung der Library-Plasmide liefert die erneute Überprüfung der β -Galaktosidase-Aktivität, diesmal im diploiden Hefestamm (PJ69-2A/Y187, *mating*), folgende Ergebnisse:

Screen / Klon Nr.	Länge der Klone	LWH Wachstum	LWHAd Wachstum	β -Galaktosidase Assay
I / 21	16 AS	++	--	--
I / 70	16 AS	++	(+)	--
III / 16	9 AS	++	--	-
III / 30	104 AS	++	++	++
III / 34	14 AS	+	--	(+)
III / 35	5 AS	+	--	(+)
III / 42	2 AS	++	--	--
III / 66	16 AS	++	--	--
III / 73	16 AS	++	+	(+)

Tab. 3.2: Reporterogenaktivität bei Coexpression der Library-Peptide mit p27 (pGBK T7) in PJ69-2A/Y187. LWH: SD/-Leu/-Trp/-His, LWHAd: SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade; ++ positiv, + schwach positiv, (+) evtl. schwach positiv, - eher negativ, -- negativ; AS: Aminosäure(n)

Die Kontrollen mit Lamin C, einem Protein, das laut Clontech nur mit sehr wenigen Proteinen interagiert, waren bei allen Klonen annähernd negativ, abgesehen vom Wachstum auf SD/-Leu/-Trp/-His (Tab. 3.3).

Klon Nr.	LWH Wachstum	LWHAde Wachstum	β -Galaktosidase Assay
21	--	--	--
70	++	--	--
16	--	--	--
30	++	+	--
34	++	-	--
35	+	--	--
42	++	--	--
66	++	-	-
73	+	--	-

Tab. 3.3: Reporterogenaktivität bei Coexpression der *Library*-Peptide mit Lamin C in PJ69-2A/Y187. LWH, LWHAde: siehe Tab. 3.2; ++ positiv, + schwach positiv, (+) evtl. schwach positiv, - eher negativ, -- negativ

Nur bei vier der zunächst dreizehn gefundenen Klone konnte nach eingehender Überprüfung eine Reporterogenaktivierung und damit eine potentielle Interaktion mit p27 bestätigt werden. Die Stärke der auftretenden Aktivität nimmt in der Reihenfolge 30 >> 73 > 34, 35 ab. Dabei trat die Blaufärbung bei Klon 30 teilweise sehr früh (nach 3-5 h) teilweise erst über Nacht auf. Bei Klon 34 und 35 trat die Blaufärbung, wenn überhaupt, über Nacht auf und bei Klon 73 konnte nur einmal eine sehr starke Aktivierung der β -Galaktosidase (Blaufärbung nach 1,5 h) nachgewiesen werden.

Bei den Klonen 47, 63, 67 und 102 konnte schon das *Library*-Plasmid nicht isoliert werden oder die Hefen sind nach erneutem Ausplattieren des Original-Klons (HF7c) auf einer frischen LWH-Platte oder nach Transformation (PJ69-2A) der *Library*-DNA nicht mehr gewachsen.

3.1.2 Protein-Protein Interaktionen im Y2H

Hier wurden p38 und OTO 2001 sowie die natürlichen p27-Bindungspartner, CDK 2 und Cyclin A, im *Yeast Two Hybrid* System auf eine positive Reaktion bei Coexpression mit p27 getestet.

3.1.2.1 Herstellung der benötigten Konstrukte

p27, CDK 2, Cyclin A und p38 wurden wie unter 2.1.5.1 beschrieben amplifiziert, über EcoRI/BamHI in die hoch exprimierenden Vektoren pGAD T7 (*LEU2*, Amp^r) und pGBK T7 (*TRP1*, Kan^r) subkloniert (2.1.8.1) und die hergestellten Konstrukte vor ihrer experimentellen Verwendung sequenziert. Für OTO 2001, ein Peptid, das aufgrund von Strukturvorhersagen ein potentieller Bindungspartner für p27 ist, wurden, wegen geringer Größe (17 AS), komplementäre Oligonukleotide mit kohäsiven Enden (EcoRI/BamHI) bei Gibco BRL bestellt.

3.1.2.2 Heterologe Proteinexpression

Um die Expression der Fusionsproteine in Hefe zu überprüfen, wurden die pGBK T7-Konstrukte zunächst nach 2.2.5 (*Small Scale*) in Y187 transformiert. Danach wurde vorgegangen wie unter 3.1.1.2 beschrieben. Als Primärantikörper wurde dafür der monoklonale GAL 4 DNA-BD Antikörper von Clontech verwendet. pGBK T7, pGBK T7-Lam und p53 wurden als Kontrolle aufgetragen.

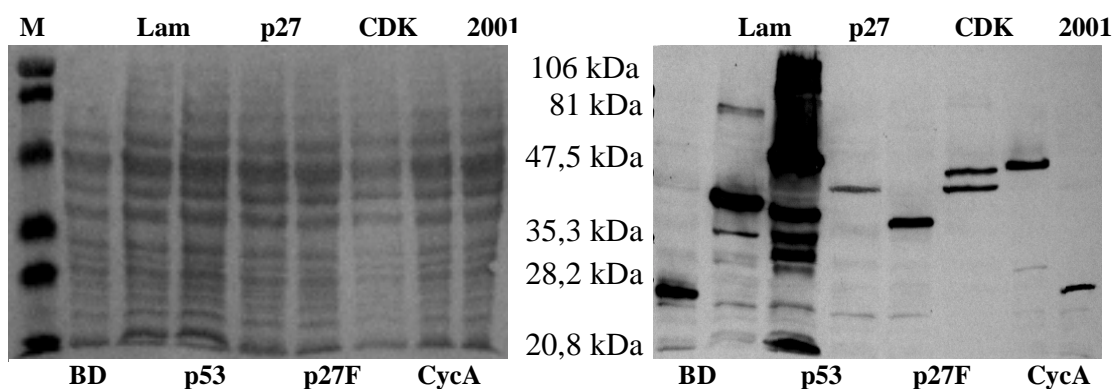


Abb. 3.2: Proteinexpression in Y187. Blotmembran: Ponceau S-Färbung (links), Immundetektion mit GAL 4 DNA-BD Primärantikörper und Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (*Goat Anti Mouse*, rechts). M: Marker, BD: GAL 4 DNA-BD, Lam: BD-Lamin C, p53: BD-p53, p27: BD-p27, p27F: BD-p27 (AS 80-197), CDK: BD-CDK 2, CycA: BD-Cyclin A, 2001: BD-OTO 2001

Die gefärbte Blotmembran (Abb. 3.2) zeigt, dass bei BD etwas und bei CDK 2 deutlich zu wenig Probe aufgetragen wurde, bei p53 dagegen geringfügig zuviel. BD, BD-p27 und BD-p27 (AS 80-197) weisen annähernd dieselben Banden auf wie bei der Expression in HF7c (Abb. 3.1). BD-p27 wird sehr schwach exprimiert. BD-p53 (mit AD-SV 40 *large T antigen* coexprimiert → Positivkontrolle) wird sehr stark exprimiert und zeigt neben der erwarteten Bande bei etwa 51 kDa einige kleinere Fragmente sowie einen höhermolekularen Schmier. BD-CDK 2 (49 kDa) weist zwei Banden zwischen 40 und 50 kDa auf. BD-Cyclin A läuft etwas über 47,5 kDa. Die errechnete ungefähre Größe beträgt allerdings 64 kDa. Die Bande von BD-OTO 2001 (1,8 kDa) liegt wie erwartet nur wenig über der BD-Bande.

Die Expression von AD-p38 konnte nur mit dem relativ unspezifischen p38-Antikörper (Jab 1) detektiert werden, da mit dem ebenfalls schon verwendeten GAL 4 AD-Antikörper (Clontech) weder die reine AD noch AD-SV 40 *large T antigen* (mit BD-p53 coexprimiert → Positivkontrolle) nachgewiesen werden konnte. Die etwas stärker gefärbte Bande bei 47,5 kDa könnte eventuell AD-p38 sein.

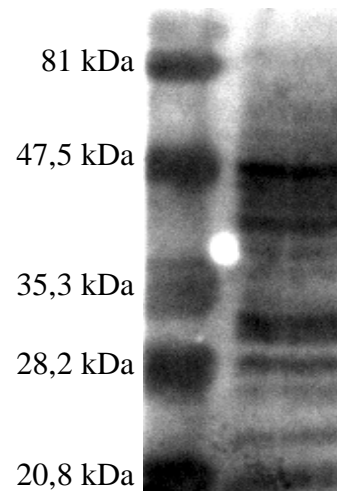


Abb. 3.3: AD-p38-Expression in AH109. Immundetektion mit Jab 1 (*Polyclonal Goat*) Primärantikörper und Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (*Rabbit Anti Goat*). Links ist der Marker, rechts AD-p38 (Zellysat) aufgetragen.

3.1.2.3 Untersuchung auf autonome Reporterogenaktivität und Interaktion mit GAL 4 AD bzw. DNA-BD

Durch Transformation der Konstrukte in AH109 bzw. PJ69-2A und Y187 und Fusion der entsprechenden Hefen mit dem jeweils leeren Plasmid (z.B.: pGBK T7-p27 mit pGAD T7) wurde überprüft, ob schon bei Coexpression mit dem zweiten GAL 4-Fragment eine Aktivierung der Reportertranskription auftritt. Sofern hierbei keine Reporterogenaktivität beobachtet wird, kann davon ausgegangen werden, dass auch keine autonome Aktivierung vorliegt.

Konstrukt (in pGBK T7)	LWH Wachstum	LWHAde Wachstum	β -Galakto- sidase	α -Galakto- sidase
leerer Vektor	++	+	--	++
Lamin C	+	--	--	nicht getestet
p27	++	--	--	++
CDK 2	--	--	--	--
Cyclin A	(+)	--	--	--
OTO 2001	(+)	--	--	--

Tab. 3.4: Reporterogenaktivität bei Coexpression der pGBK T7-Konstrukte mit pGAD T7 in PJ69-2A/Y187 (Reporter: *lacZ* [β -Gal], *HIS3*, *ADE2*) und **AH109/Y187** (Reporter: *lacZ* [α - und β -Gal], *HIS3*, *ADE2*). LWH, LWHAde: siehe Tab. 3.2; ++ positiv, + schwach positiv, (+) evtl. schwach positiv, - eher negativ, -- negativ

Konstrukt (in pGAD T7)	LWH Wachstum	LWHAde Wachstum	β -Galaktosi- dase Assay	α -Galaktosi- dase Assay
p27	+	(+)	--	--
p38	++	++	++	+
CDK 2	++	--	--	--
Cyclin A	++	+	--	--
OTO 2001	++	--	--	--

Tab. 3.5: Reporterogenaktivität bei Coexpression der pGAD T7-Konstrukte mit pGBK T7 in PJ69-2A/Y187 (Reporter: *lacZ* [β -Gal], *HIS3*, *ADE2*) und **AH109/Y187** (Reporter: *lacZ* [α - und β -Gal], *HIS3*, *ADE2*). LWH, LWHAde (Tab. 3.2); ++ positiv, + schwach positiv, (+) evtl. schwach positiv, - eher negativ, -- negativ

Sowohl bei der Expression von BD-p27 mit pGAD T7 als auch bei der Coexpression der reinen GAL 4-Fragmente liegt eine Aktivierung der α -Galaktosidase vor. AD-p38 weist bei Expression mit der BD bei sämtlichen Reporter genen Aktivität auf (Blaufärbung über Nacht). Diese Daten müssen bei der Auswertung der Interaktionstests berücksichtigt werden. Die restlichen Kontrollen sind negativ.

AH109 sollte folgenden Phänotyp aufweisen:

kein Wachstum: SD/-Trp, SD/-Leu, SD/-His, SD/-Ade, YPD + cyh

Wachstum: SD/-Met, SD/-Ura, YPD

3.1.2.4 Ergebnisse der Interaktionstests

Die Konstrukte wurden in PJ69-2A bzw. AH109 und Y187 transformiert, die entsprechenden Klone fusioniert und bezüglich Wachstum auf Selektionsplatten (Reportergene: *HIS3*, *ADE2*) sowie im α - und β -Galaktosidase Assay (Reportergen: *lacZ*; siehe auch Tab. 3.4 bzw. 3.5) getestet.

Konstrukt pGAD T7	Konstrukt pGBK T7	LWH Wachstum	LWHAd Wachstum	β -Galaktosidase	α -Galaktosidase
p38	Lamin C	++	--	+ *	--
	p27	++	--	+ *	++ *
p27	Lamin C	(+)	--	--	--
	CDK 2	--	--	--	-
	Cyclin A	+	--	(+)	-
	OTO 2001	+	--	--	-
CDK 2	Lamin C	++	--	--	--
	p27	++	--	--	++ *
	Cyclin A	++	--	--	--
	OTO 2001	++	--	--	--
Cyclin A	Lamin C	++	-	--	--
	p27	++	-	--	++ *
	CDK 2	--	--	--	--
OTO 2001	Lamin C	++	--	--	--
	p27	++	+	+	++ *
	CDK 2	++	--	+	-

Tab. 3.6: Reporterogenaktivitäten bei Coexpression in PJ69-2A/Y187 bzw. AH109/Y187. LWH, LWHAd (Tab. 3.2); ++ positiv, + schwach positiv, (+) evtl. schwach positiv, - eher negativ, -- negativ; * evtl. unspezifische Interaktion

Bei Coexpression von AD-p38 mit BD-p27 oder -Lamin C liegt eine schwache Aktivierung der β -Galaktosidase vor. Da aber AD-p38 schon bei Coexpression mit der BD positive Ergebnisse liefert, ist hier eine Auswertung nicht möglich. Wird AD-p27 mit BD-Cyclin A coexpressiert, wird die β -Galaktosidase eventuell ganz schwach aktiviert (Blau-färbung nach 3h, über Nacht oder überhaupt nicht). AD-OTO 2001 zeigt bei Coexpression mit BD-p27 oder -CDK 2 positive bzw. schwach posi-

tive Reporterogenaktivität (Blaufärbung über Nacht). AD-p27 allerdings zeigt keinen positiven Effekt bei Coexpression mit BD-OTO 2001 bzw. -CDK 2. Da BD-p27 schon mit der AD eine deutliche Aktivierung der α -Galaktosidase aufweist, wurden diese Daten bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.1.3 Identifizierung von Bindedomänen

Um den Bereich von p27 zu identifizieren, an den CDK 2, OTO 2001 und die im *Screen* gefundenen Peptide binden, wurden p27-Fragmente einen *Yeast Two Hybrid* Vektor (BD) subkloniert und mit dem potentiellen Interaktionspartner (AD) in Hefe coexprimiert.

3.1.3.1 Herstellung der benötigten Konstrukte

Die p27-Fragmente AS 1-100, 80-197 sowie 1-50, 51-100, 101-150 und 151-197 wurden amplifiziert und über EcoRI/BamHI in pGBK T7 kloniert. Auf eine Sequenzierung wurde hier allerdings verzichtet.

3.1.3.2 Untersuchung auf autonome Reporterogenaktivität und Interaktion mit GAL 4 AD bzw. DNA-BD

Durch Coexpression der Fragmente mit der GAL 4-AD wurden die Konstrukte auf eine Bindung an den Transkriptionsfaktor untersucht.

Konstrukt (in pGBK T7)	LWH Wachstum	LWHAde Wachstum	β -Galaktosidase
p27 (1-100)	++	++	++
p27 (80-197)	--	--	-
p27 (1-50)	++	--	--
p27 (51-100)	++	++	++
p27 (101-150)	++	--	--
p27 (151-197)	+	+	--

Tab. 3.7: Reporterogenaktivität bei Coexpression der BD-p27-Fragmente mit pGAD T7 in PJ69-2A/Y187. LWH, LWHAde (Tab. 3.2); ++ positiv, + schwach positiv, (+) evtl. schwach positiv, - eher negativ, -- negativ

Bei den p27-Fragmenten 1-100 und 51-100 liegt eindeutig eine Aktivierung sämtlicher Reportergene vor. Die Überprüfung auf autonome Aktivierung fiel negativ aus, was bedeutet, dass diese Fragmente an die AD binden. Sie sind für diese Interaktionstests demnach völlig ungeeignet.

3.1.3.3 Ergebnisse der Interaktionstests

Getestet wurden die Klone 30, 34, 35 und 73, die im *Screen* gegen BD-p27 (AS 80-197) als potentielle Bindungspartner identifiziert wurden, sowie p38 und OTO 2001.

AD	pGBK T7	LWH Wachstum	LWHAdE Wachstum	β -Galaktosidase
p38 (pGAD T7)	p27 80-197	--	--	--
	p27 1-50	++	--	--
	p27 101-150	++	--	++
	p27 151-197	+	--	--
OTO 2001 (pGAD T7)	p27 80-197	++	--	--
	p27 1-50	++	(+)	+
	p27 101-150	++	+	-
	p27 151-197	+	--	--
Klon 30 (pGAD GH)	p27 1-50	++	++	++
	p27 101-150	++	++	--
	p27 151-197	(+)	--	--
Klon 34 (pGAD GH)	p27 1-50	++	+	++
	p27 101-150	++	--	+
	p27 151-197	--	--	-
Klon 35 (pGAD GH)	p27 1-50	++	--	(+)
	p27 101-150	++	--	-
	p27 151-197	+	--	--
Klon 73 (pGAD GH)	p27 1-50	++	--	-
	p27 101-150	++	--	--
	p27 151-197	(+)	--	-

Tab. 3.8: Reportergenaktivität bei Coexpression der BD-p27-Fragmente mit den AD-Konstrukten in PJ69-2A/Y187. LWH, LWHAdE (Tab. 3.2); ++ positiv, + schwach positiv, (+) evtl. schwach positiv, - eher negativ, -- negativ

p38 zeigt positive β -Galaktosidase-Aktivität bei Coexpression mit p27 (101-150). OTO 2001, Klon 30 und 34 binden an p27 (1-50) und evtl. auch ganz schwach an Fragment 101-150. Klon 35 bindet evtl. im Bereich 1-50. Klon 73 bindet an keines dieser Fragmente, aber evtl. im Bereich 51-100, der nicht getestet werden konnte.

Aufgrund der teilweise im Vergleich zu p27 (1-197) stärkeren Bindung mancher Fragmente wurden auch die restlichen Klone (16, 21, 42, 66 und 70) sowie CDK 2 und Cyclin A getestet. Das Ergebnis war aber abgesehen von den evtl. schwach positiven Interaktionen von p27 (1-50) mit Klon 21 und CDK 2 negativ.

pGAD T7	pGBK T7	LWH Wachstum	LWHAd Wachstum	β -Galakto- sidase
CDK 2	p27 80-197	--	--	--
	p27 1-50	+	--	(+)
	p27 101-150	+	--	--
	p27 151-197	+	--	--
Klon 21	p27 1-50	+	--	(+)
	p27 101-150	+	--	--
	p27 151-197	(+)	--	-

Tab. 3.9: Reportergenaktivität bei Coexpression der BD-p27-Fragmente mit AD-CDK 2, -Klon 21 in PJ69-2A/Y187. LWH, LWHAd (Tab. 3.2); ++ positiv, + schwach positiv, (+) evtl. schwach positiv, - eher negativ, -- negativ

Die p27-Fragmente 1-100 und 51-100 zeigen bei Expression in pGAD T7 weder Bindung an die GAL 4 DNA-BD noch autonome Reportergenaktivität. Da jedoch AD-p27 sowie die beiden Fragmente keinerlei eindeutig positive Reaktionen zeigten - nicht einmal bei Coexpression von p27 mit OTO 2001 - wurden diese Tests nicht weiter fortgeführt.

