

**Entwicklung modifizierter Zweihybrid-Systeme zur effizienten  
Untersuchung multipler Protein-Protein-Interaktionen unter  
Verwendung fluoreszenzaktivierter Zellsortierung  
am Beispiel des Humanen Cytomegalovirus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplombiologin Kristina Fahr  
geboren am 25. September 1973 in Sömmerda

Jena, Dezember 2001

Gutachter:

1. Herr Prof. C. P. Hollenberg, Universität Düsseldorf
2. Herr Prof. H. P. Saluz, HKI Jena
3. Herr Prof. F. Große, IMB Jena

Tag der Doktorprüfung: 08.03.2002

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.05.2002

**INHALTSVERZEICHNIS**

	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Das Zweihybrid-System in Hefe .....	2
1.1.1.	Verwendete Transkriptionsfaktoren .....	3
1.1.2.	Reportergene .....	4
1.1.3.	Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) .....	5
1.1.4.	Vor-und Nachteile des Zweihybrid-Systems .....	6
1.2.	Untersuchung von Genbanken hinsichtlich multipler Interaktionen und Erstellung von Protein-Interaktionskarten .....	8
1.3.	Das Humane Cytomegalovirus .....	9
1.4.	Zielstellung der Arbeit .....	11
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1.	Material .....	13
2.1.1.	Verwendete Stämme .....	13
2.1.1.1.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme .....	13
2.1.1.2.	<i>Escherichia coli</i> -Stämme .....	14
2.1.2.	Nukleinsäuren .....	14
2.1.2.1.	Plasmide .....	14
2.1.2.2.	Cosmide .....	16
2.1.2.3.	Synthetische Oligonukleotide .....	17
2.1.3.	Medien .....	19
2.1.3.1.	Medien zur Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> .....	19
2.1.3.2.	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	19
2.1.4.	Puffer und Lösungen .....	20
2.1.4.1.	Lösungen für Medien .....	20
2.1.4.2.	Lösungen für die Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	20
2.1.4.3.	Lösungen für die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	21
2.1.4.4.	Puffer zur Präparation von Plasmid-DNA und genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	21
2.1.4.5.	Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	21
2.1.4.6.	Puffer und Lösungen für die PCR .....	22
2.1.4.7.	Puffer und Lösungen für die Sequenzierung .....	22
2.1.4.8.	Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese .....	22
2.1.4.9.	Puffer und Lösungen für den $\beta$ -Galaktosidase-Test .....	22
2.1.4.10.	Weitere Puffer und Lösungen .....	22
2.1.5.	Kits, Chemikalien, Kleinmaterialien .....	23

2.1.6.	Enzyme, Marker, Antikörper .....	24
2.1.7.	Geräte .....	24
2.2.	Methoden .....	24
2.2.1.	Anzucht und Aufbewahrung von Mikroorganismen .....	24
2.2.2.	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	25
2.2.2.1.	Transformation nach KLEBE et al. 1983 .....	25
2.2.2.2.	Transformation nach der Lithiumacetat-Methode (GIETZ et al., 1995) .....	25
2.2.3.	Transformation von <i>E. coli</i> .....	27
2.2.3.1.	Transformation nach der Methode von HANAHAN (1983) .....	27
2.2.3.2.	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation .....	27
2.2.4.	Isolierung von DNA .....	28
2.2.4.1.	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	28
2.2.4.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> („Plasmid-Rescue“) .....	29
2.2.4.3.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Mini- und Maxipräparationen) .....	29
2.2.4.4.	Isolierung der DNA aus Genbanken in <i>E. coli</i> .....	30
2.2.5.	Bearbeitung isolierter DNA .....	31
2.2.5.1.	DNA-Restriktionsanalyse .....	31
2.2.5.2.	Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA .....	31
2.2.5.3.	Amplifikation von DNA mit PCR .....	31
2.2.5.4.	Ligation von DNA .....	33
2.2.5.5.	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	33
2.2.5.6.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	33
2.2.5.7.	Sequenzierung von DNA .....	33
2.2.6.	Funktionelle Untersuchungen in <i>S. cerevisiae</i> .....	34
2.2.6.1.	Kreuzung haploider <i>S. cerevisiae</i> -Stämme und Tetradenanalyse .....	34
2.2.6.2.	Nachweis von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität .....	35
2.2.6.3.	Nachweis der Aktivierung des <i>HIS3</i> -Reporters .....	36
2.2.6.4.	Nachweis der Expression des $\alpha$ -Agglutininrezeptors (BODER und WITTRUP, 1997) .....	36
2.2.6.5.	FACS-Analyse .....	37
2.2.6.6.	Mikroskopische Untersuchungen von <i>S. cerevisiae</i> .....	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
3.1.	Konstruktion Adenin-prototropher <i>S. cerevisiae</i> -Stämme .....	38
3.2.	Konstruktion neuer <i>S. cerevisiae</i> -Stämme mit GFP als Reporter für das Zweihybrid-System .....	40
3.2.1.	Integration einer <i>GFP-kanMX</i> -Kassette in das <i>GAL1</i> -Gen .....	40
3.2.2.	Integration einer $P_{GAL1}$ - <i>GFP-kanMX</i> -Kassette in das <i>LEU2</i> -Gen .....	41

3.2.3.	Funktionelle Charakterisierung der Stämme KFY3 und KFY4 .....	46
3.3.	Konstruktion neuer <i>S. cerevisiae</i> -Stämme mit dem <b>a</b> -Agglutininrezeptor als Reporter im Zweihybrid-System .....	51
3.3.1.	Integration des GAPDH-Promotors vor das <i>AGA1</i> -Gen .....	52
3.3.2.	Integration des <i>GAL1</i> -Promotors vor das <i>AGA1</i> -Gen .....	53
3.3.3.	Integration einer <i>kanMX</i> -P <sub><i>GAL1</i></sub> - <i>AGA1</i> -Kassette in das <i>TRP1</i> -Gen .....	56
3.3.4.	Testung der Stämme KFY6 und KFY7 bezüglich ihrer Fähigkeit zur Paarung .....	57
3.3.5.	Konstruktion eines die P <sub><i>GAL1</i></sub> - <i>AGA2</i> -Kassette tragenden Plasmides mit Histidin als Selektionsmarker .....	58
3.3.6.	Markierung des <b>a</b> -Agglutininrezeptors mit verschiedenen Antikörpern .....	61
3.4.	Mikroskopische Untersuchung der Stämme KFY3 und KFY6 .....	62
3.5.	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen des Humanen Cytomegalovirus unter Verwendung der GFP-Reporterstämme KFY3 und KFY4 .....	63
3.5.1.	Konstruktion neuer Vektoren mit der Gal4p-AD für das Zweihybrid-System ...	63
3.5.2.	Konstruktion von HCMV-Genbanken in Fusion an die Gal4p-DNA-BD und an die Gal4p-AD .....	64
3.5.3.	Testung der konstruierten HCMV-Genbanken im modifizierten Zweihybrid- System hinsichtlich multipler Interaktionen untereinander .....	66
3.5.4.	Identifizierung der HCMV-DNA-Fragmente in Hefezellen mit einer Protein- Protein-Interaktion .....	69
3.5.5.	Gefundene Interaktionen zwischen Proteinen des Humanen Cytomegalovirus .....	70
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>75</b>
4.1.	Etablierung von GFP als Reportergen im Zweihybrid-System .....	75
4.2.	Entwicklung eines neuartigen Reportersystems auf der Grundlage des <b>a</b> -Agglutininrezeptors .....	78
4.3.	Einsatz des neuen GFP-Reportersystems für die Untersuchung von Genbanken des Humanen Cytomegalovirus im Zweihybrid-System .....	81
4.4.	Multiple Interaktionen zwischen Proteinen des Humanen Cytomegalovirus .....	85
4.5.	Ausblick .....	92
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>95</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>IV</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A. bidest	bidestilliertes Wasser
AK	Antikörper
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bp	basepairs (Basenpaare)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethyldiamin-tetra-Essigsäure
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid
FACS	Fluorescence activated cell sorter (Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer, Durchflußzytometer)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Detektion des gestreuten Lichtes im FACS, welches entlang Achse des einfallenden Lichtes gemessen wird)
G-418	G-418-Sulfat, Geneticin
Gal4p-DNA-BD	DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4p in <i>S. cerevisiae</i>
GAL4p-AD	Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4p in <i>S. cerevisiae</i>
GFP	green fluorescent protein (Grün Fluoreszierendes Protein)
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HSV-1	Herpes-simplex Virus-1
LB	Luria Bertani-Medium
LBA	LB-Medium mit Ampicillin
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
OD	optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)

---

PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PMT	Photo Multiplier Tube (Licht-Detektor im FACS)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SL	Stammlösung
SV40	Simian Virus 40
TEMED	Tertramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit (Einheit)
UAS	upstream activation sequence (stromaufwärts gelegene Regulatorsequenz)
VZV	Varicella-zoster-Virus
w/v	weight/volume (Gewicht/Volumen)
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid
YNB	yeast nitrogen base (aminosäurefreie Stickstoffbasis)

## 1. EINLEITUNG

In den vergangenen fünf Jahren war die Entschlüsselung der Genome von Organismen, die in der Aufklärung pathologischer Vorgänge oder als Modelorganismen von Bedeutung sind, eines der wichtigsten Ziele der molekularbiologischen Forschung. In diesem Zusammenhang wurden viele virale, mehr als 30 bakterielle und vier eukaryotische Genome (*Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Arabidopsis thaliana*) komplett sequenziert. Ihren Höhepunkt werden die Sequenzierungsprojekte mit der vollständigen Aufklärung der Genome von *Homo sapiens* und *Mus musculus* erreichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome/org.html>).

Die große Herausforderung der sogenannten „Postgenom-Ära“ in der Molekularbiologie besteht darin, die Vielzahl an Informationen über codierende Sequenzen zahlreicher uncharakterisierter Proteine für Untersuchungen hinsichtlich ihrer Funktion und Bedeutung in zellulären Netzwerken zu nutzen. Am Beispiel des menschlichen Genoms, bei dem von etwa 30.000-40.000 ORFs (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM, 2001, EWING & GREEN, 2000) nur ungefähr 8000 Gene bekannte Proteine repräsentieren (WALHOUT & VIDAL, 2001), wird deutlich, daß für die funktionelle Proteomanalyse effiziente Hochdurchsatz-Technologien notwendig sind.