3.2 Ergebnisse der FRET-Methode

Ausgehend von der Hefe-optimierten EGFP-Variante (yEGFP, Cormack et al., 1997) wurden zunächst die Spektralvarianten yEBFP, yEYFP und yECFP hergestellt und anschließend in geeigneten Hefe Vektoren subkloniert. Durch Klonierung der in Abschnitt 3.1.2 im *Yeast Two Hybrid* System getesteten Moleküle an das C-terminale Ende der GFP-Spektralvarianten und Expression dieser Fusionsproteine in *Saccharomyces cerevisiae* können die Ergebnisse im FRET-System mit den *Yeast Two Hybrid*-Ergebnissen verglichen werden.

3.2.1 Herstellung der Spektralvarianten von yEGFP

Für die Herstellung der Spektralvarianten wurden gezielt einzelne Aminosäuren der EGFP Mutante 3 mittels PCR verändert (siehe 2.1.5.2). Für yEYFP musste nur Thr an Position 203 durch Tyr ersetzt werden (Mutation T203Y). Bei yEBFP wurden vier Aminosäuren mutiert, wobei die Mutationen F64L, S65T und Y66H auf einem PCR-Primer lagen (siehe Anhang). Für die letzte Mutation (Y145F) musste ein neuer Ansatz gemacht werden. Bei der Herstellung von yECFP wurden vier Mutationschritte durchgeführt. Das erste Konstrukt trägt die Mutationen F64L, S65T und Y66W. Die Mutationen N146I und M153T lagen zusammen auf einem PCR-Primer, die Aminosäuren V163A und N212K mussten einzeln mutiert werden.

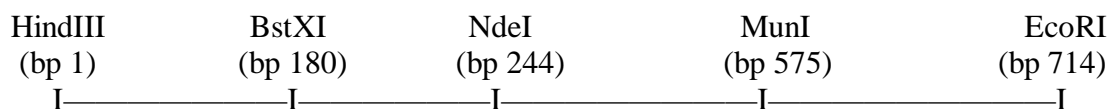


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der Schnittstellen innerhalb von yEGFP. Diese Schnittstellen sind nur in der yEGFP-DNA und nicht in dem modifizierten pUC19-Plasmids vorhanden. Über diese Schnittstellen werden die mutierten yEGFP-Fragmente gegen die nicht mutierten Bereiche ausgetauscht.

Um das Auftreten zufälliger Mutationen zu minimieren, wurden bei der ursprünglichen yEGFP-DNA nacheinander die mutierten Fragmente ersetzt. Dafür wurde die yEGFP-DNA zunächst über HindIII/EcoRI in einen modifizierten pUC19-Vektor, bei dem die NdeI-Schnittstelle durch

NdeI-Verdau mit anschließender Auffüllreaktion (2.1.6.5) und *blunt end-*Ligation (2.1.6.2) entfernt wurde, subkloniert und die mutierten Fragmente nach und nach ausgetauscht.

Die für die Herstellung der einzelnen Spektralvarianten benötigten Mutationen und deren Auswirkung auf die GFP-Eigenschaften sind in Tabelle 3.10 noch einmal kurz zusammengestellt.

Spektralvariante	Mutation	Auswirkungen der Mutation	Referenz
EBFP 381 nm 448 nm	F64L	erhöht Löslichkeit und Effizienz der Proteinfaltung bei 37°C	Zerniacka-Goetz et al., 1997
	S65T	<i>Single Peak Shift</i> des Anregungsspektrums, keine Photoisomerisierung	Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1995
	Y66H	Blaerverschiebung des Spektrums	Heim et al., 1994
	Y145F		Heim and Tsien, 1996
EGFP mut 3 488 nm 507 nm	S65G	Rotverschiebung des Spektrums	Ormö et al., 1996
	S72A	Erhöhung des Anregungspeaks	Ormö et al., 1996
	21-fach stärkere Fluoreszenz als Wildtyp-GFP		Cormack et al., 1996
ECFP 433 nm 480 nm	F64L	siehe oben	siehe oben
	S65T	siehe oben	siehe oben
	Y66W	Blaerverschiebung der Emission	Heim et al., 1994
	N146I	erhöhte Löslichkeit	Yang et al., 1996 a
	M153T		Heim & Tsien, 1996
	V163A	erhöht Temperaturtoleranz und Effekt der S65T-Mutation	Kahana & Silver, 1996
	N212K		Heim & Tsien, 1996
EYFP 513 nm 527 nm	S65G	siehe oben	siehe oben
	S72A	siehe oben	siehe oben
	T203Y	Reduktion des Anregungspeaks bei 475 nm	Ormö et al., 1996

Tab. 3.10: Mutationen der GFP-Spektralvarianten und deren Auswirkung auf die GFP-Eigenschaften.

Um eine Reinigung der GFP-Proteine bzw. später evtl. im *Screen* gefundener Interaktionspartner zu erleichtern wurden an den Aminoterminus der GFP-Moleküle sechs Histidin-Reste angehängt.

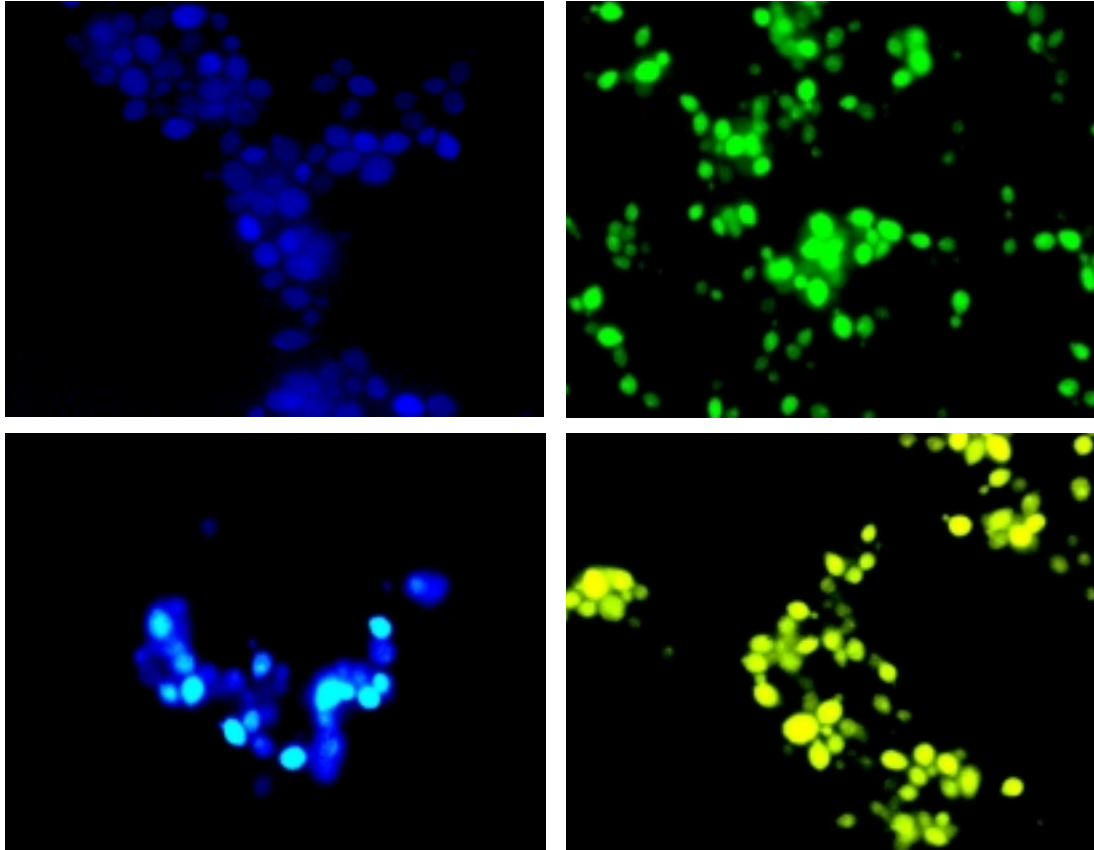


Abb. 3.5: Expression der hergestellten GFP-Spektralvarianten in INV Sc1. yEBFP (oben links), yEGFP (oben rechts), yECFP (unten links) und yEYFP (unten rechts) **BFP-Filterset:** D380/30, 420DCLP, D460/50; **GFP-Filterset:** HQ470/40, Q495LP, HQ525/50; **CFP-Filterset:** D436/20, 455DCLP, D480/40; **YFP-Filterset:** D510/20, 535DCLP, D560/40;

Nach Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* (2.1.4.5) wurden die Spektralvarianten im Mikroskop (Fluoreszenz-Mikroskop Axioskop, Zeiss) überprüft. Die DNA wurde sicherheitshalber sequenziert (Medi Genomix, 4 Base Lab), anschließend in die Hefe-Expressionsvektoren pYES 2 bzw. pYES 3 subkloniert, in INV Sc1 transformiert (2.2.5.2, *Small Scale*) und die Expression im Fluoreszenz-Mikroskop überprüft (Abb 3.5). Die Hefen wurden nach 2.3.3 aufgeschlossen, die Spektralvarianten über Nickel-Säulen angereinigt (2.3.4) und am Fluoreszenzspektrometer (LS-50B, Perkin Elmer) die Anregungs- bzw. Emissionsspektren aufgenommen.

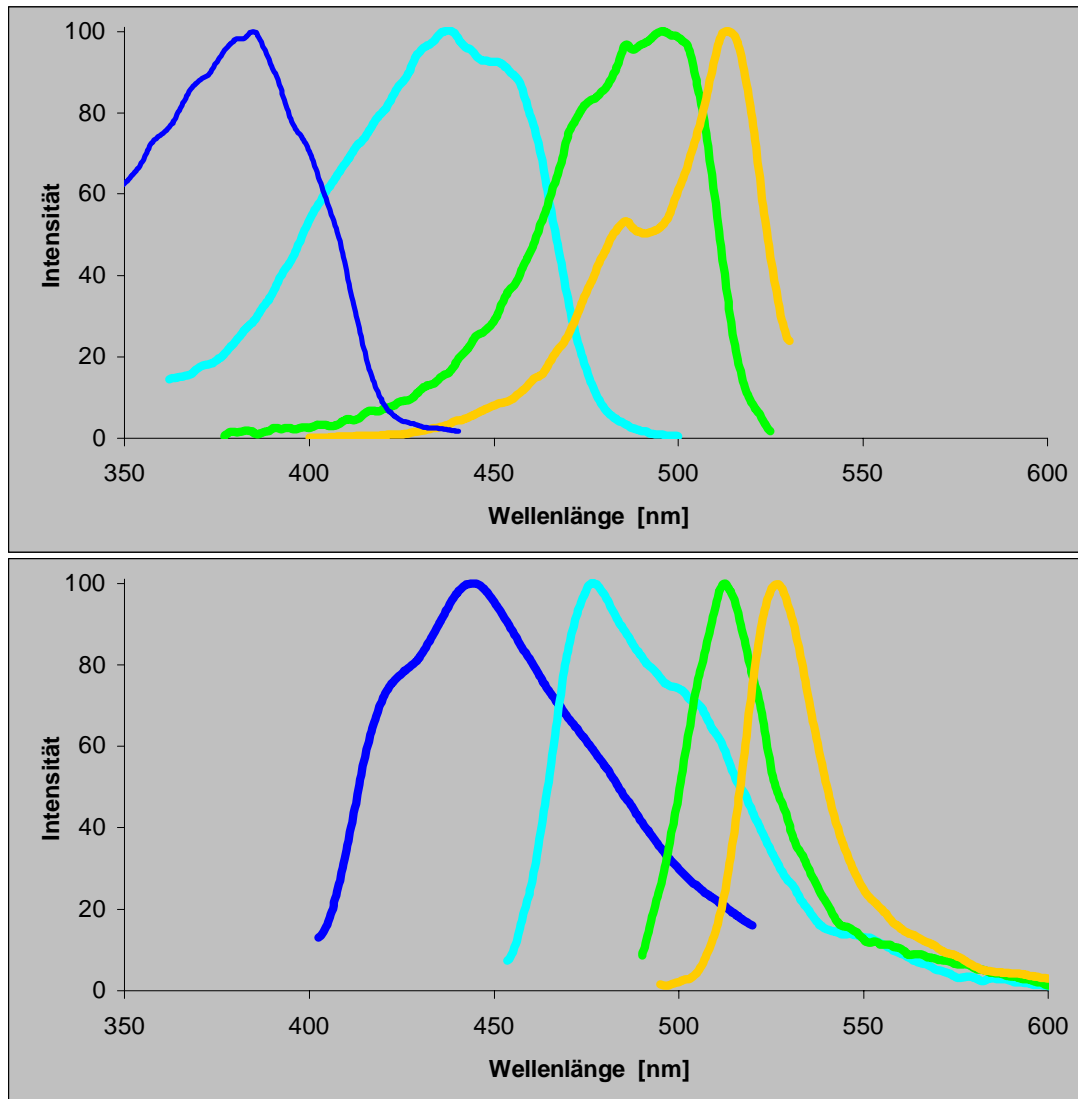


Abb. 3.6: Anregungsspektren (oben) und Emissionsspektren (unten) von **yEBFP**, **yECFP**, **yEGFP** und **yEYFP**.

3.2.2 Herstellung der benötigten Konstrukte

Zunächst wurden yEBFP und yECFP mit und ohne Terminationstriplet (TAA, TAG oder TGA) über HindIII/EcoRI in pYES 2, yEGFP und yEYFP in pYES 3 subkloniert. Anschließend wurden die schon im *Yeast Two Hybrid* System getesteten Proteine p27, p38, CDK 2, Cyclin A, OTO 2001 und Lamin C über EcoRI/XhoI bzw. XbaI *in frame* an den C-Terminus der jeweiligen Spektralvariante subkloniert.

Weiterhin wurden diverse Kontrollen, bei denen die Spektralvarianten über verschiedene Linker kovalent verbunden sind, hergestellt:

Drei Glycinresten wurden durch einen entsprechenden PCR-Primer an den C-Terminus von yEBFP bzw. yECFP angehängt und diese Konstrukte über HindIII/BamHI in pYES 2 subkloniert. Über BamHI/EcoRI wurde dann der jeweilige FRET-Partner hinter den Linker gesetzt. Dieses Glycin-gelinkte Konstrukt dient als absolute Positivkontrolle.

Bei der absoluten Negativkontrolle wurden die beiden FRET-Partner durch einen Linker aus 30 Prolinresten (Stryer, 1967) verbunden. Für diesen Linker wurden komplementäre Oligonukleotide mit kohäsiven Enden (EcoRI/BamHI) bei Gibco BRL bestellt, wie unter 2.1.6.3 beschrieben hybridisiert und in einen modifizierten pGAD T7-Vektor, bei dem die HindIII-Schnittstelle (2280) mittels PCR durch TTGCTT ersetzt wurde (\rightarrow pGAD T7*), subkloniert. Über HindIII/EcoRI wurde der FRET-Donor vor den Linker kloniert, anschließend das komplette Konstrukt über HindIII/BamHI herausgeschnitten und vor den Akzeptor, der zuvor über BamHI/EcoRI in pYES 2 kloniert wurde, gesetzt.

Durch geeignete Primer wurden die beiden FRET-Partner mittels PCR durch das Peptid SSMTGGQMGRDLYDDDDDKDPPAEF (Heim and Tsien, 1996) verbunden und das Konstrukt, Donor-LINK-Akzeptor, anschließend über HindIII/EcoRI in pYES 2 subkloniert.

Plasmid	Insert (BFP/GFP-Paar)	Insert (CFP/YFP-Paar)
pYES 2	yEBFP-3 x Glycin-yEGFP yEBFP-30 x Prolin-yEGFP yEBFP-LINK-yEGFP	yECFP-3 x Glycin-yEYFP yECFP-30 x Prolin-yEYFP yECFP-LINK-yEYFP
	yEBFP (in pGAD T7*) yEBFP-Lamin C yEBFP-p27 yEBFP-CDK 2	yECFP (in pGAD T7*) yECFP-Lamin C yECFP-p27 yECFP-CDK 2
pYES 3	yEGFP yEGFP-p38 yEGFP-CDK 2 yEGFP-Cyclin A yEGFP-OTO 2001	yEYFP yEYFP-p38 yEYFP-CDK 2 yEYFP-Cyclin A yEYFP-OTO 2001

Tab. 3.11: Auflistung sämtlicher hergestellter FRET-Konstrukte.

3.2.3 Expression der FRET-Konstrukte in INV Sc1

Die Konstrukte wurden nach 2.2.5 (*Small Scale*) in INV Sc1 transformiert und auf Glukose-haltigem Selektionsmedium ausplattiert. Die nach zwei bis drei Tagen gewachsenen Kolonien wurden auf Galaktose/Raffinose-haltigem Selektionsmedium ausplattiert und die gewachsenen Kolonien in Fluoreszenz-Mikroskop auf eine Expression der FRET-Konstrukte hin überprüft.

Bei den Lamin C-, p38-, p27-, CDK 2-, Cyclin A- und OTO 2001-Konstrukten traten massiv Probleme bei der Proteinexpression auf, die durch zeitlich kontrollierte Induktion teilweise erheblich verbessert werden konnte. Bei diesen Konstrukten wurden mit den gewachsenen Kolonien Flüssigkulturen in nicht-induzierendem Medium angesetzt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen pelletiert, gewaschen und in Galaktose/Raffinose-haltigem Induktionsmedium resuspendiert ($OD_{600} = 0,2-0,3$). In zweistündigen Abständen wurden Proben entnommen, die Zellen pelletiert, gewaschen, in Vectashield mit DAPI (Vector) eingebettet und die Expression der FRET-Konstrukte am Fluoreszenz-Mikroskop überprüft.

Zur Lokalisierung des Kerns wurde jeweils eine Aufnahme im DAPI-Filterset (D360/50, 400DCLP, D460/50) gemacht. Außerdem wurde jedes Präparat im Nomarski aufgenommen, um die Vakuole zu lokalisieren, die aufgrund ihrer vom Cytoplasma verschiedenen Dichte als ‚Krater‘ sichtbar wird (Roberts et al., 1991).