Zur Charakterisierung von Proteinen gibt es mehrere Strategien, die einerseits klassische Methoden beinhalten und andererseits im genomweiten Maßstab die Entwicklung neuer Ansätze einschließen (MAYER & HIETER, 2000). Zum ersteren gehört die Analyse von Mutationen, biochemischen Aktivitäten, physikalischen Interaktionen mit anderen Molekülen, sowie die Untersuchung der zellulären Lokalisation und Homologien zu bekannten Proteinen. Genom-basierte, neue Methoden dienen der Bestimmung von Funktionen biologischer Makromoleküle innerhalb komplexer Netzwerke. Dabei kommen vor allem bioinformatische Ansätze zur Anwendung, wie z.B. die Erstellung korrelierter phylogenetischer Profile. Für diesen Ansatz wird vorausgesetzt, daß sich Proteine, welche in einem gemeinsamen Komplex agieren, evolutionär ähnlich entwickeln (PELLEGRINI et al., 1999). Weiterhin sind Struktur-basierte Funktionsanalysen aufgrund von Vorhersagen bezüglich des Aufbaus unbekannter Proteine möglich. Mit einer anderen bioinformatischen Methode werden Fusionen spezifischer Proteinuntereinheiten unter der Prämisse untersucht, daß Domänen, die in einem Protein fusioniert sind, wahrscheinlich in einem Organismus miteinander interagieren, wenn sie in getrennten Proteinen lokalisiert sind (fusion events, MARCOTTE et al., 1999, ENRIGHT et al., 1999). Analysen der sehr umfangreichen Daten aus DNA-Microarray-Untersuchungen zur Co-Regulation der mRNA-Expression können über eine Verknüpfung mit bekannten Proteinen wichtige Hinweise zur möglichen Funktion neu entdeckter Proteine liefern. Mit Hilfe von DNA-Microarrays können unbekannte Proteine außerdem einer kinetischen Klasse der Genexpression zugeordnet werden, wodurch



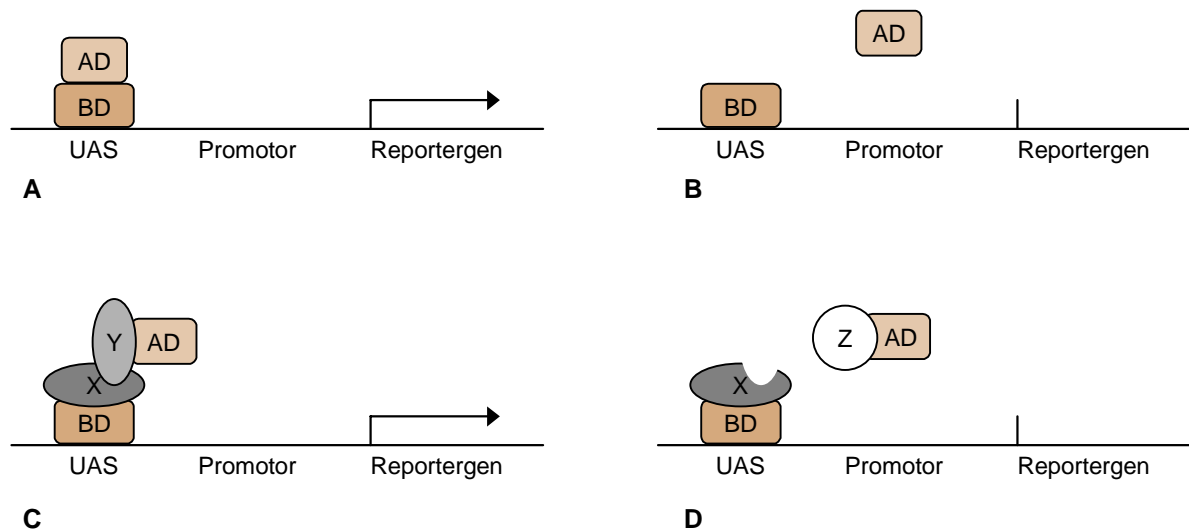
wichtige Hinweise auf die Rolle dieser Proteine im Lebenszyklus des entsprechenden Organismus möglich sind (CHAMBERS et al., 1999). MARCOTTE et al. (1999) kombinierten mehrere bioinformatische Strategien mit experimentellen Daten und trafen auf diese Weise Aussagen zu funktionellen Beziehungen zwischen den 6217 Proteinen von *S. cerevisiae*.

Da die wenigsten Proteine allein operieren, ist die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen eine zentrale Methode zur Charakterisierung entdeckter Proteine (FIELDS, 1999). Proteinkomplexe sind an vielen zellulären Prozessen, wie z.B. Signaltransduktionskaskaden, Synthese von DNA- und RNA-Molekülen, Bildung zellulärer Strukturen, wie Zellmembranen, Spindelapparat und Kernporenkomplexe, sowie an enzymatischen Reaktionen beteiligt. Demzufolge stellen Protein-Wechselwirkungen offenbar einen wichtigen Regulationsmechanismus der Zelle dar, so daß neben den bereits erwähnten theoretischen Ansätzen eine Vielzahl an Techniken für deren Untersuchung etabliert ist (MUNDER et al., 1997). Dabei unterscheidet man zwischen physikalischen, genetischen und molekularbiologischen Ansätzen (PHIZICKI & FIELDS, 1995). Eine der bekanntesten Methoden zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen ist das Zweihybrid-System in Hefe. Auf diese Technik, welche eine einfache und schnelle Suche nach interagierenden Partnern *in vivo* ermöglicht und eine genaue Identifikation spezifischer Interaktionsdomänen erlaubt, wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

### 1.1. Das Zweihybrid-System in Hefe

Das Zweihybrid-System in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde 1989 von FIELDS und SONG entwickelt. Die Grundlage dieser Technik stellen die besonderen Eigenschaften einer definierten Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar (PTASHNE, 1988), die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz als „acid blob type“ Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden (FISCHER et al., 1988, KAKIDANI & PTASHNE, 1988, MA et al., 1988). Diese bestehen aus mindestens zwei Domänen, einer DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und einer Aktivierungsdomäne (AD) (PTASHNE, 1988), die unabhängig voneinander operieren und gemeinsam die Transkription von Genen induzieren. Die DNA-BD interagiert auch in Abwesenheit des transaktivierenden Teils mit der DNA (KEEGAN et al., 1986) und definiert die Spezifität des Transkriptionsfaktors durch Bindung an bestimmte Erkennungssequenzen. Diese Sequenzen innerhalb der DNA werden als UAS (upstream activation sequence), d.h. stromaufwärts vom Transkriptionsstart gelegene Erkennungssequenz bezeichnet. Die AD allein ist ihrerseits in der Lage, die Transkription von Genen zu aktivieren. Dies konnte anhand der Konstruktion von hybriden Transkriptionsfaktoren gezeigt werden, bei denen die beiden Domänen aus verschiedenen Organismen stammen (SADOWSKI et al., 1988). Wie in Abb. 1A dargestellt, kann die Transkription allerdings nur dann induziert werden, wenn die AD durch Vermittlung der DNA-BD an spezifische DNA-Elemente (UAS) gebracht wird.

Werden beide Domänen getrennt exprimiert (Abb. 1B), hat der Transkriptionsfaktor keine transaktivierende Aktivität.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung des Zweihybrid-Systems in Hefe. AD verdeutlicht die Gal4p-Aktivierungsdomäne und BD die Gal4p-DNA-Bindedomäne. In Abb. A ist der intakte Transkriptionsfaktor Gal4p dargestellt, der in der Lage ist, das Reporter gen zu aktivieren. In Abb. B sind die AD und die DNA-BD getrennt exprimiert, so daß die AD nicht an die DNA gelangen kann und keine Reporteraktivierung möglich ist. X und Y in Abb. C stellen miteinander interagierende Proteine dar, deren Wechselwirkung die an Y fusionierte AD in ausreichende Nähe zur DNA bringt und dadurch eine Expression des Reporters erlaubt. Im Gegensatz dazu gehen X und Z (Abb. D) keine Wechselwirkung miteinander ein und Gal4p ist, wie in Abb. B, inaktiv.

Das Prinzip des Zweihybrid-Systems besteht darin, ein Protein an die DNA-BD und ein anderes an die AD zu fusionieren, und zwar so, daß Hybridproteine mit einem gemeinsamen Leserahmen entstehen. Durch Bindung der beiden Fusionsproteine aneinander wird der funktionstüchtige Transkriptionsfaktor wiederhergestellt, was in der Expression eines Reporter genes resultiert (Abb. 1C). Wenn die beiden Fusionsproteine nicht miteinander interagieren, ist der Transkriptionsfaktor inaktiv, da die AD nicht an die DNA rekrutiert wird (Abb. 1D, MUNDER et al., 1997).

### 1.1.1. Verwendete Transkriptionsfaktoren

Das originale, von FIELDS und SONG (1989) in Hefe etablierte Zweihybrid-System nutzt den Transkriptionsfaktor Gal4p. Für die meisten Untersuchungen, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, kommt auch heute dieses Protein zum Einsatz, wobei es in die N-terminale DNA-Bindedomäne (AS 1-147) und die C-terminale Aktivierungsregion (AS 768-881) gespalten wird. Gal4p induziert die Expression von Gal1p, ein Protein, welches im Galaktose-

metabolismus von Hefe essentiell ist. In Abwesenheit von Galaktose im Medium wird Gal4p von Gal80p gehemmt (ZENKE et al., 1996). Aus diesem Grund müssen in einem Hefestamm, der für das Zweihybrid-System eingesetzt werden soll, sowohl das native *GAL4* als auch *GAL80* deletiert sein. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, daß auch andere Transkriptionsfaktoren verwendet werden können. Dabei kam z.B. der Ace1p-Transaktivator aus Hefe zum Einsatz, für dessen Bindung an den *CUP1*-Promotor im Medium Kupfer vorhanden sein muß (MUNDER & FÜRST, 1992). Die Aktivierungsdomäne von Vp16 aus dem Herpes simplex-Virus und DNA-Bindedomäne des bakteriellen *lexA*-Repressors bildeten zusammen ebenfalls einen funktionellen Transkriptionsfaktor und konnten für Interaktionsstudien auf der Grundlage des Zweihybrid-Systems eingesetzt werden (TZAMARIAS & STRUHL, 1994).

### 1.1.2. Reportergene

Die Expression des Reportergens in Folge einer Protein-Protein-Wechselwirkung kann je nach Reportersystem entweder durch einen einfachen enzymatischen Test oder durch Kultivierung der Hefezellen auf definierten Medien analysiert werden. Ein sehr verbreitetes Reportergen ist *lacZ* aus *Escherichia coli*, welches für die  $\beta$ -Galaktosidase codiert (FIELDS & SONG, 1989, FIELDS & STERNGLANZ, 1994). Die Aktivität dieses Enzyms kann durch Umsetzung des chromogenen Substrates 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid nach Transfer der Zellen auf Filterpapier oder durch Zugabe des Substrates zu Agarplatten detektiert werden (BREEDEN & NASMYTH, 1985). Während in diesen Tests die Blaufärbung der Zellen visuell ausgewertet wird, kann in Flüssigkulturen die unter Verwendung des Substrates *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid detektierbare Gelbfärbung spektrophotometrisch quantifiziert werden (BREEDEN & NASMYTH, 1987, vgl. 2.2.6.2.).

Neben der  $\beta$ -Galaktosidase werden Enzyme aus den Biosynthesewegen der essentiellen Aminosäuren als Reportergene eingesetzt. Dazu gehört z.B. der *HIS3*-Reporter, der für die Imidazolglycerin-Phosphatdehydratase codiert und dessen Transkription durch Kultivierung der Histidin-auxotrophen Hefen auf Histidin-freien Minimalmedien detektierbar ist (HANNON et al., 1993, vgl. 2.2.6.3.). Ähnliche Reportersysteme sind *LEU2* (GYURIS et al., 1993) und *URA3* (LE DOUARIN et al., 1995). Mit letzterem ist eine negative Selektion von Zellen, in denen eine Interaktion z.B. durch Anwesenheit bioaktiver Substanzen gestört wird, möglich. Dabei wird dem Selektionsmedium 5-Fluoro-orotsäure zugegeben, die durch das Genprodukt von *URA3*, die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase, in eine toxische Verbindung umgewandelt wird. Ein weiteres Reportergen ist *CUP1*, welches für das Protein Metallothionin codiert und dessen Expression den Zellen eine Resistenz gegenüber Schwermetallen, insbesondere Kupfer verleiht (KÄGI & KOJIMA, 1997, MUNDER & FÜRST, 1992).

### 1.1.3. Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP)

Als ein neues Reportergen zur Detektion positiver Protein-Protein-Interaktionen im Zusammenhang mit einer Anwendung des Zweihybrid-Systems in der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung, bietet sich das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) an. GFP wird von der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* (CHALFIE et al., 1994) gebildet und hat in der Molekularbiologie eine große Bedeutung als Marker für die Genexpression und für zelluläre Lokalisierung von Proteinen (CORMACK et al., 1996). Die hervorragende Eignung von GFP als molekularbiologisches Werkzeug resultiert aus seiner hohen Stabilität und minimalen Toxizität, der Möglichkeit zur Klonierung und heterologen Expression in verschiedenen Organismen, der einfachen Detektionsmöglichkeiten und seiner Funktionstüchtigkeit in Abwesenheit jeglicher Cofaktoren (BILLINTON & KNIGHT, 2001).

In *Aequorea victoria* erhält GFP seine Anregungsenergie von dem Photoprotein Aequorin, welches Calcium bindet und in Folge dessen in Form von Lumineszenz blaues Licht produziert. Demzufolge absorbiert natives GFP blaues Licht einer Wellenlänge von 395nm und emittiert grünes Licht mit einem Maximum von 510nm und einer Schulter bei 540nm (WARD et al., 1980), was der Qualle ein grünes Leuchten verleiht. Die Chromophore des 238 AS großen GFP wird durch Zyklisierung des Tripeptids Serin-Dehydrotyrosin-Glycin gebildet (AS 65-67). Da GFP nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 488nm, wie es von den in FACS-Geräten üblichen Argon-Lasern bereitgestellt wird, nur mit relativ geringer Intensität fluoresziert, wurden u. a. von CORMACK et al. (1996) GFP-Mutanten hergestellt, in denen das Excitationsmaximum bei etwa 490nm liegt. Aus einer dieser Chromophor-Mutanten konstruierten die Autoren durch Codon-Optimierung das in *Candida albicans* exprimierbare  $\gamma$ EGFP3 (yeast-enhanced GFP). Dieses erzeugt in *S. cerevisiae* ebenfalls eine sehr intensive Fluoreszenz (CORMACK et al., 1997) und ist demzufolge als ein effizienter Reporter in diesen Hefen gut geeignet.

Der Einsatz von GFP als Reportergen im Zweihybrid-System ist in der Literatur bereits beschrieben. Die Konstruktion von Hefestämmen, in denen  $\gamma$ EGFP3 stabil in das Genom integriert ist und durch Gal4p aktiviert wird, sowie deren Anwendung in der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung, wurde bisher allerdings nicht gezeigt. Während MAYER et al. (1999) GFP als Reporter in einem auf dem Transkriptionsfaktor Ace1p basierenden Zweihybrid-system verwendeten, nutzten CORMACK et al. (1998) ein Plasmid-codiertes GFP für die Isolierung pflanzlicher Coaktivatoren der Transkription und detektierten positive Hefeklone unter einer UV-Lampe. SHIODA et al. (2000) setzten GFP auf einem Reporterplasmid in einem Zweihybrid-System in Säugerzellen ein.

### **Das Problem der Autofluoreszenz**

Ein Nachteil von GFP besteht in der teilweisen Überlagerung der emittierten Fluoreszenz mit der Autofluoreszenz der Zellen. Diese natürliche Fluoreszenz wird von den Zellen der meisten Organismen abgegeben und stammt von verschiedenen Verbindungen, einschließlich Metaboliten und Strukturkomponenten. Eine der wichtigsten biochemischen Quellen für Autofluoreszenz sind Flavine, die als intrazelluläres Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>), Flavin-Coenzyme und mitochondriale Flavoproteine vorkommen und nach Excitation mit blauem Licht (450-490nm) grüne-gelbe (500-560nm) Fluoreszenz abgeben. Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD/NADH) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP/NADPH) emittieren in Abhängigkeit von ihrem Redoxzustand und ihrer Umgebung nach Anregung bei etwa 365 nm Licht einer Wellenlänge von etwa 450nm.

In den Zellen vieler Organismen stellen Lipofuscine, die sogenannten Alterspigmente, eine Quelle gelber-oranger Fluoreszenz dar. Diese Verbindungen setzen sich aus Lipid-, Kohlenhydrat- und Proteinbestandteilen zusammen und entstehen durch Akkumulation zerstörter Zellmaterialien.

Die Detektion von GFP in Gegenwart natürlicher Autofluoreszenz kann durch verschiedene Strategien verbessert werden. Dazu gehört z.B. die Verwendung der bereits beschriebenen GFP-Mutanten (z.B. yEGFP3), sowie der Einsatz optimierter Filtersysteme in den Detektionsgeräten (BILLINTON & KNIGHT, 2001).

#### **1.1.4. Vor- und Nachteile des Zweihybrid-Systems**

Das Zweihybrid-System in Hefe bietet gegenüber anderen Methoden der Detektion von Protein-Interaktionen und der Charakterisierung neuer Proteine mehrere Vorteile (VIDAL & LEGRAIN, 1999). Erstens werden die interessierenden Moleküle *in vivo* untersucht, wodurch die artifiziellen Bedingungen vieler *in vitro*-Techniken vermieden werden können. Zweitens erfordert dieses System nur wenige Klonierungsschritte und nicht die mitunter problematische Expression der Proteine in großer Menge. Dies erlaubt eine schnelle und effiziente Analyse sehr vieler codierender Sequenzen. Ein weiterer Vorteil in diesem Zusammenhang besteht darin, daß *S. cerevisiae* als Modellorganismus für das Zweihybrid-System ein relativ schnell wachsender, gut transformierbarer Mikroorganismus ist, der eine unkomplizierte Durchführung entsprechender Untersuchungen ermöglicht. Dadurch ist eine Anwendung für effektive Analysen von Genbanken hinsichtlich multipler Interaktionen vieler Proteine untereinander möglich (vgl. 1.2.). Obwohl das Zweihybrid-System auch in Säugerzellen funktioniert und dies für spezielle Anwendungen evtl. vorteilhaft ist, besteht hier das Problem der aufwendigeren Klonierung und Transformation (LUO et al., 1997).

Drittens kann das Zweihybrid-System für die Erforschung vielfältiger Wechselwirkungen verwendet werden, da es auf einer physikalischen Bindung der beiden Proteine aneinander basiert. Eine Einschränkung der interagierenden Proteindomänen ist ebenso möglich wie die

Testung vielfältiger Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf bestimmte Protein-Interaktionen. Ein vierter, wichtiger Vorteil besteht in der hohen Sensitivität des Zweihybrid-Systems. ESTOJAK et al. (1995) korrelierten Zweihybrid-Affinitätsdaten mit *in vitro*-Messungen und kamen zu dem Schluß, daß mit dem Zweihybrid-System Interaktionen mit einer Bindungskonstante ( $K_D$ ) von weniger als  $1\mu\text{M}$  detektierbar sind. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die bekannte Interaktion zwischen dem Protein Ras und der Proteinkinase Raf mit dem Zweihybrid-System, aber nicht mit Hilfe von Coimmunopräzipitation analysierbar war (FIELDS & STERNGLANZ, 1994).

### **Falsch negative und falsch positive Interaktionen**

Die Limitationen des Zweihybrid-System bestehen zum einen darin, daß ausschließlich solche Proteine untersucht werden können, die in den Zellkern transportierbar sind. Dies bedeutet nicht, daß die Interaktion in jedem Fall auch im Zellkern stattfinden muß. Die Proteine können z.B. unmittelbar nach ihrer Synthese im Cytoplasma miteinander interagieren und dann als Komplex in den Kern transportiert werden. Eine weitere Ursache für das Auftreten von falsch negativen Interaktionen stellen posttranslationale Modifikationen dar. Protein-Protein-Wechselwirkungen, die der Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum bedürfen oder posttranslationale Phosphorylierungen erfordern, können häufig nicht detektiert werden. Als eukaryotischer Organismus nutzt *S. cerevisiae* zwar die gleichen Mechanismen zur Glykosylierung wie höhere Eukaryoten, es ist aber trotzdem unwahrscheinlich, daß die im Zweihybrid-System stark exprimierten Proteine vollständig glykosyliert werden (MUNDER et al., 1997). Ebenso kann durch falsche Faltung die Fähigkeit eines Proteins zur Wechselwirkung mit einem anderen eingeschränkt werden. Manche Proteine aus Bakterien oder Säugern werden außerdem in Hefe nicht stabil exprimiert bzw. durch die Aktivität von Proteasen rasch abgebaut.

Ein anderes Problem im Zweihybrid-System stellen falsch positive Interaktionen dar. Transkriptionsfaktoren können als „Köder“, d.h. als Fusionsproteine mit der DNA-BD, nicht eingesetzt werden, da sie unabhängig von der Anwesenheit eines mit der AD fusionierten Proteins die Transkription des Reportergens induzieren würden. Außerdem können viele Proteine oder Proteindomänen, die normalerweise nicht am Transkriptionsgeschehen der Zelle beteiligt sind, in Fusion an die DNA-BD die Transkription aktivieren (MUNDER et al., 1997). In Untersuchungen mit einem definierten „Köderprotein“ kann dies oft durch Deletion der transaktivierenden Domäne des entsprechenden Proteins umgangen werden (z.B. LI & FIELDS, 1993). Eine weitere Möglichkeit ist die Anwendung eines bakteriellen Zweihybrid-Systems (GRAMATIKOFF, 1994), da eukaryotische Aktivierungssequenzen in *E. coli* inaktiv sind. Auf die Eliminierung transaktivierender Klone bei der Untersuchung von Genbanken wird in Abschnitt 1.2. näher eingegangen.

Falsch positive Interaktionen können außerdem dann detektiert werden, wenn die Wechselwirkung zwischen isolierten Proteindomänen stattfindet, die im nativen Protein nicht zugänglich sind (FIELDS & STERNGLANZ). Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß Proteine interagieren, die in der Zelle unter natürlichen Bedingungen nicht zusammen vorkommen, da sie z.B. in getrennten Kompartimenten lokalisiert oder in völlig verschiedene Funktionsabläufe involviert sind.