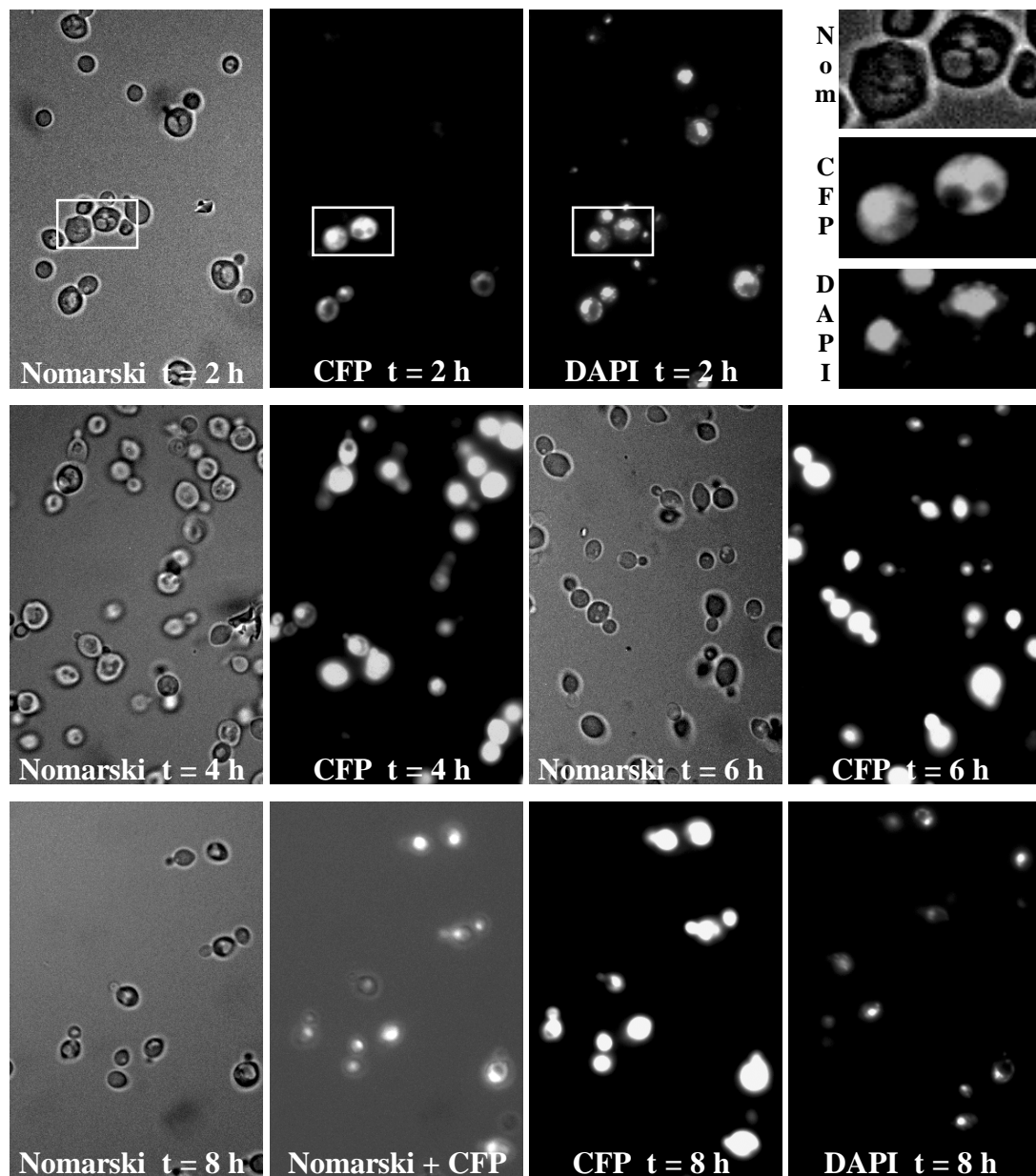


Abb. 3.7: Expression von yECFP-Lamin C in INV Sc1. Die angegebenen Zeiten t beziehen sich auf den Start der Induktion ($t = 0$). CFP-Filterset: D436/20, 455DCLP, D480/40

yECFP-Lamin C (Abb.3.7) wird nach zweistündiger Induktion gut sichtbar exprimiert. Nach vier Stunden zeigen nahezu alle Zellen CFP-Fluoreszenz, die nach sechs bis acht Stunden noch intensiver wird. Das Protein liegt dabei, mit Ausnahme der Vakuole, in der gesamten Zelle verteilt vor (vergrößerte Ausschnitte). Eine scheinbare Anreicherung im Zellkern (Nomarski kombiniert mit CFP-Filter) wird vermutlich durch die zum Teil sehr ausgedehnten Vakuolen nur vorgetäuscht. Nach 24-stündiger Induktion weisen nur noch 10-20% der Zellen eine starke CFP-

Fluoreszenz auf (nicht abgebildet).

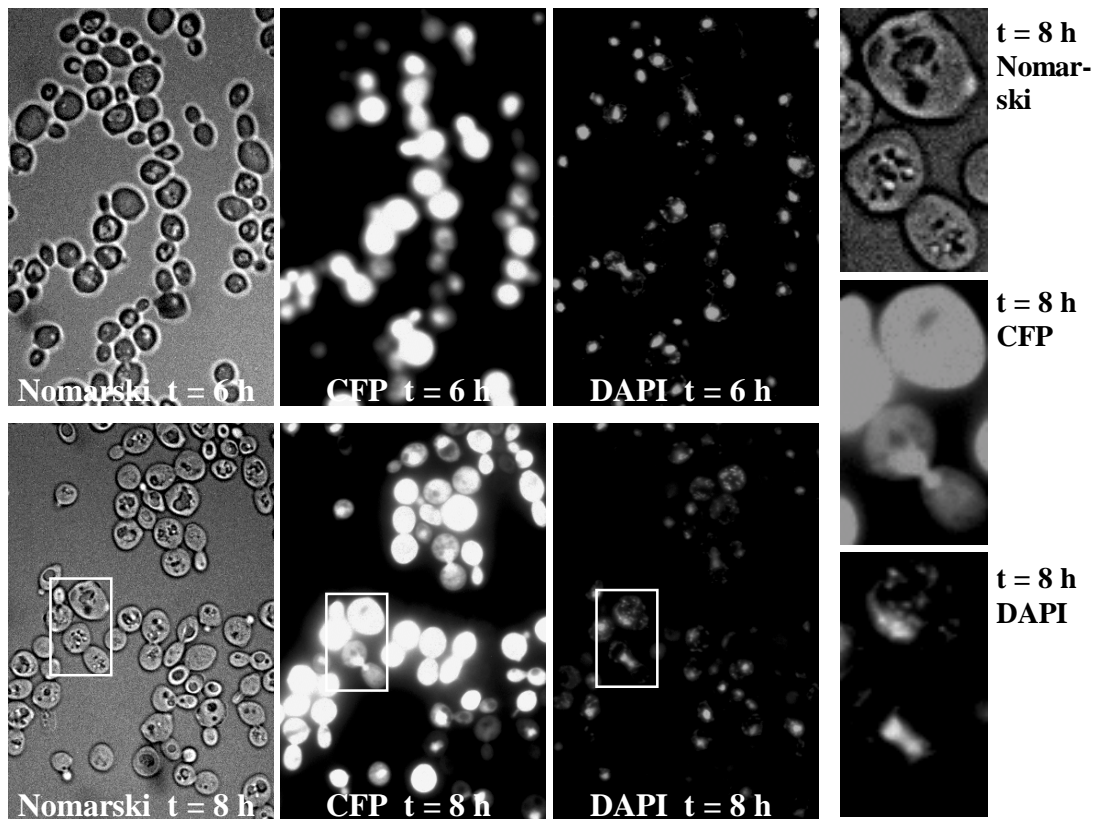


Abb. 3.8: Expression von yECFP-p27 in INV Sc1. Die angegebenen Zeiten t beziehen sich auf den Start der Induktion ($t = 0$). CFP-Filterset: D436/20, 455DCLP, D480/40

Auch yECFP-p27 (Abb. 3.8) wird schon nach 2 h gut sichtbar exprimiert (nicht abgebildet), reichert sich allerdings im Kern an. Nach sechs bis acht Stunden wird auch hier eine starke Expression erreicht. Bei Vergleich der Aufnahme im CFP-Filterset $t = 8$ h (vergrößerter Ausschnitt) mit der Aufnahme derselben Probe im DAPI-Filter wird eindeutig eine Anreicherung im Kern sichtbar. Manche Zellen in der Teilungsphase exprimieren CFP-p27 nur sehr schwach, andere dagegen sehr stark. Dieses stark heterogene Expressionsverhalten verschiedener Zellen einer Kultur wird bei Hefen sehr häufig beobachtet, auch wenn z.B. nur das sehr Protease-resistente GFP, das nicht in den Zellzyklus eingreift, exprimiert wird.

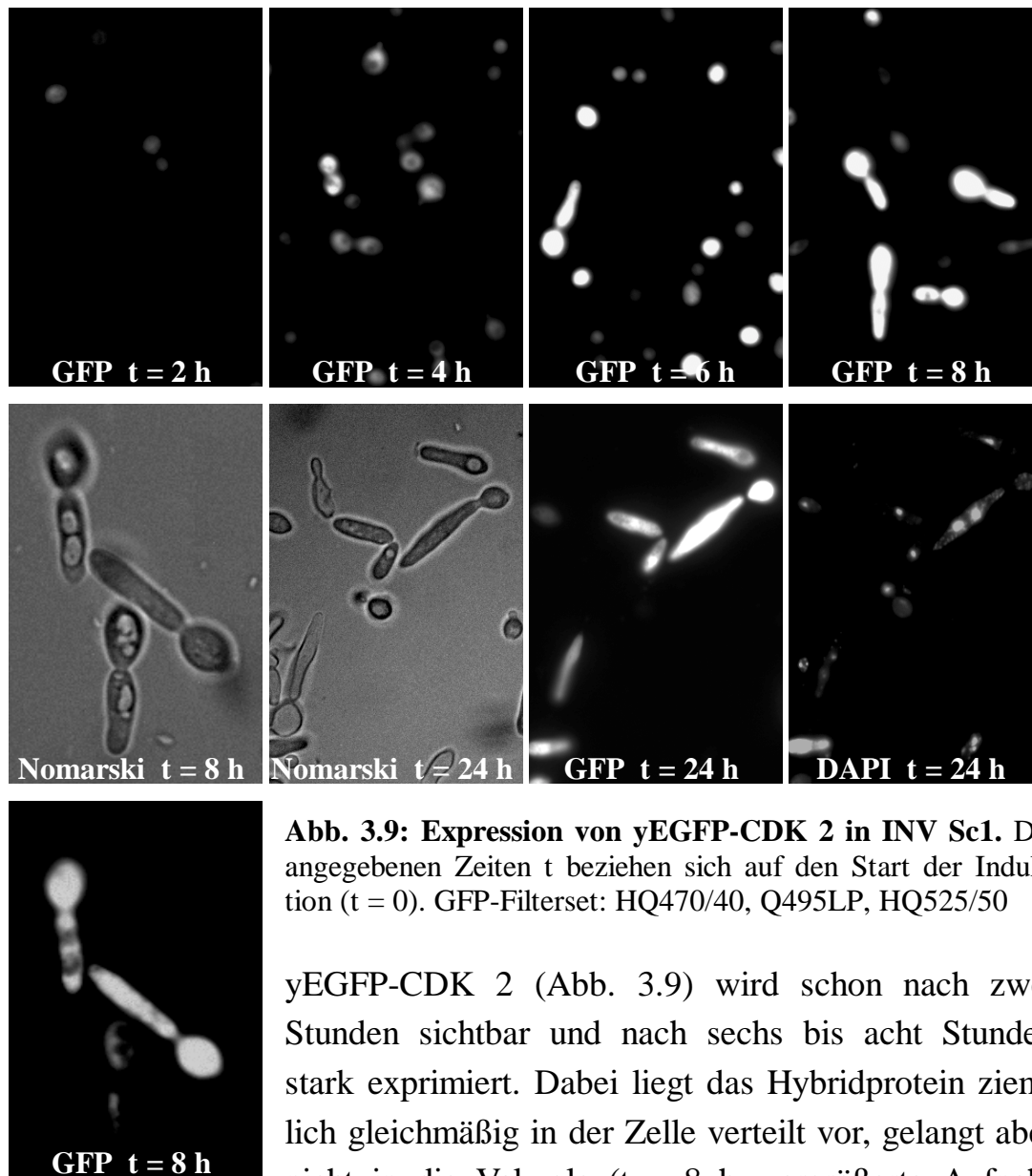


Abb. 3.9: Expression von yEGFP-CDK 2 in INV Sc1. Die angegebenen Zeiten t beziehen sich auf den Start der Induktion ($t = 0$). GFP-Filterset: HQ470/40, Q495LP, HQ525/50

yEGFP-CDK 2 (Abb. 3.9) wird schon nach zwei Stunden sichtbar und nach sechs bis acht Stunden stark exprimiert. Dabei liegt das Hybridprotein ziemlich gleichmäßig in der Zelle verteilt vor, gelangt aber nicht in die Vakuole ($t = 8$ h, vergrößerte Aufnahmen). Selbst nach 24-stündiger Induktion wird CDK 2 stark und gleichmäßig exprimiert. Auffällig ist jedoch die morphologische Veränderung der Zellen. Dabei scheinen die Zellen zunächst eine Tochterzelle abzuschneiden, die jedoch nicht vollständig abgetrennt wird. Diese Tochterzelle scheint sich ebenfalls zu ‚teilen‘ und wiederum die Tochterzelle nicht komplett abzuschneiden ($t = 24$ h, DAPI: Zelle rechts oben im Bild). So entstehen langgestreckte, mehrkernige Gebilde, die mit der Zeit immer häufiger auftreten. Nach 24-stündiger Induktion liegen nahezu alle Zellen in dieser veränderten Form vor.

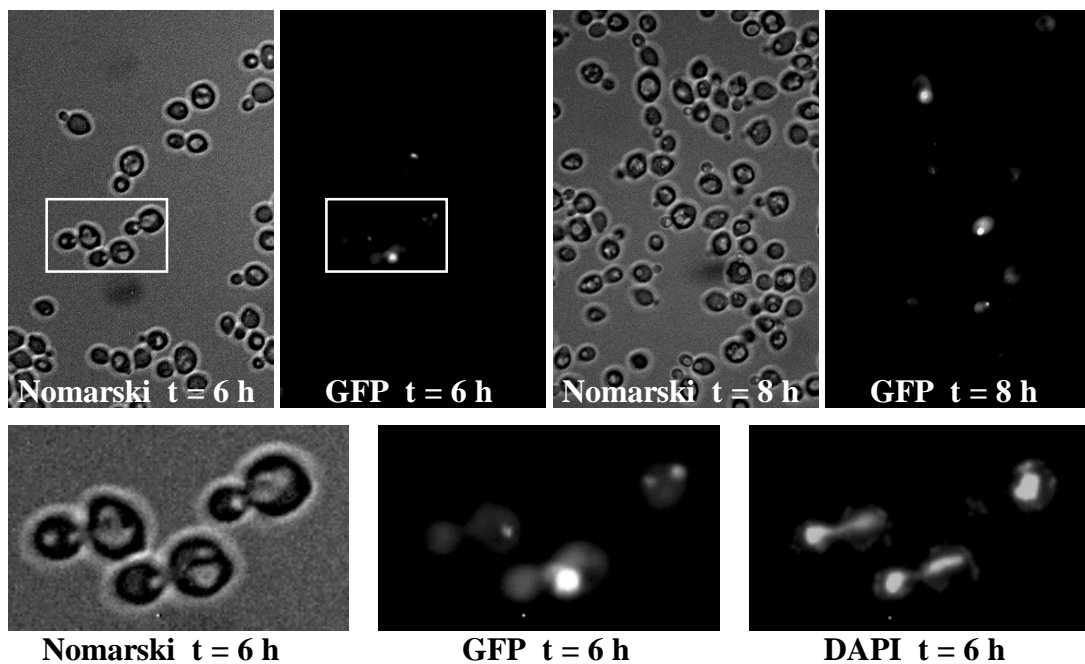


Abb. 3.10: Expression von yEGFP-p38 in INV Sc1. Die angegebenen Zeiten t beziehen sich auf den Start der Induktion ($t = 0$). GFP-Filterset: HQ470/40, Q495LP, HQ525/50

Bei Expression von yEGFP-p38 (Abb. 3.10) wird erstmals nach vier Stunden vereinzelt eine schwache Fluoreszenz beobachtet (nicht abgebildet). Selbst nach sechs bis acht Stunden tritt nur bei etwa 10% der Zellen eine schwache Fluoreszenz auf. Einige Zellen weisen außerdem einen stark fluoreszierenden Bereich im Inneren der Vakuole auf (vergrößerte Ausschnitte), füllen sie aber nicht ganz aus. Nach 24-stündiger Induktion ist keine Fluoreszenz mehr zu erkennen (nicht abgebildet).

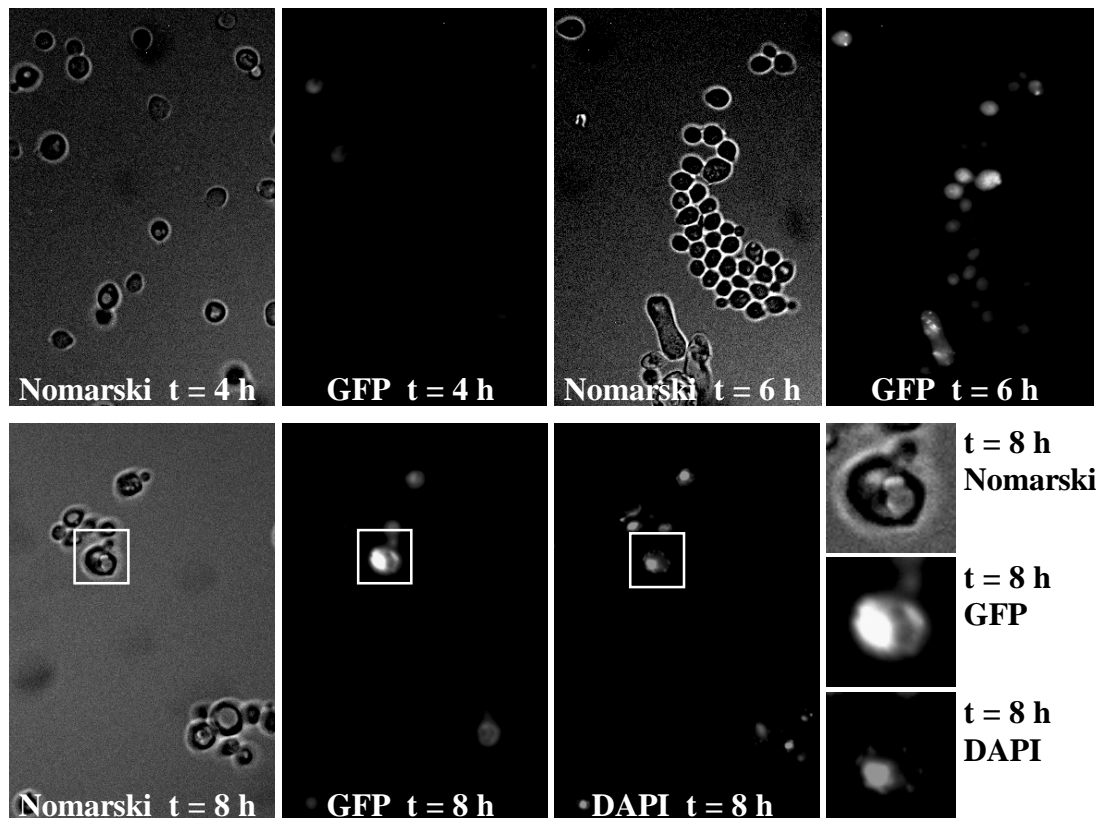


Abb. 3.11: Expression von yEGFP-OTO 2001 in INV Sc1. Die angegebenen Zeiten t beziehen sich auf den Start der Induktion ($t = 0$). GFP-Filterset: HQ470/40, Q495LP, HQ525/50

yEGFP-OTO 2001 (Abb. 3.11) wird etwas stärker exprimiert als p38, aber auch hier nur von etwa 10% der Zellen und nach 24-stündiger Induktion kann ebenfalls kaum mehr Expression nachgewiesen werden. Die vergrößerten Aufnahmen zeigen, dass das Protein im Cytosol auftritt und eventuell im Zellkern angereichert wird.

Eine Expression von yEGFP-Cyclin A konnte leider zu keiner Zeit nach der Induktion nachgewiesen werden (nicht abgebildet). Dabei wurde aber beobachtet, dass die Zellen etwa zweimal schneller wachsen als die anderen Expressionsansätze.

Nachdem die Expressionskontrollen abgeschlossen waren, wurden die Linker-Konstrukte sowie geeignete Kombinationen der restlichen FRET-Konstrukte nach 2.2.5 (*Small Scale*) in INV Sc1 transformiert. Mit den nach 2-3 Tagen gewachsenen Kolonien wurden über-Nacht-Kulturen in nicht induzierendem Medium angesetzt, am nächsten Morgen pelletiert, gewaschen und in induzierendem Medium resuspendiert (OD 0,2-0,3). Je nach Expression (siehe oben) wurden die Hefezellen nach sechs bis acht Stunden pelletiert, in induzierendem Selektionsmedium mit 25% Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bis zur Messung im Fluoreszenz-Spektrometer bei -80°C gelagert. Die unproblematischen Konstrukte können auch direkt über Nacht in Induktionsmedium kultiviert werden. Die Zellen sollten allerdings möglichst in der log-Phase (bei INV Sc1 $< \text{OD}_{600} = 0,8-1,0$) geerntet werden.

3.2.4 FRET-Meßergebnisse

Vor der Messung wurden die Zellen aufgetaut, gewaschen und anschließend in PBS (pH 7,5) resuspendiert. Um Fehler durch Streueffekte möglichst gering zu halten, wurden sämtliche Proben auf eine OD_{600} von 0,2-0,3 eingestellt.

Jede Probe wurde bei drei verschiedenen Anregungs- und Emissionswellenlängen vermessen:

	yECFP-/yEYFP-Proben		
Anregung	CFP 433 nm \pm 2,5	YFP 485 nm \pm 2,5	CFP 433 nm \pm 2,5
Emission	CFP 480 nm \pm 7,5	YFP 530 nm \pm 7,5	YFP 530 nm \pm 7,5
	yEBFP-/yEGFP-Proben		
Anregung	BFP 385 nm \pm 2,5	GFP 484 nm \pm 2,5	BFP 385 nm \pm 2,5
Emission	BFP 445 nm \pm 7,5	GFP 510 nm \pm 7,5	GFP 510 nm \pm 7,5
	Donor (D)	Akzeptor (A)	FRET (F)

Tab. 3.12: Anregungs- und Emissionswellenlängen von yEBFP, yECFP, yEGFP und yEYFP sowie die jeweilige FRET-Einstellung, normiert auf $\text{OD}_{600} = 0,3$

Durch Messung einer INV Sc1-Probe, die ausschließlich das pYES2-Plasmid enthielt, wurde die Autofluoreszenz des verwendeten Hefestammes (Leerwert) bei sämtlichen Spektrometer-Einstellungen (siehe Tab. 3.12) bestimmt:

Einstellung	Messwert	Einstellung	Meßwert
CFP	54,7	BFP	217,4
YFP	26,5	GFP	67,9
CY-FRET	32,5	BG-FRET	73,8

Tab. 3.13: Autofluoreszenz von INV Sc1 bei sämtlichen Spektrometer-Einstellungen. normiert auf $OD_{600} = 0,3$

Anschließend wurde für jedes System das Durchstrahlen der separat exprimierten Spektralvarianten bei den jeweils anderen Anregungs- und Emissionswellenlängen bestimmt:

Probe	CFP	YFP	CY-FRET
CFP	$284,2 \pm 9,0$	$0,5 \pm 1,3$	$83,9 \pm 3,8$
YFP	$-4,8 \pm 3,2$	$386,2 \pm 10,6$	$19,6 \pm 1,9$
	BFP	GFP	BG-FRET
BFP	$77,6 \pm 17,3$	$-1,0 \pm 3,3$	$18,8 \pm 7,0$
GFP	$-10,9 \pm 13,7$	$394,8 \pm 63,2$	$41,2 \pm 5,6$

Tab. 3.14: Bestimmung des Durchstrahlen einer Spektralvarianten bei den jeweils anderen Einstellungen. normiert auf $OD_{600} = 0,3$

Das Durchstrahlen der CFP-Probe (pGAD T7*-yECFP) beträgt bei YFP-Anregung und -Emission nur etwa 0,2% und kann daher vernachlässigt werden. Das Durchstrahlen bei FRET-Wellenlängen dagegen beträgt $29,5\% \pm 0,6$ und muss daher bei den Berechnungen des Energietransfers berücksichtigt werden. Bei der YFP-Probe (pYES 3-yEYFP) ist ausschließlich ein Durchstrahlen von $5,1\% \pm 0,5$ bei FRET-Einstellungen zu beobachten.

Die BFP-Probe (pGAD T7*-yEBFP) strahlt ebenfalls nur bei FRET-Wellenlängen durch und zwar zu $23,8\% \pm 6,9$. Bei der GFP-Probe (pYES 3-yEYFP) ist bei dieser Einstellung ein Durchstrahlen von $10,7\% \pm 2,4$ zu beobachten.

Die Berechnung sämtlicher für die Auswertung benötigter Parameter erfolgte in Anlehnung an Gordon et al. (1998) und Tron et al. (1984) nach folgenden Gleichungen:

$$ET = Ff - Df \times (Fd/Dd) - Af \times (Fa/Aa)$$

$$Ffa / Faa = [Ff - Df \times (Fd/Dd)] / Af \times (Fa/Aa)$$

$$Ff_{ex} / Ff_{th} = Ff / [Df \times (Fd/Dd) + Af \times (Fa/Aa)]$$

$$FRET\ N = [Ff - Df \times (Fd/Dd) - Af \times (Fa/Aa)] / Dd \times Aa,$$

wobei $Ff = Df \times (Fd/Dd) + Af \times (Fa/Aa) + \text{Akzeptorsignal-Verstärkung } (\Delta_A)$ bei vorliegendem Energietransfer. Ohne Energietransfer ist die Akzeptorsignal-Verstärkung = 0.

Die Nomenklatur wurde vorwiegend aus dem *Paper* von 1998 übernommen. Die Großbuchstaben A (Akzeptor), D (Donor), F (FRET) stehen für die verwendeten Spektrometer-Einstellungen (siehe Tab. 3.12) und die Kleinbuchstaben a, d, f für die in der Probe enthaltenen Spektralvarianten. Af, Df und Ff sind die Messwerte der Proben, die beide Spektralvarianten enthalten, bei der jeweiligen Einstellung. Fd/Dd ist der Anteil der Donor-Fluoreszenz, der bei FRET-Einstellung durchstrahlt, Fa/Aa der Anteil des Akzeptors, der bei FRET-Anregung direkt angeregt wird. Diese Werte wurden auf Seite 88 schon ermittelt:

$$Fd/Dd_{CFP} = 0,295$$

$$Fd/Dd_{BFP} = 0,238$$

$$Fa/Aa_{YFP} = 0,051$$

$$Fa/Aa_{GFP} = 0,107$$

Bei Af wird das reine Akzeptorsignal und mit Df das, aufgrund von Energieübertragung auf den Akzeptor, verringerte Donorsignal ermittelt. Demnach ist $Df \times (Fd/Dd)$ näherungsweise der Anteil des gequenchten Donors, der bei FRET-Einstellung durchstrahlt. Das Durchstrahlen des Akzeptors kann exakt errechnet werden, da bei Akzeptoreinstellung die tatsächlich vorliegende Akzeptor-„Menge“ bestimmt werden kann. In den Ff-Wert geht neben Akzeptor-Durchstrahlen bei FRET-Einstellung und Durchstrahlen des gequenchten Donors auch noch die Akzeptorsignal-Verstärkung durch FRET ein.

Der **Energietransfer (ET)** repräsentiert demnach näherungsweise die Zunahme des Akzeptorsignals (Δ_A) bei vorliegendem Energietransfer, der normiert auf die Akzeptor-Konzentration (ET/Aa) die aussagekräftigsten Ergebnisse liefert, da hier kein durch Donor-Quenching hervorgerufener Effekt eingeht.

Ff_{ex}/Ff_{th} stellt die Zunahme des bei FRET-Einstellung ermittelten Wertes (Ff) im Vergleich zu dem theoretisch errechneten Leerwert (ohne Energietransfer, Ff_{th}), der sich aus Durchstrahlen von Donor und Akzeptor bei FRET-Einstellung zusammensetzt, dar. Dieser Wert sollte bei nicht interagierenden Proben annähernd 1,0 sein, da gilt:

$$Ff_{ex}/Ff_{th} = 1 + [\Delta_A / [Df \times (Fd/Dd) + Af \times (Fa/Aa)]]$$

Bei vorliegendem Energietransfer wird dieser Wert theoretisch nur durch die Zunahme der Akzeptor-Fluoreszenz beeinflusst. Da aber auch der Donor bei FRET-Anregung durchstrahlt und bei vorliegendem Energietransfer auch bei Donor-Einstellung wegen Energieübertragung auf den Akzeptor nur ein reduziertes Donor-Signal detektiert werden kann (s.o.), geht hier die nicht ermittelbare, von der Effizienz des Energietransfers abhängige Größe $Df \times (Fd/Dd)$ in den Messwert ein. Es müssen deshalb immer geeignete Kontrollen, die die Randbereiche (maximaler und minimaler Wert) festlegen, mitgetestet werden.

Durch **Ffa/Faa** wird die relative Zunahme der Akzeptorfluoreszenz durch den FRET-Effekt ermittelt:

$$Ffa/Faa = 1 + \Delta_A / [Af \times (Fa/Aa)]$$

FRET N setzt den Energietransfer in Relation zu den in der Zelle enthaltenen Donor- und Akzeptor-Konzentrationen.

3.2.4.1 Kalibrierung der beiden FRET-Systeme

Für die Kalibrierung des Systems wurden die Linker-Konstrukte sowie die coexprimierten FRET-Paare verwendet. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 3.15 und 3.16 zusammengestellt.

Probe	YFP	CFP	FRET	CFP/YFP		
CFP/YFP	733	347	157	0,47		
± Standardabw.	11	6	5	0,01		
CFP-30xPro-YFP	121	68	43	0,56		
± Standardabw.	2	4	2	0,03		
CFP-Peptid-YFP	220	142	107	0,65		
± Standardabw.	9	9	6	0,01		
CFP-3xGly-YFP	226	95	144	0,42		
± Standardabw.	8	7	6	0,02		
Probe	ET	ET/Aa x 10 ⁻²	ET/Dd x 10 ⁻²	Ffa/Faa	Ff _{ex} /Ff _{th}	FRET N x 10 ⁻⁴
CFP/YFP	12	2,3	5,0	1,5	1,12	1,0
± Standardabw.	3	0,5	1,2	0,1	0,03	0,2
CFP-30xPro-YFP	69	13,8	24,7	3,7	1,64	4,9
± Standardabw.	2	0,5	1,3	0,1	0,03	0,3
CFP-Peptid-YFP	122	24,4	37,7	5,8	2,01	7,5
± Standardabw.	6	1,1	1,9	0,2	0,05	0,4
CFP-3xGly-YFP	230	46,0	109,4	10,0	3,63	21,9
± Standardabw.	6	1,2	6,2	0,2	0,12	1,3

Tab. 3.15: Messdaten für die Kalibrierung des CFP/YFP-FRET-Systems. Zunächst wurden alle Messdaten auf $OD_{600} = 0,3$ normiert. Um die Daten in der zweiten Tabellenhälfte miteinander vergleichen zu können, wurden sämtliche Messwerte zusätzlich auf einen YFP-Wert von 500 normiert, bevor diese Daten berechnet wurden.

Probe	GFP	BFP	FRET	BFP/GFP		
BFP/GFP	1091	60	159	0,06		
± Standardabw.	121	6	9	0,01		
BFP-30xPro-GFP	91	35	31	0,39		
± Standardabw.	13	13	4	0,14		
BFP-Peptid-GFP	358	50	91	0,14		
± Standardabw.	25	21	9	0,06		
BFP-3xGly-GFP	230	52	74	0,22		
± Standardabw.	6	35	8	0,15		
Probe	ET	ET/Aa x 10 ⁻²	ET/Dd x 10 ⁻²	Ffa/Faa	Ff _{ex} /Ff _{th}	FRET N x 10 ⁻⁴
BFP/GFP	13,3	2,7	47,1	1,25	1,22	9,42
± Standardabw.	4,6	0,9	9,4	0,09	0,07	1,88
BFP-30xPro-GFP	69,1	13,8	38,7	2,29	1,71	7,74
± Standardabw.	6,9	1,4	13,7	0,13	0,16	2,74
BFP-Peptid-GFP	56,5	13,3	91,5	2,06	1,81	18,30
± Standardabw.	5,0	1,0	38,9	0,09	0,03	7,78
BFP-3xGly-GFP	80,6	16,1	100,1	2,51	2,05	20,02
± Standardabw.	3,8	0,8	58,2	0,07	0,24	11,64

Tab. 3.16: Messdaten für die Kalibrierung des BFP/GFP-FRET-Systems. Zunächst wurden alle Messdaten auf OD₆₀₀ = 0,3 normiert. Um die Daten in der zweiten Tabellenhälfte miteinander vergleichen zu können, wurden sämtliche Messwerte auf einen GFP-Wert von 500 normiert, bevor diese Daten berechnet wurden.

Vor der Auswertung der Messdaten muss zunächst überprüft werden, in welchem molaren Verhältnis Donor und Akzeptor in der jeweiligen Probe vorliegen, da nur Proben mit ähnlichen D/A-Verhältnissen miteinander verglichen werden dürfen. Würde nämlich bei derselben Probe einmal ein D/A-Verhältnis von 1:1 und einmal von 1:10 vorliegen, so würde vermutlich trotz gleicher Bindungsverhältnisse die zweite Probe eine deutlich geringere Akzeptorsignal-Verstärkung zeigen.

Es wird daher zunächst die Prolin-Linker-Probe betrachtet. Bei dieser Probe sollte kein Energietransfer auftreten, was bedeutet, dass hier bei Donor-Anregung und Emission die „ungequenchte“ (evtl. Quenching auch durch Lösungsmittel, aber dann immer derselbe Fehler; d.h. auch bei Kontrollen etc.) Donorfluoreszenz ermittelt werden kann. Da die beiden FRET-Partner in diesem Konstrukt kovalent miteinander ver-

knüpft sind, sollten sie in einem 1:1-Verhältnis exprimiert werden. Beim CY-FRET-System entspricht demnach ein D/A-Quotient von $0,56 \pm 0,03$, beim BG-FRET-System von $0,39 \pm 0,14$ einem molaren 1:1-Verhältnis. Da allerdings auch bei dieser Negativ-Kontrolle schon etwa 14% Akzeptorsignal-Verstärkung (ET/Aa) vorliegt, ist der tatsächliche Wert etwas größer. Die Probe mit dem flexiblen Glycin-Linker dient als absolute Positiv-Kontrolle, mit der die maximale FRET-Effizienz ermittelt werden kann. Mit Hilfe dieser Probe können stark herausfallende Daten erkannt werden. Im CY-System beträgt der Signal-Zuwachs dieser Probe 46%, im BG-System 16%. Die Effizienz des Energietransfers sollte bei den GFP-Spektralvarianten, die über „LINK“ verknüpft sind, zwischen Positiv- und Negativ-Kontrolle liegen, was beim CY-System mit einem Effekt von 24% auch der Fall ist. Im BG-System entspricht der Wert etwa dem des Prolin-Linker-Konstrukts. Allerdings ist hier auch der Bereich zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle sehr viel schmäler. Die Coexpression der nicht verknüpften FRET-Partner dient als praktische Negativ-Kontrolle. Die CY-Probe hier weist einen Effekt von 2,3%, die BG-Probe von 2,7% auf.

3.2.4.2 Auswertung der Messdaten im CFP/YFP-FRET-System

Nach der Kalibrierung des Systems können die Messdaten ausgewertet werden. Dabei sollten allerdings Proben, die eines oder beide Hybride schlecht exprimieren, nur unter Vorbehalt betrachtet werden. Eine Auswertung der p38- bzw. OTO 2001-Proben ist daher, wenn überhaupt, nur bedingt möglich.

Bei Coexpression von p27 mit CDK 2 wird im CY-System durchweg ein schwach positiver FRET-Effekt beobachtet (Tab. 3.17 b). Der auf Akzeptor-Konzentration normierte Wert ET/Aa beträgt dabei 6,8% und liegt damit eindeutig über den zugehörigen Kontrollwerten von 2,3% (CFP + YFP-CDK 2) und 2,8% (CFP-p27 + YFP). Mit CFP-Lamin C zeigt YFP-CDK 2 keinen positiven Effekt. Der Wert liegt mit 0,6% sogar unter den zugehörigen Kontrollwerten von 1,3% (CFP-Lamin C + YFP) und 2,3% (CFP + YFP-CDK 2). Eine weitere recht aussagekräftige Größe stellt der

$F_{\text{ex}}/F_{\text{th}}$ -Wert dar. Dieser Wert sollte ohne vorliegenden Energietransfer etwa 1,0 betragen. Bei der p27/CDK 2-Probe zeigt dieser Wert mit 1,37 eindeutig einen FRET-Effekt, der sich auch im Vergleich mit den zugehörigen Kontrollen bestätigt. Sämtliche Kontrollen sowie auch die Lamin C/CDK 2-Probe zeigen hier Werte bis maximal 1,12 (CFP/YFP). Die restlichen ermittelten Daten dienen der weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse, was bei den bisher betrachteten Proben durchweg zutrifft.

Probe	YFP	CFP	FRET	CFP/YFP
CFP	490	326	132	0,67
YFP-CDK 2	5	6	1	0,00
CFP	6	276	84	43,85
YFP-p38	1	3	2	3,97
CFP	10	311	99	30,42
YFP-OTO 2001	1	14	6	0,78
CFP-Lamin C	292	117	53	0,40
YFP	4	6	3	0,02
CFP-Lamin C	473	200	86	0,42
YFP-CDK 2	6	2	1	0,01
CFP-Lamin C	14	172	53	12,56
YFP-p38	1	1	1	1,13
CFP-Lamin C	18	156	51	8,83
YFP-OTO 2001	1	2	0	0,40
CFP-p27	332	216	89	0,67
YFP	13	5	4	0,01
CFP-p27	446	203	113	0,45
YFP-CDK 2	8	3	3	0,01
CFP-p27	23	318	97	14,00
YFP-p38	2	7	2	0,78
CFP-p27	17	226	71	13,13
YFP-OTO 2001	2	4	2	1,12
CFP-CDK 2	380	277	107	0,73
YFP	14	14	6	0,01
CFP-CDK 2	9	309	92	38,70
YFP-OTO 2001	3	12	4	11,90

Tab. 3.17 a: Messdaten des CFP/YFP-FRET-Systems. Alle Messdaten wurden auf $OD_{600} = 0,3$ normiert. Alle Werte \pm Standardabweichung (nicht fett gedruckt).

Probe	ET	ET/Aa $\times 10^{-2}$	ET/Dd $\times 10^{-2}$	Ffa/Faa	Ff _{ex} /Ff _{th}	FRET N $\times 10^{-4}$
CFP	11,5	2,3	3,5	1,45	1,09	0,69
YFP-CDK 2	1,5	0,3	0,5	0,06	0,01	0,10
CFP	227,9	45,6	1,0	9,94	1,03	0,21
YFP-p38	195,6	39,1	0,9	7,67	0,03	0,17
CFP	314,2	62,8	2,1	13,32	1,07	0,41
YFP-OTO 2001	66,8	13,4	0,4	2,62	0,01	0,09
CFP-Lamin C	6,3	1,3	3,1	1,25	1,07	0,63
YFP	1,8	0,4	0,9	0,07	0,02	0,18
CFP-Lamin C	3,0	0,6	1,4	1,12	1,03	0,28
YFP-CDK 2	0,5	0,1	0,3	0,02	0,01	0,05
CFP-Lamin C	72,7	14,5	1,1	3,85	1,04	0,23
YFP-p38	22,4	4,5	0,3	0,88	0,01	0,06
CFP-Lamin C	121,6	24,3	2,8	5,77	1,09	0,55
YFP-OTO 2001	10,7	2,1	0,3	0,42	0,01	0,06
CFP-p27	14,1	2,8	4,2	1,55	1,11	0,84
YFP	2,0	0,4	0,7	0,08	0,02	0,14
CFP-p27	33,8	6,8	4,9	2,33	1,37	2,98
YFP-CDK 2	2,8	0,6	1,3	0,11	0,03	0,26
CFP-p27	42,1	8,4	0,6	2,65	1,02	0,12
YFP-p38	14,1	2,8	0,2	0,55	0,01	0,03
CFP-p27	105,7	21,1	1,6	5,15	1,05	0,32
YFP-OTO 2001	26,7	5,3	0,4	1,05	0,01	0,08
CFP-CDK 2	7,6	1,5	2,1	1,30	1,06	0,42
YFP	2,4	0,5	0,7	0,09	0,02	0,13
CFP-CDK 2	34,6	6,9	0,2	2,36	1,01	0,04
YFP-OTO 2001	18,4	3,7	0,1	0,72	0,00	0,02

Tab. 3.17 b: Messdaten des CFP/YFP-FRET-Systems. Zunächst wurden alle Messdaten auf $OD_{600} = 0,3$ normiert. Um die Daten in Tabelle 3.17 b miteinander vergleichen zu können, wurden sämtliche Messwerte auf einen GFP-Wert von 500 normiert, bevor diese Daten berechnet wurden. Alle Werte \pm Standardabweichung (nicht fett gedruckt).

p38 und OTO 2001 wird, wie schon in Abb. 3.10 und 3.11 gezeigt, sehr schlecht exprimiert (Tab. 3.17 a). Die Expression beträgt hier nur etwa 1-10%. Das Donor: Akzeptor-Verhältnis liegt bei den p38-Proben bei 82:1, 22:1 und 25:1, bei den OTO 2001-Proben bei 55:1, 15:1, 24:1 und 61:1. Ein positiver FRET-Effekt wird bei diesen Proben vermutlich in der Standardabweichung (hohe Donor-Werte) untergehen. Die ET-, ET/Aa-

und Ffa/Faa-Werte zeigen sehr hohe Werte, die jedoch den restlichen Daten widersprechen (Tab. 3.17 b).