Aus den genannten Gründen ist es notwendig, mit dem Zweihybrid-System gefundene Protein-Protein-Interaktionen einer genauen Prüfung hinsichtlich ihrer biologischen Relevanz anhand der in der Literatur vorliegenden Daten zu unterziehen. Eine Verifizierung der Interaktionen mit Hilfe anderer Methoden ist unter Umständen notwendig und vorteilhaft, im Zusammenhang mit der Untersuchung von Genbanken (vgl. 1.2.) aufgrund der großen Datenmengen allerdings unpraktikabel.

## **1.2. Untersuchungen von Genbanken hinsichtlich multipler Interaktionen und Erstellung von Protein-Interaktionskarten**

Obwohl das Zweihybrid-System ursprünglich für die Analyse der Wechselwirkungen zwischen zwei bekannten Proteinen entwickelt wurde, ist es heute eines der am meisten genutzten Systeme bei der genomweiten Suche nach Protein-Protein-Interaktionen (LEGRAIN et al., 2001). In der vergangenen drei Jahren wurden sehr umfassende Studien bezüglich der Protein-Wechselwirkungen in *S. cerevisiae* (z.B. ITO et al., 2000, UETZ et al., 2000), *Caenorhabditis elegans* (WALHOUT et al., 2000), *Helicobacter pylori* (RAIN et al., 2001), Vaccinia-Virus (MC CRAITH et al., 2000) u.a. durchgeführt. Das Ziel dieser Arbeiten war die Erstellung möglichst vollständiger Protein-Interaktionskarten („linkage maps“), d.h. im Idealfall die Aufklärung aller möglichen Interaktionen zwischen sämtlichen Proteinen des entsprechenden Organismus. Solche Interaktionskarten sind Kernstücke der funktionellen Proteomanalyse und können neben der Erforschung unbekannter Proteine wichtige Beiträge zum umfassenden Verständnis der komplexen Funktionsabläufe in der Zelle beitragen (ITO et al., 2000). Außerdem kann die sogenannte Interaktom-Forschung mit Organismen, die an pathologischen Vorgängen beteiligt sind, neue Zielstrukturen für die Entwicklung alternativer Therapiemöglichkeiten verschiedener Krankheiten liefern (EVANGELISTA et al., 1996). Für die Erstellung von Interaktionskarten unter Verwendung des Zweihybrid-Systems gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen können Genbanken mit zufällig erzeugten DNA-Fragmenten untereinander untersucht werden und zum anderen speziell als „Köder“ (Fusion mit DNA-BD) und als „Beute“ (Fusion mit AD) klonierte, vollständige Proteine zu Genbanken zusammengefaßt und individuell miteinander kombiniert werden (LEGRAIN et al. 2001). Beide Strategien haben Vor- und Nachteile, die in Kapitel 4.3. im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit konstruierten Genbanken diskutiert werden. Als vorteilhaft für extensive Analysen mit

dem Zweihybrid-System hat sich die sogenannte „Kreuzungsstrategie“ erwiesen. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine zunächst allein in Hefezellen unterschiedlichen Paarungstyps exprimiert und können anschließend durch Paarung in den daraus resultierenden diploiden Zellen miteinander interagieren (BENDIXEN et al., 1994). Diese Methode, welche auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, erlaubt im Vorfeld des eigentlichen Zweihybrid-Assays eine Selektion der Proteine oder Proteinfofragmente hinsichtlich transaktivierender Eigenschaften. Eine solche Selektion ist im Zusammenhang mit Interaktionskarten besonders wichtig, da Proteine mit transaktivierenden Fähigkeiten andernfalls scheinbar stark verknüpfte Zentren in Protein-Netzwerken bilden können, die biologisch nicht relevant sind (LEGRAIN et al., 2001).

Eine der ersten Protein-Interaktionskarten wurde von BARTEL et al. (1996) für den Bakteriophagen T7 erstellt, dessen Genom für 55 Proteine codiert. Zur Eliminierung transaktivierender Hefeklonen wurden in sehr aufwendigen Tests insgesamt 30.000 Klone der DNA-BD-Genbank hinsichtlich der Aktivierung des *HIS3*-Reporters analysiert. In ähnlicher Weise wurden in einer umfassenden Arbeit mit *S. cerevisiae* (ITO et al., 2000) selbstaktivierende Klone von der Gesamtheit aller einzeln klonierten ORFs ausgeschlossen. Für die Erstellung einer Protein-Interaktionskarte von *Helicobacter pylori* wurden die „Köderkonstrukte“ speziell für den Zweihybrid-Assay adaptiert und in Vorversuchen für jedes dieser Konstrukte der Selektionsdruck auf Histidin-freiem, 3-AT-haltigem Medium bestimmt (RAIN et al., 2001).

### 1.3. Das Humane Cytomegalovirus (HCMV)

Das Humane Cytomegalovirus ist ein ubiquitäres, humanpathogenes Virus, das an einem weiten Spektrum von Krankheiten vor allem bei Neugeborenen und immunsupprimierten Menschen beteiligt ist. Ein großer Teil der Proteine des HCMV ist noch uncharakterisiert, so daß deren Erforschung z.B. durch Erstellung einer Protein-Protein-Interaktionskarte zu einem besseren Verständnis des Virus und zur Entwicklung neuer antiviraler Therapien beitragen könnte. HCMV gehört zu der Familie der *Herpesviridae*, welche in drei Unterfamilien eingeteilt werden: die *Alphaherpesvirinae*, zu denen Herpes-simplex-Virus 1 und 2 (HSV-1 und -2) sowie das Varicella-zoster-Virus (VZV) zählen; die *Betaherpesvirinae*, die HCMV und das Humane-Herpes-Virus 6 und 7 (HHV-6 und -7) einschließen und die *Gammaherpesvirinae*, denen das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das Humane-Herpes-Virus 8 (HHV-8) zugeordnet sind (DONIGER et al., 1999).

#### Struktur des HCMV

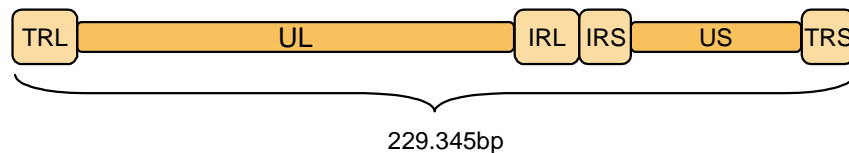
HCMV ist ein strukturell komplexes Virus, das den typischen Aufbau der Herpesviren repräsentiert. Es wird geschätzt, daß ungefähr 30 Proteine in der Größe von 11-200kDa an der Bildung der Virusstruktur beteiligt sind. Die doppelsträngige DNA ist in einem iko-



saedrischen Capsid verpackt, welches einen Durchmesser von etwa 100nm hat. Dieses Capsid ist in eine nur wenig charakterisierte Proteinstruktur eingebettet, die als Tegument oder Matrix bezeichnet wird. Eine Lipidhülle, welche verschiedene Glycoproteine enthält, umgibt das Tegument und verleiht dem kompletten Viruspartikel eine Größe von 150-200nm (BALDICK and SHENK, 1996; GIBSON 1996).

### Genom, Proteine und Replikation des HCMV

Das Genom des HCMV-Stammes AD169 wurde 1990 von CHEE et al. vollständig sequenziert. Die lineare, doppelsträngige, 229.354bp lange DNA codiert für 208 Proteine und weist einen hohen G+C Gehalt von 57,2% auf. Wie in Abb. 2 dargestellt, besteht das Genom aus einem großen (UL, unique long) und einem kleinen Segment (US, unique short), die beide von einem Paar „inverted repeats“ (TRL/IRL und IRS/TRS) flankiert sind.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung des Genomes von HCMV. Die dargestellten Größenverhältnisse entsprechen nicht den Verhältnissen in der Realität.

Die Regionen UL und US kommen als Resultat von Rekombination jeweils in beiden Orientierungen vor, wodurch vier Isomere des Genoms entstehen. In einer Population viraler DNA treten alle Isomere in gleichen Verhältnissen auf (BANKIER et al., 1991).

Die HCMV-Proteine werden von den korrespondierenden mRNAs ausgehend synthetisiert, deren Transkription in einer temporären Kaskade reguliert ist. Die erste Klasse exprimierter Proteine repräsentiert die „immediate early“ ( $\alpha$ )-Proteine, deren Transkription unabhängig von der Synthese anderer viraler Proteine reguliert ist. Die Expression der frühen ( $\beta$ ) Proteine, welche viele Enzyme und regulatorische Faktoren für die DNA- und Proteinsynthese einschließen, ist abhängig von vorangehender Synthese der „immediate early“-Proteine. Die späten ( $\gamma$ ) Proteine, zu denen die meisten Strukturproteine zählen, können nur nach bereits erfolgter Synthese der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Proteine sowie viraler DNA exprimiert werden (MOCARSKI, 1994). Vertreter aller drei Proteinklassen werden in Kapitel 4.4. im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen vorgestellt und diskutiert.

Die Replikation des HCMV erfolgt nach dem für die Gruppe der Herpesviren typischen Schema. Kurz nachdem das Virus in die Wirtszelle eingedrungen ist, wird die DNA in den Zellkern transportiert und dort nach ihrer Zirkularisierung repliziert. Die DNA-Synthese nach dem Prinzip des „Rolling circle“ beginnt am *ori-Lyt* auf dem viralen Genom und resultiert in

der Bildung von „endlosen“ Concatameren, die anschließend in gleich lange Stücke geschnitten werden. Unter Beteiligung von Verpackungssequenzen, welche an den Enden des Genoms liegen, wird die DNA in vorgefertigte Capside verpackt (MOCARSKI, 1994). Nach Einbau der Tegumentproteine wird an der Kernmembran die Virushülle angefügt und die neu synthetisierten Viruspartikel durch Lyse der infizierten Zellen entlassen. Der gesamte lytische Zyklus dauert etwa 10h.

### **Epidemiologie und Pathogenität des HCMV**

HCMV infiziert im Menschen Leukozyten, sowie Endothel-, Bindegewebs- und Epithelzellen und wird durch verschiedene Körperflüssigkeiten übertragen. In Folge von zytoplasmatischen Einschlüssen werden die infizierten Zellen vergrößert, was zu der Bezeichnung „Cytomegalie“ geführt hat. Die Zielgewebe einer Infektion sind vor allem Speicheldrüsen, Milz und Niere. Nach einer Erstinfektion persistiert das Virus in vielen Geweben seines Wirtes und kommt bei 60-90% der adulten urbanen Bevölkerung als latente Infektion vor (DONIGER et al., 1999, MOCARSKI et al., 1990).