3.2.4.3 Auswertung der Messdaten im BFP/GFP-FRET-System

Probe	GFP	BFP	FRET	BFP/GFP
BFP	398	81	73	0,20
GFP-CDK 2	16	7	3	0,02
BFP	4	75	26	18,79
GFP-p38	0	4	1	1,71
BFP	11	110	36	9,72
GFP-OTO 2001	--	--	--	--
BFP-Lamin C	538	30	67	0,06
GFP-CDK 2	16	4	2	0,01
BFP-Lamin C	13	37	21	2,87
GFP-p38	1	1	1	0,23
BFP-Lamin C	27	79	25	3,15
GFP-OTO 2001	16	37	14	0,83
BFP-p27	248	30	45	0,12
GFP	5	5	5	0,02
BFP-p27	486	84	113	0,17
GFP-CDK 2	14	6	2	0,02
BFP-p27	32	140	43	4,53
GFP-p38	8	23	8	0,65
BFP-p27	57	165	64	2,99
GFP-OTO 2001	18	34	20	0,35
BFP-CDK 2	310	39	52	0,13
GFP	3	10	4	0,03
BFP-CDK 2	53	243	71	4,71
GFP-OTO 2001	15	37	12	0,70

Tab. 3.18 a: Messdaten des BFP/GFP-FRET-Systems. Alle Messdaten wurden auf $OD_{600} = 0,3$ normiert. Alle Werte \pm Standardabweichung (nicht fett gedruckt).

Auch hier werden p38 und OTO 2001 sehr schlecht exprimiert (Tab. 3.18 a). Auffällig ist allerdings, dass p38 bei Coexpression mit BFP-p27 etwa achtmal stärker exprimiert wird als bei Expression mit BFP. Da aber die Werte sehr klein sind und auch bei Coexpression mit BFP-

Lamin C eine, wenn auch schwächere, Stabilisierung (dreifacher Wert) auftritt, ist fraglich, ob diese Daten aussagekräftig sind. Bei OTO 2001 kann eine ähnliche Beobachtung gemacht werden. Durch Coexpression mit Lamin C verdoppelt und bei Coexpression mit p27 bzw. CDK 2 vervierfacht sich die Expressionsstärke. Auch unter Berücksichtigung der Standardabweichung scheint hier eine relevante, wenn auch geringe Stabilisierung aufzutreten. Ein ähnliches, allerdings schwächer ausgeprägtes Bild zeigt auch das CY-System.

Probe	ET	ET/Aa $\times 10^{-2}$	ET/Dd $\times 10^{-2}$	Ffa/Faa	Ff _{ex} /Ff _{th}	FRET N $\times 10^{-4}$
BFP	14,2	2,8	14,0	1,27	1,18	2,79
GFP-CDK 2	2,0	0,4	1,6	0,04	0,02	0,32
BFP	945,5	189,1	10,1	18,67	1,41	2,02
GFP-p38	26,1	5,2	0,6	0,49	0,03	0,13
BFP	365,4	73,1	7,5	7,83	1,30	1,50
GFP-OTO 2001	--	--	--	--	--	--
BFP-Lamin C	2,6	0,5	9,6	1,05	1,04	1,92
GFP-CDK 2	0,5	0,1	2,5	0,01	0,01	0,51
BFP-Lamin C	421,4	84,3	29,5	8,88	2,07	5,89
GFP-p38	31,3	6,3	3,5	0,59	0,12	0,71
BFP-Lamin C	62,4	12,5	4,2	2,17	1,15	0,84
GFP-OTO 2001	21,0	4,2	2,0	0,39	0,07	0,40
BFP-p27	23,6	4,7	40,1	1,44	1,35	8,03
GFP	6,9	1,4	11,4	0,13	0,10	2,28
BFP-p27	42,6	8,5	49,5	1,80	1,58	9,91
GFP-CDK 2	4,3	0,9	4,6	0,08	0,05	0,92
BFP-p27	103,3	20,7	4,7	2,93	1,18	0,94
GFP-p38	32,3	6,5	1,9	0,60	0,07	0,37
BFP-p27	153,9	30,8	10,6	3,88	1,39	2,12
GFP-OTO 2001	37,1	7,4	3,9	0,69	0,13	0,78
BFP-CDK 2	15,3	3,1	24,9	1,29	1,22	4,98
GFP	3,4	0,7	3,6	0,06	0,04	0,72
BFP-CDK 2	72,3	14,5	3,1	2,35	1,12	0,61
GFP-OTO 2001	11,7	2,3	0,1	0,22	0,01	0,03

Tab. 3.18 b: Messdaten des BFP/GFP-FRET-Systems. Zunächst wurden alle Messdaten auf $OD_{600} = 0,3$ normiert. Um die Daten in Tabelle 3.18 b miteinander vergleichen zu können, wurden sämtliche Messwerte auf einen GFP-Wert von 500 normiert, bevor diese Daten berechnet wurden. Alle Werte \pm Standardabweichung (nicht fett gedruckt).

Auch in diesem System ist eindeutig ein positiver FRET-Effekt bei Coexpression von p27 mit CDK 2 zu beobachten. Der ET/Aa-Wert beträgt dabei 8,5%, bei den Kontrollen maximal 4,7%. Auch der Ff_{ex}/Ff_{th} liegt mit 1,58 eindeutig über den zugehörigen Kontrollwerten und die restlichen Daten bestätigen dieses Ergebnis.

Die ET-, ET/Aa- und Ffa/Faa-Daten liegen bei den p38- sowie den OTO 2001-Proben meist außerhalb des durch die Positiv- und Negativ-Kontrollen abgesteckten Bereichs. Diese Daten erscheinen daher wenig aussagekräftig. Betrachtet wird hier vor allem der Ff_{ex}/Ff_{th} -Wert. Da das D/A-Expressionsverhältnis sowohl bei Coexpression von GFP-p38 als auch von GFP-OTO 2001 mit BFP (49:1 und 26:1) stark von dem der restlichen p38- bzw. OTO 2001-Proben (7:1 bis 12:1) abweicht dürfen diese Kontrolldaten nicht zur Auswertung herangezogen werden. Dasselbe gilt für die BFP-p27/GFP- sowie die BFP-CDK 2/GFP-Probe (beide 1:3). Da Lamin C nur mit sehr wenigen Proteinen interagiert (Clontech), wird die Lamin C/OTO 2001-Probe mit einem Wert von 1,15 hier als Negativ-Kontrolle verwendet, obwohl auch hier ein Energietransfer nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann. Ausgehend davon werden die restlichen Proben betrachtet. Die Coexpression von OTO 2001 mit CDK 2 liefert einen Wert von 1,12 und ist somit per Definition negativ. Die p27/OTO 2001-Probe dagegen mit einem Wert von 1,39 ist eindeutig positiv. Die Lamin C/p38-Probe kann hier nicht als Negativ-Kontrolle dienen, da hier augenscheinlich ein Energietransfer vorliegt. Die Coexpression von p38 mit p27 scheint dagegen mit 1,18 deutlich geringer. Dieser Wert liegt im Bereich der Lamin C/OTO 2001-Probe.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Y2H Screening-Ergebnisse

4.1.1 Identifizierung von p27-Interaktionspartnern mittels Y2H-Screen

1×10^7 Klone der *Random Peptide Library* wurden gegen pGBT 9-p27, $5,3 \times 10^6$ gegen pGBK T7-p27 (80-197) getestet. Bei dem *Screen* gegen pGBK T7-p27 (80-197) wurden dabei zwar nur halb so viele Klone getestet als bei den beiden *Screens* gegen pGBT 9-p27, aber etwa dreimal so viele zunächst positive Klone isoliert. Das liegt vor allem daran, dass pGBT 9 (Promoter: *ADHI*, 410 bp; *low constitutive expression*) deutlich schwächer exprimiert wird als pGBK T7 (Promoter: *ADHI*, 700 bp; *high constitutive expression*) und damit auch die Aktivierung der Reportertranskription schwächer ausfällt (Yeast Protocols Handbook, Clontech). Daher sollten allerdings auch Klone, die im *Screen* gegen das schwach exprimierte p27 gefunden wurden, stärkere Bindungspartner darstellen als die im *Screen* gegen p27 (80-197) isolierten Klone.

Um zu überprüfen, ob es sich um eine spezifische Interaktion handelt, wurden die aus den positiven Hefeklonen isolierten *Library*-Plasmide mit pGBK T7-p27 in einem anderen Hefestamm coexprimiert und getestet. Hierfür wurde ein ‚diploider Hefestamm‘ (*Mating* von Y187 mit PJ69-2A) verwendet, der die β -Galaktosidase stärker exprimiert als HF7c (Yeast Protocols Handbook, Matchmaker GAL 4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual, Clontech). Dadurch soll das Wiederauffinden sehr schwacher Interaktionen erleichtert werden. Dennoch konnte aber nur bei vier der insgesamt neun isolierten *Library*-Plasmide erneut eine Interaktion mit p27 nachgewiesen werden.

Bei den restlichen fünf Klonen wurde vielleicht nicht das für die Bindung an p27 verantwortliche Plasmid isoliert, obwohl bei den *Library*-Transformationen immer die doppelte Menge *Bait*-Plasmid (2 mg; *Library* nur 1 mg) eingesetzt wird, um zu verhindern, dass eine Hefezelle mehr als ein *Library*-Plasmid aufnimmt. Da aber Hefen grundsätzlich

dazu in der Lage sind, mehrere Plasmide der gleiche Sorte aufzunehmen, kann diese Möglichkeit nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Exemplarisch wurden daher bei den Klonen 16 und 47 die Plasmide dreier willkürlich ausgewählter Bakterienklone sequenziert. Bei beiden Klonen stimmten die Resultate aller Sequenzierungen überein. Eine gelegentliche Expression eines anderen Klons kann dadurch jedoch nicht mit 100%-iger Sicherheit ausgeschlossen werden.

Solche nicht reproduzierbaren Positiv-Effekte können zum Teil auf unspezifische Wechselwirkungen zurückgeführt werden. Weiterhin könnte auch ein drittes Molekül, das nur temporär von der Hefe exprimiert wird, an der Interaktion beteiligt sein. Es kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Hefeklon spontan eine positive Reaktion zeigt, obwohl keinerlei Wechselwirkung vorliegt. Das Auftreten einzelner blau gefärbter Hefekolonien wurde bei den Interaktionstests häufig beobachtet. Solch einzelnen *Spots* darf jedoch keine Beachtung geschenkt werden. Teilweise konnten solche *Spots* nicht einmal einer Hefekolonie zugeordnet werden. Manchmal zeigte sich allerdings einige Tage später an genau dieser Stelle auf der Kulturplatte ein Schimmelpilz.

Zeigt ein *Library*-Molekül auch nach Plasmid-Isolierung und dessen Coexpression mit p27 in einem anderen Hefestamm mehrfach eine positive Reaktion und ist zudem das Testergebnis bei Coexpression mit der GAL 4 DNA-BD bzw. BD-Lamin C negativ, kann wohl von einer tatsächlich vorliegenden, eventuell sogar spezifischen Interaktion gesprochen werden. Für die synthetisch hergestellten Peptide von Klon 34, 35 und OTO 2001 konnten die positiven Y2H-Ergebnisse auch bei Untersuchungen in der NMR bestätigt werden. In der Zellkultur wurde bei diesen Klonen 9-17 % Zellregeneration beobachtet, wobei auch hier OTO 2001 den stärksten und Klon 35 den schwächsten Effekt zeigte. Klon 30 wurde aufgrund seiner Länge (104 AS) und Klon 73 aufgrund des nur schwachen Effekts in der Zellkultur bisher noch nicht getestet.

4.1.2 Identifizierung der an der Bindung beteiligten p27-Domäne

Um den Bereich von p27 zu identifizieren, an den die gefundenen Peptide binden, wurden die p27-Fragmente 1-50, 101-150 und 151-197 mit dem Peptid coexprimiert und im β -Galaktosidase *Assay* getestet. Die Fragmente 1-100 und 51-100 sollten auch getestet werden, zeigten aber eine starke Bindung an die GAL 4-AD, wobei Fragment 51-100 einen stärker positiven Effekt auslöste als Fragment 1-100. Der Bereich 1-50 scheint hier - wenn diese Aussage überhaupt gemacht werden darf - einen negativen Einfluss auf die Bindung auszuüben und auch p27 (1-197) zeigt dieses Bindeverhalten nicht.

Die isolierten Klone 30 und 34 binden eindeutig, Klon 35 eventuell an den aminoterminalen Bereich von p27, obwohl sie im *Screen* gegen den C-Terminus gefunden wurden. Klon 34 zeigt allerdings auch bei Coexpression mit Fragment 101-150 eine schwache Galaktosidase-Aktivität. Dieser 14 AS lange, basische Klon scheint demnach auch an dieses Fragment zu binden. Da das Peptid allerdings zu kurz ist, um eine solche Distanz zu überbrücken, muss davon ausgegangen werden, dass es entweder unabhängig an zwei völlig verschiedene eventuell saure Bereiche von p27 bindet oder aber die Bindung an zwei räumlich nahe gelegene Domänen stattfindet, die aber auf der Primärstruktur weit auseinander liegen. Bei Klon 30, der aufgrund einer *Frameshift*-Mutation mehr als 100 AS lang ist, besteht durchaus die Möglichkeit, dass das Peptid an einen größeren Abschnitt bindet. Der nur fünf AS lange Klon 35 (Stop-Signal innerhalb der 16er-Sequenz) dagegen findet vermutlich relativ schnell Sequenzen, die Homologien zu dem interagierenden p27-Abschnitt aufweisen. Klon 73 zeigt mit keinem der getesteten Fragmente ein positives Ergebnis. Eventuell bindet dieser Klon im Bereich 80-100, der auch im *Screen* getestet wurde, hier aber aufgrund der Bindung des Fragments 51-100 an die AD nicht überprüft werden konnte.

4.2 Diskussion der Y2H-Interaktionstests

4.2.1 Proteinexpression der Konstrukte

Die einzelnen Konstrukte werden sehr unterschiedlich stark exprimiert. Das als Kontrolle von Clontech mitgelieferte p53 wird so stark exprimiert, dass, trotz augenscheinlich stattfindendem Abbau, bei dem diverse kleinere Fragmente entstehen, eine dicke Bande bei etwa 50 kDa auf dem Western Blot (Abb. 3.2) zu erkennen ist. Diese Bande ist zwar etwa 19 kDa kleiner als erwartet, da aber bei 70 kDa keine Bande zu erkennen ist und p53 bei Coexpression mit SV 40 *large T antigen* einen stark positiven Effekt im β -Galaktosidase-Test zeigt, scheint es sich hierbei tatsächlich um die p53-Bande zu handeln.

p27 wird von diesem Hefestamm kaum exprimiert. Die Expression ist hier deutlich schlechter als in HF7c (Abb. 3.1). Vielleicht wurden die p27-exprimierenden Hefen bei diesem Gel aber auch nur zu einem etwas ungünstigeren Zeitpunkt geerntet und aufgeschlossen.

Die übrigen Konstrukte werden ebenfalls deutlich schwächer exprimiert als BD-p53. Bei Betrachtung dieser stark unterschiedlichen Expressionslevel wird deutlich, dass die Stärke der Reporteragenaktivierung keinesfalls als Maß für die Bindungsstärke dienen kann, da sowohl die Aktivierung eines Reportergens als auch die Bindungswahrscheinlichkeit zweier interagierender Moleküle von der Konzentration abhängen.

Bei der CDK 2-Expression treten zwei Banden zwischen der 35 und 47 kDa-Markerbande auf. Die erwartete Bande sollte bei etwa 49 kDa liegen und da die DNA sequenziert wurde, sollte auch das korrekte Protein in voller Länge hergestellt werden. Demnach scheint die obere Bande BD-CDK 2, die untere ein Abbauprodukt zu sein. Eigenartig ist nur, dass nicht noch weitere, kleinere Fragmente auftreten. Außerdem scheint diese zweite Bande direkt auf der Höhe von BD-p27 zu laufen. Da aber dieses Gel mehrfach und mit verschiedenen Proben angefertigt wurde, kann wohl eine zufällige Verunreinigung mit BD-p27 exprimierenden Hefen ausgeschlossen werden. Vielleicht bindet in Hefe aber auch ein zelleigenes Protein an CDK 2 und verhindert so den weiteren

Abbau zu kleineren Fragmenten. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die untere Bande BD-CDK 2 darstellt und die obere Bande eine glykosylierte oder nicht fertig prozessierte Form von CDK 2 ist. Mit Cyclin A verhält es sich ähnlich. Hier tritt zwar keine zusätzliche Bande auf, aber die vorliegende Bande läuft nicht wie erwartet bei etwa 64 kDa, sondern bei etwa 50 kDa. Da auch hier die DNA-Sequenz korrekt ist, sollte Cyclin A ebenfalls in voller Länge synthetisiert werden.

Eine letzte mögliche Erklärung für die Expression eventuell verkürzter Konstrukte könnte die unterschiedliche *Codon-Usage* von Säuger und Hefe sein. Da keines der Konstrukte auf die *Codon-Usage* von Hefe optimiert wurde, könnte auch ein tRNA-Engpass zu einem verfrühten Kettenabbruch führen.

Vielleicht laufen die BD-Fusionskonstrukte dieser Proteine aber, wie auch die stärkste BD-p53 Bande, einfach etwas niedriger als erwartet.

Um genaue Aussagen zu den tatsächlich vorliegenden Konstrukten machen zu können, hätten die Proteine sequenziert werden müssen. Da aber schon häufig mit diesen Zellzyklusproteinen in Hefe gearbeitet wurde, und es sich hierbei nur um die Reproduktion längst veröffentlichter Daten zum Zwecke der Etablierung des Y2H-Systems handelt, wurde auf eine Peptid-Sequenzierung verzichtet; zumal ja die eigentlich interessierende Komponente, p27, das erwartete Laufverhalten zeigt.

Die Expression von AD-p38 konnte leider nicht eindeutig nachgewiesen werden. Auf dem Blot (Abb. 3.3) ist zwar eine etwas stärkere Bande bei ca. 50 kDa zu sehen, da der sehr unspezifische Antikörper aber auch die Markerbanden detektiert, könnte es sich dabei auch um eine etwas stärker ausgeprägte Proteinbande handeln. p38 ist ein *Jab1*-Homolog, das in einem Y2H-Screen gegen den C-Terminus von p27^{Kip1} (Tomoda et al., 1999) gefunden wurde. Dieses Protein bindet in Säugerzellen an p27, zieht es aus dem Kern ins Cytosol und fördert so dessen Abbau.

4.2.2 Diskussion der Y2H-Interaktionsergebnisse

Die Zellzyklusproteine p27, CDK 2, Cyclin A sowie p38 und OTO 2001 wurden im Y2H-System auf Wechselwirkungen untersucht. Dabei zeigt BD-p27 bei Coexpression mit AD-OTO 2001 einen eindeutig positiven Effekt. Diese Probe wächst sowohl auf SD/-Leu/-Trp/-His- als auch auf SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade-Platten und zeigt im β -Galaktosidase-Test (v.a. in PJ69-2A/Y187, aber auch AH 109/Y187) zuverlässig über Nacht eine Blaufärbung. Das Ergebnis des α -Galaktosidase Assays (in AH109/Y187) kann leider nicht ausgewertet werden, da sowohl bei den coexpressierten GAL 4-Domänen als auch bei Coexpression von BD-p27 mit der GAL 4-AD ein deutlich positiver Effekt auftritt. Das liegt vermutlich u.a. an der Art der Durchführung dieser Tests. Eigentlich sollte die X- α -GAL-Lösung gleichmäßig auf der Agarplatte verteilt und anschließend die Hefen auf dieser Platte ausgestrichen werden. Da allerdings schon im β -Galaktosidase Assay die Interaktionen nur schwer nachzuweisen waren und der α -Galaktosidase Assay deutlich weniger sensitiv ist (Yeast Protocols Handbook, Clontech), wurden überhaupt keine positiven Resultate mehr erhalten. Daher wurde die X- α -GAL-Lösung direkt auf die gewachsenen Kolonien aufgetropft. Durch die hohe lokale Konzentration wird aber anscheinend die eventuell doch ganz schwache Bindung von p27 (1-197) an die GAL 4 AD detektiert (vgl. 4.1.2), die wohl im β -Galaktosidase Assay unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Werden bei der p27/OTO 2001-Probe AD und BD gegeneinander ausgetauscht, so kann das positive β -Galaktosidase-Ergebnis nicht bestätigt werden, was bedeutet, dass entweder keine spezifische Wechselwirkung vorliegt oder aber p27 durch die AD blockiert wird, was aufgrund der starken Bindung von p27-Fragment 1-100 bzw. 51-100 an die AD nicht abwegig erscheint. Das erklärt eventuell auch das Ausbleiben positiver Resultate bei Coexpression der BD-Konstrukte mit AD-p27. In dieser Konstellation zeigt nur Cyclin A einen eventuell schwach positiven Effekt.

Eine eindeutige Bindung von p27 an CDK 2 oder Cyclin A konnte im Y2H nicht nachgewiesen werden, obwohl p27, das ursprünglich in einem Y2H-Screen gegen Cyclin D1-CDK 4 entdeckt wurde, *in vitro* definitiv an CDK 2 bindet, Cyclin A allerdings nicht (Toyoshima and Hunter, 1994). Vielleicht ist auch nur die Bindung an den Cyclin A-CDK 2-Komplex stark genug, um im Y2H nachgewiesen zu werden. Andererseits könnte auch das oben schon angesprochene Vorliegen eventuell verkürzter CDK 2- bzw. Cyclin A-Moleküle für das Ausbleiben einer positiven Reaktion verantwortlich sein.

AD-p38 zeigt schon bei Coexpression mit der GAL 4 DNA-BD im β -Galaktosidase-Test ein positives Ergebnis. p38 bindet daher entweder an die DNA-BD, oder aber interagiert unspezifisch mit sehr vielen Proteinen (positives Ergebnis mit BD-Lamin C und -p27). Aussagen über eine Bindung an p27 oder Lamin C können daher in dem verwendeten Y2H-System nicht gemacht werden. Tomoda et al. (1999), die eine spezifische Bindung von p38 an p27 und dessen C-Terminus gezeigt haben arbeiteten mit pAS2 (*high expression, Ethanol-repressed*)/pACT (*medium expression, constitutiv*) in Y190 (Yeast Protocols Handbook, Clontech). In diesem System ist vielleicht der Hintergrund schwächer, sodass eine spezifische Interaktion von p27 mit p38 nachweisbar wird.

4.2.3 Identifizierung der an der Bindung beteiligten p27-Domäne

Auch bei diesen interagierenden Proteinen wurde die an der Interaktion beteiligte p27-Domäne identifiziert (vgl. 4.1.2). Dabei zeigt OTO 2001 eindeutig einen positiven Effekt mit dem p27-Fragment 1-50, nicht aber mit 80-197, 101-150 oder 151-197. Obwohl AD-p38 sowohl einen Effekt mit dem BD-Plasmid als auch mit BD-p27 und BD-Lamin C zeigt, scheint bei Coexpression mit den p27-Fragmenten diese eventuell unspezifische Interaktion nicht aufzutreten. Es sieht so aus als würden die kurzen Fragmente diesen Effekt unterbinden. Ein positiver Effekt wird bei Coexpression von AD-p38 mit den p27-Fragmenten nämlich nur mit p27 (101-150), nicht aber mit Fragment 80-197, 1-50 oder 151-197 beobachtet. Unter der Annahme, dass der positive Effekt bei Coexpression von

AD-p38 mit BD-p27 und BD-Lamin C eventuell doch auf eine spezifische Interaktion zurückgeführt werden kann und der eventuell unspezifische Effekt nur mit der reinen GAL 4 DNA-BD auftritt, würde p38 mit p27 (101-150) interagieren. Dieses Ergebnis korreliert mit den *in vitro* Bindungsstudien von Tomoda et al. (1999), wonach p38 an p27-Fragment 97-197 und 1-151, nicht jedoch an 1-102 bindet. Eine Bindung an p27 (97-197) konnte in dem hier verwendeten Y2H-System allerdings nicht bestätigt werden, obwohl p38 von Tomoda et al (1999) in einem *Screen* gegen dieses Fragment isoliert wurde.

Die eventuell vorliegende schwache Wechselwirkung von CDK 2 mit p27 (1-50) steht im Widerspruch zu der 1996 veröffentlichten Struktur des p27-CDK2 / Cyclin A-Komplexes (Russo et al., 1996). Entweder kann CDK 2 in Abwesenheit von Cyclin A tatsächlich schwach an diesen Bereich binden, oder aber es liegt, wenn überhaupt, eine unspezifische Wechselwirkung vor. Eigentlich bindet p27 an den CDK 2-Cyclin A-Komplex nämlich mit AS 50-93 an CDK 2 und mit AS 25-50 an Cyclin A.

4.3 Diskussion der mittels FRET detektierten Interaktionen

4.3.1 Cytosolische Expression der FRET-Fusionskonstrukte in dem Hefestamm INV Sc1

Die cytosolische Expression sämtlicher GFP-Spektralvarianten ist in Hefe, wie auch in vielen anderen Organismen problemlos möglich. Die GFPs werden auch in sehr hohen Konzentrationen von den Hefezellen toleriert, da sie keine toxische Wirkung entfalten und die Zellen auch sonst nicht zu stören scheinen. Die cytosolische Expression der Fusionskonstrukte mit den Zellzyklusproteinen p27, CDK 2 und Cyclin A sowie p38, Lamin C und OTO 2001 ist jedoch auch bei Verwendung induzierbarer Vektoren nur bedingt möglich. Außerdem scheinen die humanen Zellzyklusproteine auch in den Zellzyklus der Hefen einzugreifen.

Bei Lamin C, p27 und CDK 2 wird sechs bis acht Stunden nach der Induktion eine stabile, recht starke Expression beobachtet.

p27 liegt in der gesamten Zelle vor, wird aber im Kern angereichert. Da p27 eine interne Kernlokalisierungssequenz enthält (Tomoda et al., 1999), sollte es eigentlich vorwiegend im Kern vorliegen. Der hohe p27-Gehalt des Cytosols kann aber eventuell durch die Überexpression von p27 erklärt werden; dabei entsteht so viel p27, dass der Kern ‚überläuft‘. Weiterhin wird p27 an löslichen Ribosomen im Cytosol synthetisiert und erst anschließend in den Kern translociert, was ebenfalls eine gewisse p27-Menge im Cytosol rechtfertigt. Lamin C liegt vorwiegend im Cytosol vor, scheint aber auch ganz schwach im Kern angereichert zu werden.

Bei Überexpression von CDK 2 wird deutlich, dass die humanen Zellzyklusproteine einen starken Einfluss auf den Hefe-Zellzyklus ausüben. Die Hefen beginnen sich unter dem Einfluss von CDK 2 zu sprossen, scheinen dann aber nicht in der Lage zu sein, die Tochterzellen vollständig abzuschneiden. Außerdem vergessen diese Hefezellen offenbar, dass die Teilung noch nicht vollständig abgeschlossen ist und beginnen erneut zu sprossen. CDK 2 ist zwar normalerweise nur im Komplex mit einem Cyclin aktiv, da aber auch Hefen zelleigene Cycline besitzen, ist es wahrscheinlich, dass die Hefe-Cycline einen aktiven Komplex mit dem heterologen CDK 2 bilden. CDK 2 kann die Hefen in diesem Komplex offenbar zur vermehrten Zellteilung anregen, kann aber offensichtlich nicht alle zur Teilung erforderlichen Schritte einleiten und da CDK 2 vermutlich mit dem Hefe-CDK um die Hefe-Cycline konkurriert, liegen wahrscheinlich aufgrund der Überexpression mehr CDK 2/Cyclin-Komplexe vor als die zelleigenen. Daher überwiegen mit der Zeit die morphologisch veränderten Hefezellen.

Cyclin A, das auch bei Säugern nur temporär exprimiert wird, scheint bei cytosolischer Expression so schnell abgebaut zu werden, dass im Fluoreszenzmikroskop keine Expression zu sehen ist. Die Hefezellen wachsen allerdings etwa doppelt so schnell als gewöhnlich, was auf eine dennoch vorliegende Expression schließen lässt. Dabei scheint das heterologe Cyclin A einen Komplex mit Hefe-CDK zu bilden und die Zellteilung zu beschleunigen. Diese Zellen zeigen allerdings keine morphologi-

sche Veränderung, da hier die eigentlich aktive Komponente, das Hefe-CDK, wohl in der Lage ist, alle nötigen Schritte einzuleiten.

Die Expression von p38 und OTO 2001 gestaltet sich ebenfalls sehr schwierig, wobei OTO 2001 anscheinend cytosolisch exprimiert wird und sich vermutlich etwas im Kern anreichert. Eine eindeutige Aussage ist hier allerdings aufgrund der sehr schwachen Expression, die - da alle Proteine unter dem Einfluss des selben Promoters stehen - auf einen starken Abbau zurückzuführen ist, nur schwer möglich. p38 dagegen gelangt eindeutig in die Vakuole, füllt diese aber nicht ganz aus. Durch die endocytotische Aufnahme schnüren sich kleine, Cytosol-haltige ‚Blässchen‘ in das Innere der Vakuole hinein ab, deren Inhalt allmählich proteolytisch abgebaut wird. Nach 24-stündiger Induktion ist sowohl bei p38 als auch bei OTO 2001 kaum mehr eine Expression sichtbar. Das liegt eventuell daran, dass die Hefekultur nach dieser Zeit in der stationären Phase vorliegt und die Proteinexpression generell gedrosselt wird, wodurch auch der Einfluss des Plasmid-Promoters geringer wird.

4.3.2 Diskussion der Messergebnisse beider FRET-Systeme

Das Vorliegen eines Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers kann durch Bestimmung von Donorsignal-Quenching oder Akzeptorsignal-Verstärkung nachgewiesen werden (siehe 1.3.3). Da aber sowohl Donor als auch Akzeptor bei FRET-Einstellung durchstrahlen und es sich bei Donorsignal-Quenching und Akzeptorsignal-Verstärkung um gegenläufige Effekte handelt, ist eine korrekte Verteilung der bei FRET-Einstellung detektierten Fluoreszenz auf die beiden Effekte schwierig. Zudem kann bei vorliegendem Energietransfer die Donor-Fluoreszenz nicht bestimmt werden, denn auch bei Donor-Einstellung findet dann eine Energieübertragung vom angeregten Donor auf den Akzeptor statt, was bedeutet, dass ein zu geringes Donor-Signal gemessen wird. Näherungsweise kann aber wohl das Durchstrahlen der reduzierten Donor-Fluoreszenz bei FRET-Einstellung durch $D_f \times (F_d/D_d)$ ermittelt und damit auch der relative Akzeptorsignal-Zuwachs durch ET/A_a berechnet werden (siehe 3.2.4). Soll auch der Donor-Effekt mitberücksichtigt werden, so ist $F_{f_{ex}}/F_{f_{th}} = 1$

+ $\Delta_A/[A_f \times (F_a/A_a) + D_f \times (F_d/D_d)]$ die aussagekräftigste Größe.

Für die Kalibrierung der FRET-Systeme wurden drei Linker-Konstrukte verwendet, mit deren Hilfe die Randbereiche sowie das D/A-Verhältnis definiert werden. Als Positiv-Kontrolle dient ein durch drei Glycin-Reste flexibel verknüpftes FRET-Paar, das im CY-System zu einem Akzeptor-signal-Zuwachs von 46% bzw. einem $F_{f_{ex}}/F_{f_{th}}$ von 3,63 führt. Im BG-System ruft sie allerdings nur einen Effekt von 16% und 2,05 hervor. Die über 30 Prolin-Reste verbundenen FRET-Paare sollten eigentlich als absolute Negativ-Kontrolle dienen. Dreißig Prolin-Reste bilden nämlich laut Strukturvorhersage eine starre U-Form. Untersuchungen von Stryer (1967) zeigen, dass bei Verknüpfung über $n = 1-12$ Prolin-Reste die FRET-Effizienz ($n = 1$: ca. 100%) mit zunehmendem n allmählich gegen Null strebt ($n = 12$: ca. 10%; 46 Å). Bei dem von ihm verwendeten Chromophoren-Paar liegt schon bei einer Distanz von 34,6 Å nur noch 50% Energietransfer vor. Stryer verwendete für diese Versuche allerdings zwei geeignete Chromophore, die chemisch an die Prolin-Kette geknüpft waren. Bei den GFP-Molekülen dagegen sitzt das Chromophor in einem Protein, das über flexible Aminosäuren mit der Prolin-Kette verbunden und zudem groß gegenüber der eigentlichen fluorophoren Gruppe ist. Dadurch kommen sich die Chromophore in diesen Fall vermutlich sehr viel näher als bei dem von Stryer beschriebenen System und durch die kovalente Bindung erhöht sich auch hier die Wahrscheinlichkeit eines Energietransfers. Daher liegt bei diesen Proben in beiden Systemen mit 13,8% ein deutlich positiver Effekt vor. Bei Coexpression der FRET-Partner (nicht kovalent verbunden) tritt mit 2,3%, $F_{f_{ex}}/F_{f_{th}} = 1,12$ (CY-FRET) und 2,7%, $F_{f_{ex}}/F_{f_{th}} = 1,22$ (BG-FRET) auch noch ein schwacher Energietransfer auf, der aber vermutlich auf eine räumliche Annäherung aufgrund des sehr hohen Expressionsniveaus der reinen Spektralvarianten zurückzuführen ist.

Eine eindeutige Aussage erlauben in beiden FRET-Systemen nur die Lamin C-, CDK 2- und p27-Proben, die bei ET/Aa und $F_{f_{ex}}/F_{f_{th}}$ übereinstimmende Ergebnisse liefern. Demnach interagiert p27 schwach mit CDK 2 (CY: 6,8%, 1,37; BG: 8,5, 1,58), nicht aber mit der reinen Spektralvariante (CY: 2,8%, 1,11; BG: 4,7, 1,35). Bei Coexpression von CDK 2 mit Lamin C (CY: 0,6%, 1,03; BG: 0,5%, 1,04) bzw. mit der reinen

Spektralvariante (CY: 2,3%, 1,09; BG: 2,8%, 1,18) liegt ebenfalls, wie erwartet, ein negatives Ergebnis vor. Es scheint sich bei der p27/CDK 2-Bindung demnach tatsächlich um eine, wenn auch schwache, spezifische Wechselwirkung zu handeln.

Aussagen zu p38 und OTO 2001 sind aufgrund der sehr schwachen Expression nur schwer zu machen. Hier liegen auch häufig widersprüchliche Ergebnisse vor. Es scheint allerdings als könne beim Vergleich mit geeigneten Kontrollen im BG-System eine Wechselwirkung von OTO 2001 mit p27 gezeigt werden ($Ff_{\text{ex}}/Ff_{\text{th}} = 1,39$; Kontrolle: 1,15). An CDK 2 scheint dieses Peptid jedoch nicht zu binden ($Ff_{\text{ex}}/Ff_{\text{th}} = 1,12$; Kontrolle: 1,15) und auch im CY-System scheint dieser Effekt unter der Nachweisgrenze zu liegen, was aber auch durchaus der Fall sein kann. Das CFP/YFP-Paar scheint einfach einen etwas kleineren Förster-Radius zu besitzen als das BFP/GFP-Paar, was bedeutet, dass im BG-System Interaktionen, die im CY-System zu schwach sind, noch nachgewiesen werden können.

Bei Betrachtung der p38-Expression fällt auf, dass dieses Protein bei Coexpression mit p27 im BG-System etwa achtmal stärker exprimiert wird als bei Coexpression mit der reinen Spektralvariante. Allerdings scheint auch Lamin C p38 etwas zu stabilisieren. Diese Beobachtungen können auch, allerdings nicht so stark ausgeprägt, im CY-System gemacht werden. p38 scheint demnach an p27 zu binden, wodurch sich der Transport in die Vakuole und damit auch der Abbau verzögert.

4.4 Vergleich von Y2H mit der FRET-Methode

Die in dieser Arbeit beschriebene FRET-Methode kombiniert die Vorteile der Y2H-Methode mit dem *High Throughput Screening* (HTS)-tauglichen Bindungsnachweis durch Fluoreszenzdetektion. Bei dieser Methode werden die Bindungsstudien, wie auch beim Y2H, in einem eukaryontischen Expressionssystem durchgeführt, was bedeutet, dass die Proteine ähnlich wie in Säugerzellen posttranslational modifiziert werden. Im Gegensatz zu den empfindlichen Säugerzellen ist der Umgang mit Hefen aber sehr unkompliziert und verursacht deutlich geringere Kosten. Außerdem können Hefen ähnlich wie Bakterien dauerhaft zirkuläre DNA-Moleküle aufnehmen (Selektionsdruck durch Nährstoffmangel), wohingegen Säugerzellen i.a. ohne größeren Aufwand nur transient transfiziert werden können. Weiterhin sind die Generationszeiten bei Hefe (,Teilung' alle 2-3 h) wesentlich kürzer als bei Säugerzellen, was einen entscheidenden Zeitvorteil bringt.

Beim Vergleich der Y2H-Ergebnisse mit den Ergebnissen des FRET-Systems fällt auf, dass keine exakte Übereinstimmung vorliegt. So konnte z.B. mittels FRET die Interaktion von p27 mit CDK 2 eindeutig nachgewiesen werden, was im Y2H nicht gelang. Der Bindungsnachweis durch FRET scheint demnach etwas sensitiver zu sein und korreliert auch besser mit den Ergebnissen der NMR-Abteilung.