Obwohl HCMV im Allgemeinen asymptomatische Infektionen hervorruft, kann bei immunsupprimierten Menschen, wie Transplantat-Empfängern, HIV-infizierten Patienten und Personen, die mit einer Chemotherapie behandelt werden, eine Infektion lebensbedrohlich sein (SARISKY & HAYWARD, 1996). Dies äußert sich in verschiedenen Krankheitsbildern, wie Chorioretinitis, Pneumonie, Ösophagitis, Hepatitis, Lymphozytose, Meningitis, Enzephalitis u.a. (ROIZMANN, 1996). Die Quellen der Infektion bei diesen Patienten sind v.a. Reaktivierung des latenten Virus, infizierte Spenderorgane oder -gewebe sowie Bluttransfusionen.

Neben immunsupprimierten Menschen kann HCMV seine pathogenen Fähigkeiten außerdem in sich entwickelnden Föten und neugeborenen Kinder entfalten (MOCARSKI et al., 1990). Eine Infektion des Kindes kann zur Vergrößerung von Leber und Milz, sowie zu Hörverlust, Beeinträchtigung des Sehvermögens, verschiedenen Stufen geistiger Retardation bis hin zum Tod führen (STAGNO et al., 1982).

Außerdem wird für HCMV eine Rolle in der Ätiologie verschiedener Krebsarten, wie Zervix-Karzinom, Adenokarzinom der Prostata und des Darms sowie dem Kaposi-Sarkom vermutet (DONIGER et al., 1999).

#### **1.4. Zielstellung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung modifizierter Zweihybrid-Systeme, die unter Verwendung fluoreszenzaktivierter Zellsortierung (FACS) eine neuartige und effiziente Analyse multipler Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen. Die Eignung der neuen Methode für die Erstellung genomweiter Protein-Interaktionskarten unter Verwendung von

Genbanken sollte am Beispiel einer funktionellen Untersuchung des Proteoms des Humanen Cytomegalovirus gezeigt werden.

Dabei stand die Konstruktion neuer *S. cerevisiae*-Stämme im Mittelpunkt, die neben den klassischen Reporter-genen *lacZ* und *HIS3* neuartige fluoreszenzbasierte Reportersysteme enthalten. Mit Hilfe dieser könnte das auf der Funktionalität des Transkriptionsfaktors Gal4p basierende Zweihybrid-System im FACS angewandt werden. In diesem Zusammenhang war es zunächst notwendig, in den kommerziell erhältlichen Reporterstämmen die Adenin-Auxotrophie aufzuheben, welche fluoreszenzbasierte Techniken beeinträchtigt. Anschließend sollte das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) als neues Reporter-gen stabil in das Genom der Adenin-prototrophen Hefestämme integriert werden, ohne daß die daraus resultierenden Hefen in ihrer Transformierbarkeit, der Fähigkeit zur Paarung oder anderen essentiellen Eigenschaften eingeschränkt sind. Die Funktionalität des GFP-Reporters sollte in einem umfassenden Vergleich mit dem *lacZ*-Reporter charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel parallel zu der Etablierung von GFP als Reportersystem war es, ein neuartiges Prinzip zu entwickeln, welches eine flexible Detektion positiver Zellen durch synthetische Fluoreszenzfarbstoffe gestattet. Letztere sollen so gewählt werden, daß ihre Excitations- und Emissionwellenlängen in Bereichen jenseits derer von biologischen Molekülen liegen, die für die natürliche Autofluoreszenz der Zellen verantwortlich sind. Dies wäre möglich, wenn in Folge einer Protein-Protein-Interaktion an der Oberfläche der entsprechenden Hefen ein Protein exprimiert werden würde, an das fluoreszierende Verbindungen einfach und spezifisch gekoppelt werden können.

Die Eignung der neuen Reporterstämmen sollte anhand einer proteomweiten Untersuchung der Protein-Wechselwirkungen des HCMV evaluiert werden. Dazu sollten geeignete Genbanken mit zufällig generierten HCMV-DNA-Fragmenten konstruiert werden, die das Genom des HCMV möglichst vollständig repräsentieren.

Mit der zu entwickelnden neuen Strategie der Durchführung effektiver Zweihybrid-Untersuchungen sollte eine einfache und schnelle Eliminierung der selbstaktivierenden Klone aus Genbanken im Vorfeld der eigentlichen Interaktionsanalyse ermöglicht werden. Ebenfalls unter Verwendung eines FACS sollten jene Zellen selektioniert werden, in denen eine Protein-Protein-Interaktion stattfand. Für die Amplifizierung und anschließende Sequenzierung der HCMV-DNA-Fragmente war die Etablierung einer geeigneten Methode notwendig.

Die biologische Relevanz der gefundenen Interaktionen sollte durch Vergleich mit den in der Literatur zu findenden Daten eingeschätzt werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Verwendete Stämme

##### 2.1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

**Tab. 1:** Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
Y190	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, -112, gal4Δ, gal80Δ, cyh<sup>f</sup>2, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech, HARPER et al. 1993
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, -112, gal4Δ, met<sup>-</sup>, gal80Δ, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	Clontech, HARPER et al. 1993
CB023	<i>MATa, ura3-1, leu2-3, -112, his3-11, -15, trp1-1, ade2-101<sup>oc</sup>, can1-100 [cir<sup>o</sup>], Gal<sup>+</sup>, Suc<sup>+</sup>, pep4::HIS3, prb1::hisG, prc1::hisG</i>	Fuller, Stanford University
S288C	Wildtyp	T. Munder, HKI Jena

**Tab. 2:** Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp
KFY1	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, -112, gal4Δ, gal80Δ, cyh<sup>f</sup>2, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ, ADE2::ADE2</i> (Ausgangsstamm: Y190)
KFY2	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, -112, gal4Δ, met<sup>-</sup>, gal80Δ, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ, ADE2::ADE2</i> (Ausgangsstamm: Y187)
KFY3	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, -112, gal4Δ, gal80Δ, cyh<sup>f</sup>2, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ, ADE2::ADE2, leu2::P<sub>GAL1</sub>-yEGFP3-loxP-kanMX-loxP</i> (Ausgangsstamm: KFY1)
KFY4	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, -112, gal4Δ, gal80Δ, cyrh<sup>f</sup>2, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ, ADE2::ADE2, leu2::P<sub>GAL1</sub>-yEGFP3-loxP-kanMX-loxP</i> (Ausgangsstamm: KFY3)
KFY5	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, -112, gal4Δ, met<sup>-</sup>, gal80Δ, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ, ADE2::ADE2, P<sub>AGA1</sub>::loxP-kanMX-loxP-P<sub>GAPDH</sub></i> (Ausgangsstamm: KFY2)

KFY6	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , -112, <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>met<sup>-</sup></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> , <i>ADE2::ADE2</i> , <i>P<sub>AGA1</sub>::loxP-kanMX-loxP-P<sub>GAL1</sub></i> (Ausgangsstamm: KFY2)
KFY7	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , -112, <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>met<sup>-</sup></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> , <i>ADE2::ADE2</i> , <i>trp1::loxP-kanMX-loxP-P<sub>GAL1</sub>-AGA1</i> (Ausgangsstamm: KFY2)
KFY8	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , -112, <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>cyh<sup>r</sup>2</i> , <i>LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3</i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> , <i>ADE2::ADE2</i> , <i>gal1::yEGFP3-loxP-kanMX-loxP</i> (Ausgangsstamm: KFY1)
KFY9	<i>MAT<math>\alpha</math></i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , -112, <i>gal4<math>\Delta</math></i> , <i>met<sup>-</sup></i> , <i>gal80<math>\Delta</math></i> , <i>URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i> , <i>ADE2::ADE2</i> , <i>gal1::yEGFP3-loxP-kanMX-loxP</i> (Ausgangsstamm: KFY2)

### 2.1.1.2. *Escherichia coli*-Stämme

**Tab. 3:** Verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
MC1061	<i>F<sup>-</sup></i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7696, <i>galE15</i> , <i>galK</i> , <i>galU</i> , $\Delta$ ( <i>lac</i> )X74, <i>rpsL</i> , (Str <sup>r</sup> ), <i>hsdR2</i> , ( <i>r<sub>K</sub>-m<sub>K</sub></i> +), <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i>	New England Biolabs (WERTMANN et al. 1986)
DH5 $\alpha$	<i>F<sup>-</sup></i> , $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZY A-argF</i> )U169, <i>phoA</i> , $\lambda$ -	Gibco BRL, (HANAHAN, 1983)
HB101	<i>F<sup>-</sup></i> , $\Delta$ ( <i>gpt-proA</i> )62, <i>leuB6</i> , <i>supE44</i> , <i>ara14</i> , <i>galK2</i> , <i>lacY</i> , $\Delta$ ( <i>mcrC-mrr</i> ), <i>rspL20</i> , (Str <sup>r</sup> ), <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>recA13</i>	New England Biolabs (BOYER et al. 1969)

### 2.1.2. Nukleinsäuren

#### 2.1.2.1. Plasmide

**Tab. 4:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung <sup>a</sup>	Herkunft
pGBT9 (5,5kb)	<i>GAL4-BD</i> , <i>TRP1</i> , <i>amp<sup>r</sup></i> , 2 $\mu$	Clontech
pGBT9-MCS1,2,3 (5,5kb)	Derivat von pGBT9, drei verschiedene Lese- rahmen in der MCS	B. Kaiser, HKI Jena

pGAD424 (6,6kb)	<i>GAL4-AD, LEU2, amp<sup>r</sup>, 2μ</i>	Clontech
pCI1 (15,3kb)	<i>GAL4, LEU2, amp<sup>r</sup></i>	Clontech
pVA3 (6,4kb)	<i>GAL4-BD-murines p53<sub>(72-390)</sub>, TRP1, amp<sup>r</sup>, 2μ</i>	Clontech
pTD1 (15kb)	<i>GAL4-AD-SV40 large T-antigen, LEU2, amp<sup>r</sup>, 2μ</i>	Clontech
pYD1 (5,0kb)	<i>P<sub>GAL1</sub>, AGA2, TRP1, amp<sup>r</sup>, Cen6/Ars4</i>	Invitrogen, (BODER und WITTRUP, 1997)
pRS423 (5,8kb)	<i>HIS3, lacZ, amp<sup>r</sup>, 2μ</i>	P. Hieter, Marburg
pUG6 (4,0kb)	<i>loxP-kanMX-loxP, amp<sup>r</sup></i>	J. Hegemann, Düsseldorf
pUG30 (5,8kb)	<i>yEGFP3, loxP-kanMX-loxP, amp<sup>r</sup></i>	J. Hegemann, Düsseldorf
pTM68 (9,3kb)	<i>P<sub>GAL1</sub>, ACE1-AD, dLEU1, amp<sup>r</sup></i>	T. Munder, HKI Jena
pTM104 (4,8kb)	<i>P<sub>GAPDH</sub>, Kernlokalisierungssequenz von SV40, URA3, amp<sup>r</sup></i>	T. Munder, HKI Jena
pTM145 (5,9kb)	<i>GAL4-BD-BCY1, TRP1, amp<sup>r</sup>, 2μ</i>	T. Munder, HKI Jena
pTM146 (7,1kb)	<i>GAL4-AD-BCY1, LEU2, amp<sup>r</sup>, 2μ</i>	T. Munder, HKI Jena

a Es wurden nur die relevanten ORF's aufgeführt.

**Tab. 5:** Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Konstruktion <sup>a</sup>	Zweck
pKF2 (12kb)	<i>BamHI / NotI</i> -Fragment aus pUG30 in pTM68 <i>BamHI / NotI</i>	Disruptionskassette <i>P<sub>GAL1</sub>-yEGFP3-loxP-kanMX-loxP</i>
pKF3 (4,5kb)	<i>SmaI / SacII</i> -Fragment aus pTM104 in pUG6 <i>EcoRV / SacII</i>	Disruptionskassette <i>loxP-kanMX-loxP-P<sub>GAPDH</sub></i>
pKF4 (7,2kb)	PCR-Fragment (Primer pYD3, pYD4) aus pYD1 in pRS423 <i>SacI / SalI</i>	Umklonierung AGA2-Kassette
pKF6 (6,5kb)	PCR-Fragment aus p53-cDNA (F. Große, IMB Jena, Primer p53D, p53Uneu) in pGBT9 <i>EcoRI / BamHI</i>	Fusion eines humanen p53-Fragmentes an die <i>GAL4-BD</i>
pKF7 (4,7kb)	<i>EcoRV / SacII</i> -Fragment aus pTM68 in pUG6 <i>EcoRV / SacII</i>	Disruptionskassette <i>loxP-kanMX-loxP-P<sub>GAL1</sub></i>

pKF8 (6,8kb)	PCR-Fragment <i>AGA1</i> aus genomischer <i>S.c.</i> - DNA (Primer Ag1, Ag2) in pKF7 <i>BamHI</i> / <i>SacI</i>	Disruptionskassette <i>loxP-kanMX-loxP-P<sub>GAL1</sub>-AGA1</i>
pKF9	PCR-Fragment <i>HIS3</i> aus genomischer <i>S.c.</i> - DNA (Primer His1, His2) in pYD1 <i>AccI</i> / <i>MunI</i>	Einführung eines <i>HIS3</i> -Markers in pYD1, dabei teilweise Deletion des <i>TRP1</i> -Markers
pGAD424-MCS1 (6,7kb)	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i> -Fragment aus pGBT9-MCS1 in pGAD424 <i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>	Einführung einer neuen MCS
pGAD424-MCS2 (6,7kb)	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i> -Fragment aus pGBT9-MCS2 in pGAD424 <i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>	Einführung einer neuen MCS
pGAD424-MCS3 (6,7kb)	<i>EcoRI</i> / <i>SalI</i> -Fragment aus pGBT9-MCS3 in pGAD424 <i>EcoRI</i> / <i>SalI</i>	Einführung einer neuen MCS

a Detaillierte Plasmidkarten siehe Anhang

### 2.1.2.2. Cosmide

**Tab. 6:** Verwendete Cosmide (FLECKENSTEIN et al. 1982)

Cosmid	Kurzbeschreibung
pCM1015 (41kb)	partiellies HCMV-Genom (17244bp-51805bp) in pHC79
pCM1017 (45kb)	partiellies HCMV-Genom (25922bp-64521bp) in pHC79
pCM1029 (50kb)	partiellies HCMV-Genom (64522bp-107677bp) in pHC79
pCM1075 (41kb)	partiellies HCMV-Genom (84865bp-119080bp) in pHC79
pCM1007 (42kb)	partiellies HCMV-Genom (107678bp-142993bp) in pHC79
pCM1058 (40kb)	partiellies HCMV-Genom (142994bp-176844bp) in pHC79
pCM1052 (41kb)	partiellies HCMV-Genom (176845bp-211649bp) in pHC79
pCM1035 (47kb)	partiellies HCMV-Genom (206226bp-17243bp) in pHC79

Alle in Tabelle 6 aufgeführten Cosmide wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Mach, Universität Erlangen-Nürnberg zur Verfügung gestellt. Die in das Cosmid pHC79 klonierten HCMV-DNA-Fragmente wurden alle aus gereinigter DNA des HCMV-Stammes AD169 gewonnen.

**2.1.2.3. Synthetische Oligonukleotide****Tab. 7:** Verwendete Primer für PCR und Klonierung

Primer	Sequenz (Restriktionsenzym)
ADE1	5'-CTT CTA AGT ACA TCC TAC-3'
ADE2	5'-CT GTA CAA GTA TAT CA-3'
AGA1	5'-TAA TTA TCG TGA ACT TTT CCA GTA TTT ACG TTC ATC TTT GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC-3'
AGA2	5'-TTG TGA ACA GGT AGG TAA AAT GAG CGA AAG ATA ATG TCA TTT TGT TTA TGT GTG TTT ATT CG-3'
AGA3	5'-TTG TGA ACA GGT AGG TAA AAT GAG CGA AAG ATA ATG TCA TGG ATC CGG GTT TTT TCT CCT TGA C-3'
Ag1	5'-GCG <u>GAT CCA</u> TGA CAT TAT CTT TCG CTC AT-3' ( <i>Bam</i> HI)
Ag2	5'-GTC <u>CCC GCG GTT</u> AAC TGA AAA TTA CAT TGCAAG C-3' ( <i>Sac</i> II)
GAPDH1	5'-CGG CGA GCA TTA ACA ATA-3'
GAPDH2	5'-GGT TGG CAA CGT CGA TGA-3'
GAPDH3	5'-TAT TGT TAA TGC TCG CCG-3'
GAPDH4	5'-CAT GAC CTC CCT ACA TGC-3'
GFP5	5'-TTA ACG TCA AGG AGA AAA AAC TAT AAT GAC TAA ATC TCA TAT GTC TAA AGG TGA AGA ATT ATT CAC-3'
GFP3	5'-CCA CTG CCA GTT GGT ACA TCA CCC TCA CAG AAG ACT TGC AGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG-3'
His1	5'-ACC TGA GGA TTC <u>GTA TAC</u> GTT CCC TAG CAT GTA CGT GAG-3' ( <i>Acc</i> I)
His2	5'-CGT TAC GGC TTA <u>CAA TTG</u> GCT GCA GCT TTA AAT AAT CGG-3' ( <i>Mun</i> I)
HT114	5'-CGC CTC GAC ATC ATC ATC TGC CCA GA-3'
HT83	5'-GTC TGC AGC GAG GAG CCG TA-3'
Int1	5'-CCT GTT TCT TAT TGG CGA G-3'
Int2	5'-TGC CAG TGC TCC TCT GGC-3'
Int3	5'-GCG CTA GAA TTG AAC TCA-3'
Int4	5'-CGC TTA ACT GCT CAT TGC-3'
Int5	5'-CTT GTA GTT ACC GTC ATC-3'



Leu5	5'-AGC AAT ATA TAT ATA TAT ATT TCA AGG ATA TAC CAT TCT ATG GAT GGA CGC AAA GAA GTT TA-3'
Leu3	5'-TAA AGT TTA TGT ACA AAT ATC ATA AAA AAA GAG AAT CTT TGC ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG-3'
L1	5'-GAG AGC CGC GGA ACC GGC-3'
L2	5'-GGA ACG GTG TAT TGT TCA-3'
L3	5'-GGT ATT GAC TTA AAC TCC-3'
L4	5'-GCC ATG ATC CTA GTT AAG-3'
Primer A	5'-CGC GTT TGG AAT CAC TAC AGG-3'
Primer D	5'-AAC TTG CGG GGT TTT TCA GT-3'
Primer B	5'-GCG ACA TCA TCA TCG GAA GA-3'
Primer C	5'-GCA TGC CGG TAG AGG TGT-3'
pYD3	5'-AGA <u>GAG CTC</u> CGC CAA GCT CGG AAT TAA CCC-3' ( <i>SacI</i> )
pYD4	5'-GGT ATC TAG <u>GTC GAC</u> GCT AAG AAA TAG GTT ATT ACT GAG-3' ( <i>SalI</i> )
p53Uneu	5'-GCG <u>AAT TCG</u> CCC CTG CAC CAG CAG CTC CTA-3' ( <i>EcoRI</i> )
p53D	5'-GCG <u>GAT CCT</u> CAG TCT GAG TCA GGC CCT TCT-3' ( <i>BamHI</i> )
Trp1	5'-GTG AGT ATA CGT GAT TAA GCA CAC AAA GGC AGC TTG GAG TCG CTG CAG GTC GAC AAC CCT TA-3'
Trp2	5'-TGC ACA AAC AAT ACT TAA ATA AAT ACT ACT CAG TAA TAA CTA TAG GGA GAC CGG CAG ATC CG-3'
trp1N	5'-ATG GCA TGT CTG GCG ATG-3'
trp2N	5'-CCA ATG GAC CAG AAC TAC-3'
trp3N	5'-CCT CTG TGG AAT CGA CTA-3'
trp4N	5'-GAC TTG AGG CTG ATG GTG-3'
trp5N	5'-AGC TGG TGG ACT GAC GCC-3'

**Tab. 8:** Verwendete Primer für Sequenzierung

Primer	Sequenz	Modifikation
GAD424	5'-TAC CAC TAC AAT GGA TG-3'	5' IRD 800
GBT9	5'-TCA TCG GAA GAG AGT AG-3'	5' IRD 800

Alle in den Tabellen 7 und 8 aufgeführten Primer wurden von MWG, Ebersberg bezogen.

### 2.1.3. Medien

#### 2.1.3.1. Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae*

YPD - Medium                      20g Bacto-Pepton, 10g Hefeextrakt, 20 g Glukose  
ad 1l A. bidest

Sporulationsmedium              10g Kaliumacetat, 1g Hefeextrakt, 0,5g Glukose  
ad 1l A. bidest

Die zuvor aufgeführten Medien wurden durch Autoklavieren (120°C, 20min) sterilisiert.

Minimalmedium                      900ml A. bidest,  
nach dem Autoklavieren Zugabe von:  
100ml 10x YNB-Glukose, essentielle Aminosäuren je nach  
Auxotrophie

YNB-CAA-Medium                  6,7g YNB, 5,0g Casamino Acids, 900ml A. bidest,  
nach dem Autoklavieren Zugabe von:  
100ml 20%ige Glukose- oder Galaktoselösung (sterilfiltriert),  
essentielle Aminosäuren je nach Auxotrophie

YPD-Medium und Minimalmedium wurden unter Zusatz von 15g Agar / 1l Medium auch als Festmedien verwendet.