Ein entscheidender Vorteil der FRET-Methode ist aber die Möglichkeit der visuellen Überprüfung der Proteinexpression, was bedeutet, dass bei exakt den Zellen, die vermessen werden sollen, die augenblicklich vorliegende Proteinmenge ermittelt werden kann. Bei der Y2H-Methode ist das nicht möglich. Ein negatives Ergebnis im Y2H kann demnach eventuell auch an einer zur Testzeit zu geringen Expression liegen, was vor allem bei temporär exprimierten Proteinen wie z.B. Cyclin A, das zu bestimmten Zeitpunkten u.a. verstärkt abgebaut wird, problematisch werden kann. Aus diesem Grund sind auch quantitative Bestimmungen der Galaktosidase-Aktivität, die u.a. von der Expressionsstärke der Interaktionspartner abhängt, nicht sehr aussagekräftig. Das FRET-System lässt quantitative Aussagen aufgrund sterischer Effekte (siehe unten) zwar ebenfalls nur bedingt zu, aber hier wird die Expression zur Testzeit

grundsätzlich ermittelt und im Gegensatz zum Y2H wird in diesem System die Interaktion direkt und nicht indirekt durch Transkriptionsaktivierung von Reporter genen nachgewiesen. Das bedeutet, dass in diesem System zumindest vergleichende Aussagen über die Bindungsstärken verschiedener Interaktionspartner gemacht werden können. Werden außerdem geeignete Konstrukte hergestellt, die auch eine Beurteilung des vorliegenden sterischen Effekts (ET abhängig von Orientierung der Chromophore zueinander) zulassen, so können wohl recht zuverlässige Aussagen gemacht werden (Yang and Söll, 1974). Solange mit relativ kleinen Molekülen gearbeitet wird und eventuell sogar flexible Linker (z.B. Poly-Glycin) verwendet werden, sollte sich der Einfluss sterischer Effekte allerdings in Grenzen halten.

Das Y2H-System eignet sich u.a. wegen der zum Teil sehr schlechten Reproduzierbarkeit aufgrund von Expressionsschwankungen und der nur indirekten Detektion der Interaktion weniger zum Vergleich von Bindungsstärken, eine ja/nein-Aussage ist allerdings grundsätzlich möglich. Das bedeutet, dass das Y2H-System durchaus für das Wirkstoff-*Screening* geeignet ist. Als HTS-Methode eignet sich das Y2H allerdings weniger, da die Detektion der Interaktion durch aufwendige Filter-*Assays* erfolgt, die nur schwer automatisierbar sind. Mittlerweile sind allerdings diverse neue Y2H-Systeme erhältlich und die rasante Entwicklung auf diesem Sektor ermöglicht eventuell in Kürze auch automatisierbare Y2H-Testsysteme. Das FRET-System ist grundsätzlich sehr gut als HTS-Methode geeignet, da hier eine Fluoreszenzdetektion der Interaktion erfolgt. Bei einem *Screen* können die Zellen demnach in einem FACS auf einen positiven FRET-Effekt hin untersucht und gleichzeitig selektiert werden.

Grundsätzlich bietet die FRET-Methode gegenüber Methoden, die wie das Y2H auf einer Detektion der Interaktion mittels Reporter gen-Aktivierung basieren, einen weiteren Vorteil. Durch die direkte Detektion der Interaktion wird ein Transport der Hybridproteine in den Kern unnötig, was bedeutet, dass auch eine Untersuchung von Proteinen, die nur schwer in den Kern transportiert werden können oder gar eine Autoaktivierung der Reporter gene hervorrufen, in diesem System möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit hat sich allerdings gezeigt, dass gerade diese cyto-

solische Expression bei einigen Proteinen (OTO 2001, p38, Cyclin A) Probleme macht. Allerdings wurde hier fast ausschließlich mit Zellzyklusproteinen gearbeitet, die im Säugersystem zum Teil nur temporär exprimiert werden (z.B. Cyclin). Eine Überexpression dieser Proteine in dem eukaryontischen Hefesystem scheinen die Hefen durch verstärkten Abbau in der Vakuole zu verhindern. Bei stabil exprimierten Proteinen tritt dieses Problem aber eventuell nicht auf. Sollte die cytosolische Expression in Hefe aber generell schwierig sein, können die Hybridproteine auch mittels Myristinsäure in der Membran verankert und damit deren Transport in die Vakuole oder andere Zellkompartimente verhindert werden (Stratagene). Sollten auch dann noch Expressionsprobleme auftreten, ist auch bei diesem System eine Expression im Zellkern möglich (vgl. Y2H). Der Vorteil gegenüber der Y2H-Methode wäre auch dann noch der direkte Bindungsnachweis und die HTS-Tauglichkeit aufgrund Fluoreszenzdetektion.

Abschließend kann vielleicht gesagt werden, dass beide Systeme durchaus zum *Screenen* großer Substanzbibliotheken geeignet, evtl. sogar HTS-tauglich sind, aber noch ausgiebiger Optimierung und Entwicklung bedürfen. Außerdem ist für das Arbeiten mit beiden Systemen einiges an Erfahrung nötig.

4.5 Ausblick

Um den Sinn und Zweck dieser Arbeit abschließend noch einmal zu verdeutlichen, soll hier die Bedeutung von *High Throughput Screening* (HTS)-Technologien für die Arzneimittelentwicklung kurz dargestellt werden.

Soll ein Medikament einen ganz bestimmten Effekt auslösen, so muss zunächst das Zielmolekül, das dafür beeinflusst werden muss, identifiziert, isoliert und gegebenenfalls näher charakterisiert werden. Häufig handelt es sich dabei, wie auch bei dieser Arbeit, um Moleküle, die in den Zellzyklus eingreifen. Durch Blockierung von Molekülen, die die Zellteilung unterdrücken, versuchen Wissenschaftler schon seit langem, Zellen gezielt zu kontrollierter Regeneration anzuregen, um dadurch Zellen, die aufgrund schädlicher Einflüsse oder wegen ihres fortgeschrit-

tenen Alters abgestorben sind, zu erneuern. So hat sich z.B. die Firma Otogene AG, bei der diese Arbeit erstellt wurde, das Ziel gesetzt, Hörschäden durch Regeneration bestimmter Zellen im Innenohr zu heilen. Auch bei der Therapie vieler Erkrankungen werden Stoffwechselwege durch gezieltes Blockieren einzelner Enzyme unterbrochen und dadurch Krankheitssymptome, wie z.B. Fieber, gemildert oder gar schwerwiegende Folgeschäden chronischer Erkrankungen verhindert.

Ist das Zielmolekül, u.a. Enzyme, Ionenkanäle, Zellzyklusregulatoren, erst einmal bekannt, wird verstärkt nach Substanzen gesucht, die dieses Molekül positiv oder negativ beeinflussen. Und an genau dieser Stelle der Arzneimittelentwicklung kommen *Screening*-Technologien zum Einsatz. Mit Hilfe dieser Technologien können riesige Substanzbibliotheken, möglichst in automatisierten Tests, innerhalb kürzester Zeit auf eine potentielle Wirkung hin untersucht werden. Dafür werden sowohl *in vitro* Testsysteme als auch zelluläre *Assays* verwendet. Die dabei gefundenen potentiellen Wirksubstanzen werden anschließend optimiert, ausgiebig getestet und eventuell später als Arzneimittelwirkstoff zugelassen.

So sollten z.B. im Rahmen dieser Arbeit Peptide identifiziert werden, die an p27 binden und damit die Blockade des Cyclin A/CDK 2-Komplexes verhindern, was Zellregeneration hervorruft. Bei der hierbei für die Wirkstoffsuche verwendeten *Yeast Two Hybrid* Methode werden Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen in Hefezellen mittels einer Farb-reaktion nachgewiesen. Da das *Screenen* mit diesem Testsystem jedoch nur schwer automatisiert werden kann und die enzymatischen Tests sehr zeitraubend sind, wurde parallel dazu an der Entwicklung eines Hefesystems gearbeitet, bei dem ein Nachweis der Wechselwirkung durch ein optisches Signal (Emission von Fluoreszenzlicht) erfolgen kann. Bei dieser neuen, verbesserten Methode kann die Selektion positiver Hefezellen in einem FACS-Gerät erfolgen, wodurch sowohl Materialkosten als auch Arbeitszeit eingespart werden. Die Wirtschaftlichkeit des Hefe-*Screenings* wird dadurch entscheidend erhöht, was bedeutet, dass in Zukunft wohl auch bei der Wirkstoffsuche im Großmaßstab die Vorteile dieses eukaryontischen Systems, die unter 4.4 schon ausgiebig diskutiert wurden, genutzt werden können.

5 Zusammenfassung

Für die Wirkstoffsuche bedient sich die pharmazeutische Industrie vor allem sogenannter *High Throughput Screening* (HTS) Methoden, bei denen die Interaktion meist durch ein Fluoreszenz-Signal (v.a. Luciferase als Reporter) detektiert wird. Die Entwicklung neuer HTS-tauglicher Systeme ist deshalb von großer Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ausgehend von der *Yeast Two Hybrid* (Y2H) Methode ein HTS-taugliches System, das den Nachweis von Protein-Protein Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* mittels Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) erlaubt, entwickelt und mit der Y2H-Methode verglichen werden. Parallel dazu sollten mittels Y2H-Screening Bindungspartner für p27 identifiziert und isoliert werden. Diese Bindungspartner sollen im Innenohr an p27 binden und damit verhindern, dass p27 den aktiven CDK 2/Cyclin A-Komplex blockiert, wodurch der Zellarrest aufgehoben und eine Regeneration bestimmter Zellen ermöglicht werden soll.

Beim Y2H-Screen einer *Random Peptide Library* mit mehr als 1×10^7 unabhängigen Klonen gegen p27 bzw. p27 (80-197) wurden vier vielversprechende Kandidaten isoliert, die fast alle, wie auch OTO 2001, an den aminoterminalen Bereich von p27 binden und in der Zellkultur wie erwartet Zellregeneration hervorrufen.

Durch FRET-Detektion wurden Bindungsdaten von p27, CDK 2, Cyclin A, p38, OTO 2001 ermittelt, die teilweise mit den Y2H-Daten übereinstimmen, wobei der Bindungsnachweis mittels FRET sensitiver zu sein scheint und besser mit den Ergebnissen der NMR-Abteilung korreliert. Momentan scheitert diese Methode allerdings noch an der stark unterschiedlichen Verfügbarkeit verschiedener Proteine bei cytosolischer Expression. Die Firma Stratagene vertreibt allerdings ein Y2H-System bei dem die Expression ebenfalls cytosolisch erfolgt. Dabei wird der Transport in Zellkompartimente durch eine Verankerung in der Plasmamembran mittels Myristinsäure unterbunden. Eventuell könnte so auch die Expression problematischer Proteine verbessert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre auch eine Expression im Zellkern. Es könnten dann zwar wie im gewöhnlichen Y2H-System keine Membranproteine untersucht werden, aber der Zeitvorteil (FACS) und die HTS-Tauglichkeit aufgrund der Fluoreszenz-Detektion blieben dennoch bestehen. Zudem wird die Interaktion hier direkt und nicht indirekt durch Reporteraktivierung detektiert, was erstmals vergleichende Aussagen über Bindungsstärken in einem zellulären System erlaubt.

Das Hefe-FRET-System scheint eine vielversprechende HTS-Methode zu sein, bedarf allerdings noch ausgiebiger Optimierung und Testung.

6 Literatur

Adams, S.R., Harootunian, A.T., Buechler, Y.J., Taylor, S.S., and Tsien, R.Y. (1991) **Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells.** *Nature* **349**, 694-697

Amsterdam, A., Lin, S., Moss, L., and Hopkins, N. (1996) **Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos.** *Gene* **173**, 99-103

Bartel, P.L., Chien, C.-T., Sternglanz, R., and Fields, S. (1993) **Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions.** In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach.*, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp. 153-179

Beck, E., and Zink, B. (1981) **Nucleotide sequence and genome organization of filamentous bacteriophages ϕ 1 and ϕ d.** *Gene* **16**, 35-58

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** *Nucleic Acids Res.* **7** (6), 1513-1523

Bokman, S.H., and Ward, W.W. (1981) **Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**, 1372-1380

Breeden, L., and Nasmyth, K. (1985) **Regulation of the Yeast HO Gene.** *Cold Spring Harbor Symposium Quant. Biol.* **50**, 643-650

Brent, R., and Ptashne, M. (1985) **A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor.** *Cell* **43**, 729-736

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., and Short, J.M. (1987) **A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection.** *BioTechniques* **5**, 376-379

Casper, S.J., and Holt, C.A. (1996) **Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector.** *Gene* **173**, 69-73

Chalfie, M. (1995) **Green fluorescent protein.** *Photochem. Photobiol.* **62**, 651-656

Chalfie, M., and Kain, S. *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols.* New York: A John Wiley and Sons, Inc., Publication

- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994) **Green fluorescent protein as a marker for gene expression.** *Science* **263**, 802-805
- Chien, C.-T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991) **The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9578-9582
- Clegg, R.M. (1995) **Fluorescence resonance energy transfer.** *Curr. Op. Biotechnol.* **6**, 103-110
- CLONTECH Matchmaker GAL 4 Two-Hybrid User Manual (PT 3061-1)
- CLONTECH Matchmaker GAL 4 Two-Hybrid System 3 and Libraries User Manual (PT 3247-1)
- CLONTECH Matchmaker Lex A Two-Hybrid System and Matchmaker Lex A Libraries User Manual (PT 3040-1)
- CLONTECH Yeast Protocols Handbook (PT 3024-1)
- Coats, S., Flannagan, W.M., Nourse, J., and Roberts, J. (1996) **Requirement of p27^{Kip1} for restriction point control of the fibroblast cell cycle.** *Science* **272 (5263)**, 877-880
- Cody, C.W., Huang, P.C., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., and Ward, W.W. (1993) **Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein.** *Biochemistry* **32 (5)**, 1212-1218
- Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A.R., Falkow, S., and Brown, A.J.P. (1997) **Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*.** *Microbiology* **143**, 303-311
- Coleman, T.R., and Dunphy, W.G. (1994) **Cdc2 regulatory factors.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 877-882
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996) **FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).** *Gene* **173**, 33-38
- Corbalan-Garcia, S., Teruel, J.A., and Gomez-Fernandez, J.C. (1993) **Intramolecular distances within the Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum as estimated through fluorescence energy transfer between probes.** *Eur. J. Biochem.* **217**, 737-744
- Cramer, A., Whitehorn, E.A., Tate, E., and Stemmer, W.P.C. (1996) **Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling.** *Nature Biotechnol.* **14**, 315-319

- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A., and Tsien, R.Y. (1995) **Understanding, improving and using green fluorescent proteins.** *TIBS* **20**, 448-455
- Debondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., and Kim, S.H. (1993) **Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2.** *Nature* **363**, 595-602
- De Caprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.-Y., Huang, C.-M., Lee, W.-H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1988) **SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene.** *Cell* **54**, 275-283
- De Giorgi, F., Brini, M., Bastianutto, C., Marsault, R., Montero, M., Pizzo, P., Rossi, R., and Rizzuto, R. (1996) **Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles.** *Gene* **173**, 113-117
- Dopf, J., and Horiagon, T.M. (1996) **Deletion mapping of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.** *Gene* **173**, 39-44
- Ehrig, T., O’Kane, D.J., and Prendergast, F.G. (1995) **Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra.** *FEBS Letters* **367**, 163-166
- Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddel, C.J., and Beach, D. (1994) **Construction of an improved host strain for two hybrid screening.** *Nucleic Acids Res.* **22**, 1502-1503
- Fields, S., and Song, O. (1989) **A novel genetic system to detect protein-protein interactions.** *Nature* **340**, 245-246
- Fields, S., and Sternglanz, R. (1994) **The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions.** *Trends in Genetics* **10** (8), 286-292
- Firpo, E., Koff, A., Solomon, M., and Roberts, J. (1994) **Inactivation of a Cdk2 inhibitor during IL-2 induced proliferation of human T-lymphocytes.** *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4889-4901
- Förster, T. (1946) **Energiewanderung und Fluoreszenz.** *Die Naturwissenschaften* **6**, 166-175
- Förster, T. (1948) **Intermolecular energy migration and fluorescence.** *Ann. Phys. (Leipzig)* **2**, 55-75
- Förster, T. (1949) **Experimentelle und theoretische Untersuchung des zwischenmolekularen Übergangs von Elektronenanregungsenergie.** *Z. Naturforschg.* **4a**, 321-327
- Frost, L.S. (1993) **Conjugative pili and pilus-specific phages.** In “Bacterial Conjugation” (D.B. Clewell, ed.), pp. 189-221. Plenum, New York

- Gazit, E., and Shai, Y. (1993) **Structural characterization, membrane interactions, and specific assembly within phospholipid membranes of hydrophobic segments from *Bacillus thuringiensis* var. *isrealensis* cytolytic toxin.** *Biochemistry* **32**, 12363-12371
- Gordon, G.W., Berry, G., Liang, X.H., Levine, B., and Herman, B. (1998) **Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy.** *Biophys. J.* **74**, 2702-2713
- Hanahan, D. (1985) **Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes.** *Nature* **315 (6015)**, 115-122
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993) **The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G 1 cyclin-dependent kinases.** *Cell* **75**, 805-816
- Harlow, E., and Lane, D. (1998) *Antibodies*. Cold Spring Harbor Laboratory
- Heim, R., Cubitt, A.B., and Tsien, R.Y. (1995) **Improved green fluorescence.** *Nature* **373**, 663-664
- Heim, R., Prasher, D.C., and Tsien, R.Y. (1994) **Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12501-12504
- Heim, R., and Tsien, R.Y. (1996) **Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer.** *Curr. Biol.* **6**, 178-182
- Heslot, H., and Gaillardin, C., eds. (1992) **Molecular Biology and Genetic Engineering of Yeasts** (CRC Press, Inc.)
- Hill, D.F., and Petersen, G.B. (1982) **Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ 1 DNA.** *J. Virol.* **44**, 32-46
- Ippen-Ihler, K., and Maneewanekul, S. (1991) **Conjugation among enteric bacteria: Mating systems dependent on expression of pili.** In "Microbial cell-cell Interactions" (M. Dworkin, ed.), pp. 35-69. American Society for Microbiology, Washington, DC
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996) **Genomic libraries and host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast.** *Genetics* **144**, 1425-1436
- Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1995) **Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2.** *Nature* **376**, 313-320

- Johnston, M. (1987) **A model fungal gene regulatory mechanisms the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiol.Rev.* **51** (4), 458-476
- Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R. (1963) **Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*.** *J. Cell. Comp. Physiol.* **60**, 85-104
- Kahana, J., Schapp, B., and Silver, P. (1995) **Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9707-9711
- Keegan, L., Gill, G., and Ptashne, M. (1986) **Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein.** *Science* **231**, 699-704
- Kimata, Y., Iwaki, M., Lim, C.R., and Kohno, K. (1997) **A Novel Mutation Which Enhances the Fluorescence of Green Fluorescent Protein at High Temperatures.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 69-73
- Kubitscheck, U., Kircheis, M., Schweitzer-Stenner, R., Arndt-Jovin, D.J., Jovin, T.M., and Pecht, I. (1993) **Distribution of type I Fc ϵ -receptors on the surface of mast cells probed by fluorescence resonance energy transfer.** *Biophys. J.* **64**, 110-120
- Kubitscheck, U., Kircheis, M., Schweitzer-Stenner, R., Dreybrodt, W., Jovin, T.M., and Pecht, I. (1991) **Fluorescence resonance energy transfer on single living cells.** *Biophys. J.* **60**, 307-318
- Lane, D.P., and Crawford, L.V. (1979) **T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.** *Nature* **278** (5701), 261-263
- Li, B., and Fields, S. (1993) **Identification of mutations in p53 that affects its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system.** *FASEB J.* **7**, 957-963
- Lossau, H., Kummer, A., Heinecke, R., Pöllinger-Dammer, F., Kompa, C., Bieser, G., Jonsson, T., Silva, C.M., Yang, M.M., Youvan, D.C., and Michel-Beyerle, M.E. (1996) **Time-resolved spectroscopy of wild-type and mutant Green Fluorescent Proteins reveals excited state deprotonation consistent with fluorophore-protein interactions.** *Chem. Phys.* **213**, 1-16
- Louret, O.F., Doignon, F., and Crouzet, M. (1997) **Stable DNA binding yeast vector allowing high bait expression for use in the two-hybrid system.** *BioTechniques* **23**, 816-819