3-AT-Platten                          Minimalmedium, 1,5% (w/v) Agar,  
nach dem Autoklavieren Zugabe von:  
5-10 mM 3-Aminotriazol, 100µg/ml Ampicillin (SL 100mg/ml)

G-418-Platten                          YPD-Medium, 1,5% (w/v) Agar,  
nach dem Autoklavieren Zugabe von:  
200mg/l G-418 (SL 100mg/ml)

#### 2.1.3.2. Medien zur Anzucht von *E. coli*

LB-Medium                              10g Bacto-Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl  
ad 1l A. bidest

LBA-Medium                            LB-Medium, nach dem Autoklavieren Zugabe von:  
100µg/ml Ampicillin (SL 100mg/ml)

SOC-Medium                      2g Bacto-Trypton, 0,5g Hefeextrakt, 0,06g NaCl, 0,02g KCl,  
0,2g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0,25g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0,36g Glukose  
ad 100ml A. bidest

Die zuvor aufgeführten Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert. LB-Medium und LBA-Medium kamen unter Zugabe von 15g Agar / 1l Medium auch als Festmedien zum Einsatz.

M9-Platten                      1,5% (w/v) Agar, nach dem Autoklavieren Zugabe von:  
1x M9-Salze, 4% (w/v) Glukose, 1x Aminosäure-SL,  
1mM Thiamin, 0,35mM Prolin, 50µg/ml Ampicillin (SL100mg/ml)

#### 2.1.4. Puffer und Lösungen

##### 2.1.4.1. Lösungen für Medien

10x YNB-Glukose (SL)        6,7g YNB, 20g Glukose  
ad 100ml A. bidest

essentielle Aminosäuren    20mg/l Adenin-Hemisulfat (SL 200mg/100ml); 20mg/l L-Histidin  
(SL 1g/100ml); 30mg/l L-Leucin (SL 1g/100ml); 30mg/l L-Lysin  
(SL 1g/100ml); 20mg/l L-Methionin (SL 1g/100ml);  
20mg/l L-Tryptophan (SL 1g/100ml)

5x M9-Salze (SL)            64g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 15g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5g NaCl, 5,0g NH<sub>4</sub>Cl  
ad 1l A.bidest

10x Aminosäuren (SL)        300mg L-Isoleucin, 1,5g L-Valin, 200mg L-Adenin Hemisulfat,  
200mg L-Arginin-HCl, 200mg L-Histidin-HCl, 300mg L-Lysin,  
200mg L-Methionin, 500mg L-Phenylalanin, 2g L-Threonin,  
200mg L-Tryptophan, 300mg L-Tyrosin, 200mg L-Uracil  
ad 1l A. bidest

##### 2.1.4.2. Lösungen für die Transformation von *S. cerevisiae*

Lösung A                      15g Ethylenglykol, 5ml 1M Bicine (pH-Wert 8,35), 91,1g Sorbitol  
ad 500ml A. bidest

Lösung B                      60g PEG 1000, 30ml 1M Bicine (pH-Wert 8,35)  
ad 150ml A. bidest

Lösung C                      1,32g NaCl, 1,5ml 1M Bicine (pH-Wert 8,35)  
ad 150ml A. bidest

1M Lithiumacetat  
50% (w/v) PEG3350

#### 2.1.4.3. Lösungen für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

TFB I 30mM Kaliumacetat (SL 3M, pH-Wert 6,0), 50mM MnCl<sub>2</sub>  
(SL 1M), 100mM KCl (SL 3M), 10mM CaCl<sub>2</sub> (SL 1M),  
15% (w/v) Glycerin

TFB II 10mM MOPS (SL 1M, pH-Wert 7,0), 75mM CaCl<sub>2</sub> (SL 1M),  
10mM KCl (SL 4M), 15% (w/v) Glycerin

10% (w/v) Glycerin

Alle zuvor aufgeführten Lösungen wurden sterilfiltriert.

#### 2.1.4.4. Puffer zur Präparation von Plasmid-DNA und genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

TE-Puffer 10mM Tris/HCl (pH-Wert 8,0), 1mM EDTA (pH-Wert 8,0)

Lysispuffer 10mM Tris/HCl (pH-Wert 8,0), 1mM EDTA (pH-Wert 8,0),  
100mM NaCl, 1% (w/v) SDS, 2% (w/v) Triton X-100

20% (w/v) SDS

3M Kaliumacetat (pH-Wert 5,2)

#### 2.1.4.5. Lösungen zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

GTE 2,5ml 1M Tris/HCl (pH-Wert 8,0), 2ml 0,5M EDTA,  
0,9g Glukose  
ad 100ml A. bidest

Lösung 1 50mg Lysozym ad 5ml GTE

Lösung 2 0,5ml 20% SDS, 1,0ml 1N NaOH  
ad 10ml A. bidest

Lösung 3 60ml 5M Kaliumacetat, 11,5ml Essigsäure  
ad 100ml A. bidest

9M Lithiumchlorid

70% Ethanol

**2.1.4.6. Puffer und Lösungen für die PCR**

2mM dNTP-SL                      20µl dATP, 20µl dCTP, 20µl dGTP, 20µl dTTP (SL jeweils 100mM) ad 1ml A. bidest

Sphäroplastpuffer                1,2 mM Sorbitol, 100mM NaPO<sub>4</sub>, 2,5mg/ml Zymolyase

**2.1.4.7. Puffer und Lösungen für die Sequenzierung**

10x TBE-Puffer                    162g Tris Base, 27,5g Borsäure, 9,3g EDTA  
ad 1l A. bidest

4%iges PAA-Gel (40cm)        21g Harnstoff, 6ml 10x TBE, 6ml Long Ranger-Solution,  
zum Start der Polymerisation Zugabe von 300µl 10%iges APS,  
30µl TEMED

**2.1.4.8. Puffer und Lösungen für die DNA-Gelelektrophorese**

50x TAE-Puffer                    242g Tris Base, 57,1ml Essigsäure,  
100ml 0,5M EDTA (pH-Wert 8,0)  
ad 1l A. bidest

Gelladepuffer                    40% (w/v) Saccharose, 1% (w/v) SDS,  
0,25% (w/v) Bromphenolblau

Ethidiumbromid-SL              10mg Ethidiumbromid/ml

**2.1.4.9. Puffer und Lösungen für den β-Galaktosidase-Test**

Z-Puffer                            16,1g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 5,5g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,75g KCl,  
0,25g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
ad 1l A. bidest

X-Gal-SL                            20mg X-Gal/1ml DMF

Z-Puffer/X-Gal-Lösung        10ml Z-Puffer, 27µl β-Mercaptoethanol, 167µl X-Gal-SL

Z-Puffer/Mercaptoethanol    100ml Z-Puffer, 270µl 2-Mercaptoethanol

ONPG-Lösung                    4mg ONPG/ml Z-Puffer/Mercaptoethanol

1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1% SDS

**2.1.4.10. Weitere Puffer und Lösungen**

10x PBS-Puffer                    80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1l A. bidest

Für die Verwendung in der Durchflußzytometrie wurde der 10x PBS-Puffer vor dem Autoklavieren durch einen Filter mit dem Porendurchmesser 0,2µm filtriert, um evtl. vorhandene ungelöste Partikel und Verunreinigungen zu entfernen.

1x PBS/BSA	1x PBS-Puffer, 1mg/ml BSA (SL 10mg/ml)
Zymolyase-Lösung	10µl Zymolyase-SL (5mg Zymolyase, 800µl 50% Glycerin, 200µl A. bidest) ad 50µl A. bidest

### 2.1.5. Kits, Chemikalien, Kleinmaterialien

QIAquick PCR Purifikation Kit, QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAGEN, Hilden)

„Ultrafree-DA“ (MILLIPORE, Bedford, MA, USA)

Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP, dNTP-SL (Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg)

NucleoSpin Multi 96 Extract Kit (MACHERY-NAGEL, Düren)

Borsäure (p.a. 99,8%), Chloroform, 100% Essigsäure (p.A.), 96% Ethanol (p.A.), Ethidiumbromid, Glasperlen (Ø 0,45-0,5mm), Glycerin, Harnstoff, 2-Propanol, Kaliumacetat, KCl, Lithiumchlorid, 2-Mercaptoethanol, MOPS, NaCl, PEG1000, PEG 3350, Phenol/Chloroform, Saccharose, Sorbitol, Tris-Base, Tris-HCl, (Roth, Karlsruhe)

Agar, Bactopecton, Bactotrypton, Casaminoacids, YNB (DIFCO, Detroit, MI, USA)

Agarose (ultra pure), Geneticin (G-418 Sulfat), pUC19 Monomer DNA (Gibco Life Science Technologies, Karlsruhe)

Aminosäuren, 3-Amino-1,2,4-Triazol, Bicine, BSA, Lachssperma-DNA (Salmon Testes DNA, 10mg/ml), Lithiumacetat, o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid (ONPG), Thiamin, Whatmann-Filterpapiere (Ø 70mm bzw. 125mm) (Sigma, Deisenhofen)

Ampicillin, Bromphenolblau, Ethylenglycol, TEMED, Triton X-100 (Serva, Heidelberg)

DMF, DMSO, EDTA, Glukose, Galaktose, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt)

APS (Amoniumpersulfat, Amresco, Solon, Ohio, USA)

Long Ranger Solution (50%ige SL, Biozym, Oldendorf)

CaliBRITE™ Beads (CaliBRITE™ three color kit, BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

AlignFlow™ (Ø 6µm, Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,2cm, Bio-Rad, München)

Filter (Porendurchmesser 0,2µm, Ø 50mm), Samtstempel (Replica Plater), (Schleicher & Schüll, Dassel)

X-Gal (5-Bromo-4 chloro-3-indolyl-β-D-galactosid, BTS, St. Leon-Rot)

### **2.1.6. Enzyme, Marker, Antikörper**

Restriktionsendonukleasen, T4-Ligase (Gibco Life Science Technologies, Karlsruhe)

*Pwo*-Polymerase (Roche, Mannheim)

*Taq*-Polymerase in Storage Buffer A (Promega, Mannheim)

REDTAQ™ DNA Polymerase, Lysozym (Sigma, Deisenhofen)

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (USB, Cleveland, USA)

Zymolyase aus *Arthrobacter luteus* (100U/g, Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan)

DNA-Längenstandards VII (0,4-8kb) und IX (72-1353bp) (Roche, Mannheim)

Anti-V5-Antikörper (Ig2a, Maus) (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Fluorescein-konjugierter Ziege Anti-Maus Antikörper (IgG), R-Phycoerythrin-konjugierter

Ziege Anti-Maus-Antikörper (IgG) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

### **2.1.7. Geräte**

FACStar Plus mit Turbosort Option (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)

Sequenzierer „LiCOR“ (MWG, Ebersberg)

UV/VIS Spektrophotometer (Beckmann Coulter, Krefeld)

PCR-Gerät „Genius“ (TECHNE, Duxford, Cambridge, UK)

PCR-Gerät „Gene Amp PCR-System 9600“ (Perkin Elmer, Langen)

Horizontale Gelelektrophoreseapparatur (Biorad, München)

Mikromanipulator (Singer Instruments, Somerset, England)

Elektroporationsgerät „Gene Pulser“ (Bio-Rad, München)

Fluoreszenzmikroskop Olympus BX51 (Olympus Optical Co. LTD, Tokyo, Japan)

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Anzucht und Aufbewahrung der Mikroorganismen**

Flüssigkulturen von *Saccharomyces cerevisiae* wurden in YPD-Medium bei einer Temperatur von 30°C auf einem Rotationsschüttler (180rpm) angezogen. Mit Plasmiden transformierte Hefezellen wurden unter gleichen Bedingungen in entsprechendem Minimalmedium kultiviert, um den Erhalt und die Replikation des jeweiligen Plasmides in der Zelle zu gewährleisten. Die Kultivierung auf adäquaten Festmedien erfolgte ebenfalls bei 30° in einem Brutschrank.