- Ludin, B., Doll, T., Meili, R., Kaech, S., and Matus, A. (1996) **Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins.** *Gene* **173**, 107-111
- Ma, J., and Ptashne, M. (1987) **A new class of yeast transcriptional activators.** *Cell* **48**, 847-853
- Matsumura, I., and Ellington, A.D. (1996) **DNA shuffling brightens prospects for GFP.** *Nature Biotechnology* **14**, 366
- Mitra, R.D., Silva, C.M., and Youvan, D.C. (1996) **Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein.** *Gene* **173**, 13-17
- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., and Tsien, R.Y. (1999) **Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 2135-2140
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., Mc Caffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M., and Tsien, R.Y. (1997) **Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin.** *Nature* **388**, 882-887
- Morin, J.G., and Hastings, J.W. (1971) **Energy transfer in a bioluminescent system.** *J. Cell. Physiol.* **77**, 31-318
- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., and Winant, J. (1974) **Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*.** *Biochemistry* **13**, 2656-2662
- Nourse, J., Firpo, E., Flannagan, M., Meyerson, M., Polyak, K., Lee, M.-H., Massague, J., Crabtree, G., and Roberts, J. (1994) **IL-2 mediated elimination of the p27^{Kip1} cyclin-Cdk kinase inhibitor prevented by rapamycin.** *Nature* **372**, 570-573
- Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J. (1996) **Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein.** *Science* **273**, 1392-1395
- Pap, E.H.W., Bastiaens, P.I.H., Borst, J.W., van den Berg, P.A.W., van Hoek, A., Snoek, G.T., Wirtz, K.W.A., and Visser, A.J.W.G. (1993) **Quantitation of the interaction of protein kinase C with diacylglycerol and phosphoinositides by time-resolved detection of resonance energy transfer.** *Biochemistry* **32**, 13310-13317
- Pines, J. (1993) **Cyclins and cyclin-dependent kinases; take your partners.** *Trends Biochem. Sci.* **18**, 195-197
- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., and Cormier, M.J. (1992) **Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.** *Gene* **111**, 229-233

- Reed, S.I. (1992) **The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition.** *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**, 529-561
- Rizzuto, R., Brini, M., DeGiorgi, F., Rossi, R., and Heim, R. (1996) **Double labeling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants *in vivo*.** *Curr. Biol.* **6** (2), 183-188
- Roberts, C.J., Raymond, C.K., Yamashiro, C.T., and Stevens, T.H. (1991) **Methods for Studying the Yeast Vacuole.** In *Methods in Enzymology (194): Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, ed. Guthrie, C. and Fink, G.R. (Academic Press, Inc., San Diego) pp. 644-661
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massagué, J., and Pavletich, N.P. (1996) **Crystal structure of p27^{Kip1} cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk 2 complex.** *Nature* **382** (7), 325-331
- Sagot, I., Bonneu, M., Balguerie, A., and Aigle, M. (1999) **Imaging fluorescence resonance energy transfer between two green fluorescent proteins in living yeast.** *FEBS Lett.* **447** (1), 53-57
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995) **Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.** *Genes Dev.* **9**, 1149-1163
- Sherr, C.J. (1993) **Mammalian G1 cyclins.** *Cell* **73**, 1059-1065
- Shimomura, O., Johnson, F.H., and Saiga, Y. (1962) **Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*.** *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**, 223-239
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R., and Haseloff, J. (1996) **Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein.** *Curr. Biol.* **6**, 1653-1663
- Silve, S., Volland, C., Jund, R., Chevallerier, M.R., and Haguenaer-Tsapis, R. (1991) **Membrane insertion of uracil permease, a polytopic yeast plasma membrane protein.** *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1114-1124
- Solomon, M.J. (1993) **Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases.** *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 180-186
- Stryer, L. (1978) **Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler.** *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 819-846
- Stryer, L., and Haugland, R.P. (1967) **Energy transfer: a spectroscopic ruler.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 719-726
- Tomoda, K., Kubota, Y., and Kato, J. (1999) **Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27^{Kip1} is instigated by Jab 1.** *Nature* **398**, 160-165

- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994) **p27, a novel Inhibitor of G1 Cyclin-Cdk Protein Kinase Activity, Is Related to p21.** *Cell* **78**, 67-74
- Tron, L., Szollosi, J., Damjanovich, S., Helliwell, S.H., Arndt-Jovin, D.J., and Jovin, T.M. (1984) **Flow cytometric measurement of fluorescence resonance energy transfer on cell surfaces.** *Biophys. J.* **45**, 939-946
- Tsien, R.Y. (1998) **The green fluorescent protein.** *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509-544
- Van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A., and Wigler, M. (1993) **Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6213-6217
- Van Wezenbeek, P.M.G.F., Hulsebos, T.J.M., and Schoenmakers, J.G.G. (1980) **Nucleotide sequence of filamentous bacteriophage M13 DNA genome: Comparison with phage fd.** *Gene* **11**, 129-148
- Wachter, R.M., Elsliger, M.-A., Kallio, K., Hanson, G.T., and Remington, S.J. (1998) **Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein.** *Structure* **6**, 1267-1277
- Wang, S., and Hazelrigg, T. (1994) **Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis.** *Nature* **369**, 400-403
- Ward, W.W. (1979) **Energy transfer processes in bioluminescence.** In *Photochem. Photobiol. Rev.* **Vol. 4**, Smith, K., Ed., Plenum, New York 1-57
- Ward, W.W., Prentice, H.J., Roth, A.F., Cody, C.W., and Reeves, S.C. (1982) **Spectral perturbations of the *Aequorea* green-fluorescent protein.** *Photochem. Photobiol.* **35**, 803-808
- Willets, N.S., and Skurray, R. (1987) **Structure and function of the F factor and mechanism of conjugation.** In "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*" (F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger, eds.), pp. 1110-1133. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Xu, X., Gerard, A.L.V., Huang, B.C.B., Anderson, D.C., Payan, D.G., and Luo, Y. (1998) **Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer.** *Nucl. Acids Res.* **26 (8)**, 2034-2035
- Yang, C.H., and Söll, D. (1974) **Studies of transfer RNA tertiary structure of singlet-singlet energy transfer.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71 (7)**, 2838-2842

Yang, F., Moss, L.G., and Phillips, G.N., Jr. (1996 a) **The molecular structure of green fluorescent protein.** *Nature Biotechnol.* **14**, 1246-1251

Yang, T.-T., Kain, S.R., Kitts, P., Kondepudi, A., Yang, M.M., and Youvan, D.C. (1996 b) **Dual color microscopic imagery of cells expressing the green fluorescent protein and a red-shifted variant.** *Gene* **173**, 19-23

Zerniacka-Goetz, M., Pines, J., Hunter, S.McL., Dixon, J.P.C., Siemering, K.R., Haseloff, J., and Evans, M.J. (1997) **Following cell fate in the living mouse embryo.** *Development* **124**, 1133-1137

7 Anhang

GFP-Mutationsprimer:

Name	Sequenz	Kommentar
YEGFP 3 203Y 5'	TAC TTA TCC <u>TAT CAA TCT GCC</u> <u>TTA TCC AAA</u>	AS 203 <u>überlappender Bereich</u>
YEGFP 3 203Y 3'	GGC AGA TTG <u>ATA GGA TAA</u> <u>GTA ATG GTT GTC</u>	AS 203 <u>überlappender Bereich</u>
YEGFP 3 64L 65T 66H 5'	ACT ACT <u>TTG ACT CAT GGT GTT</u> <u>CAA TGT TTT G</u>	AS 64 – 66 <u>überlappender Bereich</u>
YEGFP 3 64L 65T 66H 3'	AAC ACC <u>ATG AGT CAA AGT</u> <u>AGT GAC TAA GGT T</u>	AS 64 – 66 <u>überlappender Bereich</u>
YEGFP 3 145F 5'	GAA TAC AAC <u>TTT AAC TCT CAC</u> <u>AAT GTT TA</u>	AS 145 <u>überlappender Bereich</u>
YEGFP 3 145F 3'	GTG AGA GTT <u>AAA GTT GTA TTC</u> <u>CAA TTT GT</u>	AS 145 <u>überlappender Bereich</u>
YCFP 64L 65T 66W	ACT ACT <u>TTG ACT TGG GGT GTT</u> <u>CAA TGT TTT GCG</u>	AS 64 – 66 <u>überlappender Bereich</u>
YCFP 64L 65T 66W 3'	ACC <u>CCA AGT CAA AGT AGT</u> <u>GAC TAA GGT T</u>	AS 64 – 66 <u>überlappender Bereich</u>
YCFP 146I 153T	<u>ATT TCT CAC AAT GTT TAC ATC</u> <u>ACT GCT GAC AAA CAA AAG</u> <u>AAT</u>	AS 146,153 <u>überlappender Bereich</u>
YCFP 146I 153T 3'	<u>AGT GAT GTA AAC ATT GTG</u> <u>AGA AAT ATA GTT GTA TTC CAA</u> <u>TT</u>	AS 146,153 <u>überlappender Bereich</u>
YCFP 163A	GGT ATC AAA <u>GCT AAC TTC</u> <u>AAA ATT AGA CA</u>	AS 163 <u>überlappender Bereich</u>
YCFP 163A 3'	GAA GTT <u>AGC TTT GAT ACC ATT</u> <u>CTT TT</u>	AS 163 <u>überlappender Bereich</u>
YCFP 212K	GAT CCA AAA <u>GAA AAG AGA</u> <u>GAC CAC ATG</u>	AS 212 <u>überlappender Bereich</u>
YCFP 212K 3'	TCT CTT TTC <u>TTT TGG ATC TTT</u> <u>GGA TAA G</u>	AS 212 <u>überlappender Bereich</u>

GFP-Randprimer:

Name	Sequenz	Kommentar
5'-Primer:		
pYES 2-YEGFP 3'	CTC GGA TCC ATG TCT AAA GGT GAA GAA	Bam HI / ATG
YGFP / Hind III / ATG 5'	GGT AAG CTT ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTA	Hind III / ATG
YGFP-HIS Tag	ACT CCA AGC TTT ATG <u>CAT CAT</u> <u>CAC CAT CAT CAC</u> TCT AAA GGT GAA GAA TTA TTC	Hind III / T ATG – 6xHis
YGFP / Eco RI / ATG 5'	TCT GAA TTC ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTA	Eco RI / ATG
3'-Primer:		
YGFP / Bam HI 3'	ATA GGG ATC CAC TTT GTA CAA TTC ATC CAT ACC	GT Bam HI
YGFP / Bam HI 3'	TTT GGA TCC TTT GTA CAA TTC ATC CAT	Bam HI
YGFP / Bam HI / TTA 3'	TTT GGA TCC TTA TTT GTA CAA TTC ATC CAT	Stop / Bam HI
YGFP / Eco RI 3'	TTT GAA TTC TTT GTA CAA TTC ATC CAT	Eco RI
pYES 2-YEGFP 3 Reversed	GCA GAA TTC CTA TTT GTA CAA TTC ATC CAT	Stop / Eco RI
YGFP / Pst I / TTA 3'	TTT CTG CAG TTA TTT GTA CAA TTC ATC CAT	Stop / Pst I

Linker für FRET:

Name	Sequenz	Kommentar
Eco RI / Poly Pro / Bam HI 5 → 3	AAT TCC CAC CAC CTC CAC CAC CTC CAC CAC CCC CAC CAC CTC CAC CAC CTC CAC CAC CCC CAC CAC CTC CAC CAC CTC CAC CAC CCC CAC CAC CTG	für Negativ- Kontrolle Eco RI – 30 x Pro – Bam HI
Bam HI / Poly Pro / Eco RI 3 → 5	GAT CCA GGT GGT GGG GGT GGT GGA GGT GGT GGA GGT GGT GGG GGT GGT GGA GGT GGT GGA GGT GGT GGG GGT GGT GGA GGT GGT GGA GGT GGT GGG	für Negativ- Kontrolle Bam HI – 30 x Pro – Eco RI
Eco RI LINK 5'	TCT GAA TTC TCT TCT ATG ACT GGT GG	Eco RI Linker-Abschnitt
LINK	GGT AGA GAT TTG TAC GAT GAT GAT GAT AAA GAT CCA CCA GCT GAA TTT ATG TCT AAA GGT GAA GAA TTA	Linker-Abschnitt
LINK reversed	ATC ATC GTA CAA ATC TCT ACC CAT TTG TTG ACC ACC AGT CAT AGA AGA TTT GTA CAA TTC ATC CAT ACC	Linker-Abschnitt
YGFP / Bam HI / 3 x Gly 3'	AAC GGG ATC CAC CAC CAC CTT TGT ACA ATT CAT CCA TAC C	3 x Gly Bam HI pYES2: Linker zwischen BFP/CFP und GFP/YFP

p38-Primer:

Name	Sequenz	Kommentar
5'-Primer:		
p38 / 1	TCT GAA TTC ATG GCG GCG TCC GGG AG	Eco RI / ATG
3'-Primer:		
p38 / 335 3'	TCT GGA TCC TTA AGA GAT GTT AAT TTG ATT AAA C	Stop / Bam HI

p27-Primer:

Name	Sequenz	Kommentar
5'-Primer:		
Eco RI p27 5'	TTC GAA TTC ATG TCA AAC GTG CGA GTG	Eco RI / ATG
p27 / 51 5'	GTC GAA TTC ATG GAC ATG GAA GAG GCG AG	Eco RI / ATG
p27 / 80 5'	TTC GAA TTC ATG GAG AAG GGC AGC TTG CC	Eco RI / ATG
p27 / 101 5'	GTC GAA TTC ATG GTG CCG GCG CAG GAG	Eco RI / ATG
p27 / 151 5'	GTC GAA TTC ATG ATA AGG AAG CGA CCT GCA	Eco RI / ATG
3'-Primer:		
p27 / 50 3'	GTC GGA TCC TTA TCT GCA GTG CTT CTC CAA	Stop / Bam HI
p27 / 100 3'	GTC GGA TCC TTA CTT GCA GGC ACC TTT GG	Stop / Bam HI
p27 / 150 3'	GTC GGA TCC TTA TCC TGC GCA TTC CTC CG	Stop / Bam HI
Bam HI p27 3'	CG GGA TCC TTA CGT TTG ACG TCT	Stop / Bam HI

CDK 2-Primer:

Name	Sequenz	Kommentar
5'-Primer:		
Eco RI CDK 2 5'	AAC GAA TTC ATG GAG AAC TTC CAA AAG GTG	Eco RI / ATG
3'-Primer:		
Bam HI CDK 2 3'	TCT GGA TCC CTA TCA GAG TCG AAG ATG GG	Stop / Bam HI

Cyclin A-Primer:

Name	Sequenz	Kommentar
5'-Primer:		
Eco RI Cyclin A 5'	AAC GAA TTC ATG TTG GGC AAC TCT GCG C	Eco RI / ATG
3'-Primer:		
Cyclin A Bam HI 3'	TCT GGA TCC TTA CAG ATT TAG TGT CTC TGG	Stop / Bam HI

Sequenzier-Primer:

Name	Sequenz	Kommentar
1. FRET:		
Chimäre 5'	ACT CCA AGC TTT ATG CAT	
Chimäre 3'	GCA GAA TTC CTA TTT GTA C	
LINK 5' Seq	TCT TCT ATG ACT GGT GGT CAA C	
LINK 3' Seq	TTC AGC TGG TGG ATC TTT ATC	
2. p21, p27, p38, CDK 2, Cyclin A,		
Cyclin A 100 5'	GTA AAC AGC CTG CGT TCA CC	bp 388-407
Cyclin A 350 3'	CAG CAA TAA CTG ATG GCA AAT A	bp 1176-1155
3. für bestimmte Vektoren:		
pGAD T7 rev	AGT ATA GTT ACA TAA AAG AAG GC	für pGADT7, pGADT7* ca. 100 bp nach MCS
pGBK T7 Seq	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC	ca. 60 bp vor MCS
pGBK T7 rev Seq	AAA TCA TAA GAA ATT CGC CCG G	ca. 100 bp nach MCS
Library 5' (pGAD GH)	ACC ACT ACA ATG GAT GAT GTA TAT	ca. 100 bp vor Bam HI- Schnittstelle
Library 3' (pGAD GH)	TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA	ca. 100 bp nach Eco RI- Schnittstelle
pYES 2	ACC TCT ATA CTT TAA CGT	ca. 100 bp vor Hind III- Schnittstelle
pYES 2 rev/Seq	GGG AGG GCG TGA ATG TAA G	ca. 100 bp nach MCS

Primer für Vektor-Mutationen:

Name	Sequenz	Kommentar
pGAD T7 Bam HI 5'	GAT ACG GGA TCC ATC GA	Bam HI ; Entfernung von Hind III (2280)
pGAD T7 Hind III Mut 3'	GTC CAA AGC AAC TGA ATA AGC CCT CGT AA	Entfernung von Hind III (2280); bp 2289-2261
pGAD T7 Hind III Mut 5'	TAT TCA GTT GCT TTG GAC TTC TTC GC	Entfernung von Hind III (2280); bp 2272-2297
pGAD T7 Afl I 3'	CGC CAA CTT AAG ACC ATG	Afl I ; Entfernung von Hind III (1319)
pGBK T7 Bst XI 5'	GAT ATC GTC CAA CTG CAT GG	Bst XI ; Entfernung von Hind III (6544)
pGBK T7 Hind III Mut 3'	CAT AAA ATG TAA AGA CTC GGG GCT CTC TTG CCT TC	Entfernung von Hind III (6544); bp 6558-6524
pGBK T7 Hind III Mut 5'	CCC GAG TCT TTA CAT TTT ATG TTA GCT GGT GG	Entfernung von Hind III (6544); bp 6538-6569
pGBK T7 Pvu I 3'	CCC GCA CCG ATC GCC C	Pvu I ; Entfernung von Hind III (6544)

meine akademischen Lehrer an der Universität Tübingen waren:

Prof. Dr. E. Bayer

Prof. Dr. P. Bohley

PD Dr. M. Duszenko

PD Dr. K.-U. Fröhlich

Prof. Dr. R. Gebhard

Prof. Dr. B. Hamprecht

Prof. Dr. G. Jung

Dr. H. Kalbacher

Prof. Dr. D. Mecke

Prof. Dr. H. Probst

Prof. Dr. J. P. Ruppertsberg

Prof. Dr. M. Schwarz

Prof. Dr. Dr. hc W. Voelter

Prof. Dr. U. Weser

Lebenslauf

Manuela Braun

* 13.11.1971 in Ammerbuch-Reusten

Schulbildung

1978-1982 Grundschule, Neustetten-Remmingsheim
1982-1991 Eugen-Bolz-Gymnasium, Rottenburg

Hochschulbildung

11/1991-08/1993 Studium der Chemie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
08/1993-05/1998 Studium der Biochemie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
08/1997-05/1998 Diplomarbeit bei Dr. Hubert Kalbacher am Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
„Cathepsin-Aktivitäten in professionell und fakultativ antigenpräsentierenden Zellen in Abhängigkeit von der MHC Klasse II-Expression“
04/1998-08/2000 Dissertation bei der Firma Otogene AG in Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. P. Ruppertsberg und Prof. Dr. D. Mecke von der Universität Tübingen
„Fluoreszenz-optimierte Detektion heterologer Protein-Protein Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* als Alternative zur Yeast Two Hybrid Methode“