*Escherichia coli* wurde in Flüssigkultur in LB-Medium bei 37°C auf einem Rotationsschüttler (180rpm) kultiviert. Für Plasmidtragende und gegen Ampicillin resistente Klone kam LBA-Medium zum Einsatz. Kulturen auf den entsprechenden Festmedien wurden in einem Brutschrank bei 37°C angezogen.

Für die dauerhafte Konservierung von *S. cerevisiae* und *E.coli* wurden Glycerinkulturen in 25% Glycerin (v/v) angelegt und diese bei -70°C aufbewahrt.

## **2.2.2. Transformation von *S. cerevisiae***

### **2.2.2.1. Transformation nach KLEBE et al. 1983**

#### **Herstellung kompetenter Hefezellen**

Für die Vorkultur wurden 10ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Hefestammes beimpft und über Nacht unter den beschriebenen Standardbedingungen herangezogen. Um die Hauptkultur zu starten, wurden 2ml der Vorkultur in 100ml YPD-Medium überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 kultiviert. Die Messung der OD<sub>600</sub> erfolgte in einer Verdünnung von 1:10 gegen steriles YPD-Medium. Nach Abschluß der Hauptkultur konnten die Zellen durch 5minütige Zentrifugation bei 2000 x g geerntet werden. Das erhaltene Zellpellet wurde in 50ml Lösung A resuspendiert und anschließend nochmals zentrifugiert. Unter Zugabe von 2ml Lösung A wurden die Zellen gelöst und mit 110µl DMSO versetzt. Nach guter Durchmischung konnten die kompetenten Zellen zu je 200µl in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert und zur Lagerung bei -70°C eingefroren werden. Die auf diese Weise konservierten Zellen waren bis zu einem halben Jahr haltbar und für die Transformation einsetzbar.

#### **Transformation kompetenter Hefezellen**

Die zu transformierende DNA wurde in einer Konzentration von etwa 200ng auf die gefrorenen kompetenten Zellen gegeben und diese einem 5minütigem Hitzeschock bei 37°C unter mäßigem Schütteln ausgesetzt. Nach anschließender Zugabe von 1ml Lösung B wurden die Zellen eine Stunde bei 30°C geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen 5min bei 1100 x g zentrifugiert, das erhaltene Zellpellet in 1ml Lösung C resuspendiert und erneut 5min zentrifugiert. Nach dem Lösen in 100µl Lösung C konnten die transformierten Zellen auf dem jeweiligen Selektionsmedium ausplattiert und für 2-3 Tage inkubiert werden.

### **2.2.2.2. Transformation nach der Lithiumacetat-Methode (GIETZ et al., 1995)**

Diese Methode erwies sich in Bezug auf die Anzahl der erhaltenen Transformanden als effizienter im Vergleich zu der im vorraus beschriebenen Transformationsmethode nach



KLEBE. Die Lithiumacetatmethode wurde deshalb bevorzugt für die Transformation von Genbanken und zur Integration von Disruptionskassetten angewandt.

### **Herstellung kompetenter Hefezellen**

Eine Einzelkolonie des zu transformierenden Hefestammes wurde in 10ml YPD-Medium angeimpft und über Nacht kultiviert. Nach Bestimmung der  $OD_{600}$  wurde die Kultur auf eine  $OD_{600}$  von etwa 0,3 in 50ml YPD-Medium verdünnt und 3 Stunden als Hauptkultur angezogen. Anschließend wurden die Zellen 5min bei 2000 x g zentrifugiert und durch Lösen in 20ml sterilem A. bidest gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 2ml A. bidest aufgenommen und noch einmal zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 2ml 100mM Lithiumacetat, welches aus einer 1M Stammlösung frisch hergestellt wurde, gelöst und für 20min bei 30°C in einem Thermoblock geschüttelt. Während der Inkubationszeit konnte aus der 1M Lithiumacetatlösung und einer 50% PEG3350-Lösung eine 100mM/40% PEG3350-Lösung hergestellt werden, die zur vollständigen Durchmischung mehrmals geschüttelt werden mußte.

Die kompetenten Zellen waren nicht für eine längere Aufbewahrung geeignet und mußten sofort für die Transformation eingesetzt werden.

### **Transformation der kompetenten Hefezellen**

Vor Beginn der Transformation mußte Lachssperma-DNA, die als Träger-DNA Verwendung fand, durch 10minütiges Kochen denaturiert und deren Renaturierung durch sofortige Lagerung auf Eis verhindert werden. Die zu transformierende DNA wurde in einer Konzentration von ca. 200ng für Plasmidtransformationen bzw. ca.1µg für Integrationen mit 5µl (10mg/ml) der denaturierten Lachssperma-DNA in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt. Anschließend wurden 100µl kompetente Zellen je Reaktionsgefäß zugegeben und die Transformationsansätze 20min bei 30°C unter mäßigem Schütteln inkubiert. Nach der Zugabe von je 600µl der frisch hergestellten 100mM/40% PEG3350-Lösung und gutem Mischen erfolgte eine weitere Inkubation für 20 Min bei 30°C. Anschließend wurden 80µl DMSO hinzugefügt, gut gemischt und die Zellen für 10min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Zentrifugation bei 3700 x g für 1min konnte der Lithiumacetat/PEG-Überstand vorsichtig entfernt werden.

Bei Plasmidtransformationen wurden die Zellen danach mit 1ml TE-Puffer gewaschen und 3min bei 2000 x g zentrifugiert. Im Anschluß daran wurden die transformierten Zellen in 100µl TE-Puffer aufgenommen, auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert und 2-3 Tage inkubiert. Bei der Transformation von Genbanken wurden auf einer 150mm-Platte drei Transformationsansätze ausplattiert.

Für die Integration von Disruptionskassetten wurden die Hefen nach dem Hitzeschock ebenfalls 1min bei 3700 x g zentrifugiert und nach Absaugen des Überstandes in 1ml YPD-

Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Reagenzgläser, die 2ml YPD-Medium enthielten, überführt und drei Stunden bei 30°C geschüttelt. Dieser Inkubationsschritt sollte den Zellen die Expression des Resistenzmarkers ermöglichen, bevor sie nach 3minütiger Zentrifugation und anschließendem Resuspendieren in 100µl YPD-Medium auf G-418-Platten ausplattiert wurden. Nach 3tägiger Kultivierung war es notwendig, die Transformanten aufgrund des hohen Hintergrundes an nicht resistenten Klonen auf frische G-418-Platten zu überstempeln bzw. auszustreichen und weitere 2 Tage zu inkubieren.

### **2.2.3. Transformation von *E. coli***

#### **2.2.3.1. Transformation nach der Methode von HANAHAIN (1983)**

##### **Herstellung kompetenter *E. coli* - Zellen**

Für die Vorkultur wurden 5ml LB-Medium mit einer Impföse Zellmaterial aus einer Glycerinkultur des entsprechenden Stammes beimpft und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Die Hauptkultur bestand aus 100ml LB-Medium, welches mit 10mM KCl und 20mM MgSO<sub>4</sub> versetzt, auf 37°C vorgewärmt und anschließend mit 1ml der Vorkultur beimpft wurde. Nach 2stündiger Inkubation bei 37°C konnten die Zellen bei einer OD<sub>600</sub> = 0,6 durch 5minütige Zentrifugation bei 2500 x g und 4°C geerntet werden. Nachfolgend wurden die Zellen vorsichtig in 15ml eiskaltem TFBII resuspendiert und 10min auf Eis gekühlt. Das nach erneuter 10minütiger Zentrifugation bei 2500 x g und 4°C erhaltene Zellpellet wurde getrocknet und anschließend in 2ml TFBII aufgenommen. Die Zellen konnten nun zu je 200µl in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert werden und waren bei einer Lagerung bei -70°C bis zu einem halben Jahr haltbar und für die Transformation einsetzbar.

##### **Transformation kompetenter *E. coli* - Zellen**

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der zu transformierenden DNA gemischt. Einer 30minütiger Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2min. Nachfolgend wurden die Zellen mit 1ml LB-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Sedimentation der Zellen bei 2500 x g konnten sie in 100µl LB-Medium aufgenommen, auf LBA-Platten ausplattiert und über Nacht inkubiert werden.

#### **2.2.3.2. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation**

##### **Herstellung kompetenter *E. coli* - Zellen für die Elektroporation**

Als Vorkultur diente eine Über-Nacht-Kultur des *E. coli* - Stammes HB101 in 10ml LB-Medium. Mit 2ml dieser Kultur wurde die Hauptkultur beimpft und etwa 3h bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 bei 37°C geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für

20min auf Eis gekühlt und anschließend 15min bei 2500 x g sedimentiert. Durch Resuspendieren in 200ml gekühltem A. bidest wurden die Zellen gewaschen und anschließend erneut 5min bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 100ml kaltem A. bidest aufgenommen, mit 5ml 10%igem Glycerol versetzt und unter den gleichen Bedingungen wie im vorhergehenden Arbeitsschritt zentrifugiert. Nach Lösen des Pellets in 2ml 10%igem Glycerol konnten die Zellen zu je 40µl in gekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert werden. Die kompetenten Zellen waren bei einer Lagerung bei -70°C bis zu einem halben Jahr verwendbar.

### **Elektroporation kompetenter *E. coli* - Zellen**

Nachdem die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der zu transformierenden DNA gemischt wurden, konnten sie in gekühlte Elektroporationsküvetten überführt werden. Unmittelbar nach dem kurzzeitigen Anlegen des elektrischen Feldes (2,5V, Kapazität: 250µFD, Widerstand: 200Ω) in einer Elektroporationsappartur wurde 1ml SOC-Medium in die Küvetten gegeben und nachfolgend der gesamte Ansatz in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Im Anschluß an die einstündige Inkubation der Zellen bei 37°C wurden diese 5min bei 2500 x g sedimentiert, in 100µl LB-Medium aufgenommen und auf LBA-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte für etwa 24 Stunden bei 37°C.

### **2.2.4. Isolierung von DNA**

#### **2.2.4.1. Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae***

Um genomische Hefe-DNA für nachfolgende PCR zu isolieren, wurden zunächst 10ml YPD-Medium mit einer Einzelkolonie des Wildtypstammes S288C beimpft und über Nacht kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgt durch 5minütiges Zentrifugieren bei 3500 x g. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1ml TE-Puffer resuspendiert und nach erneutem Zentrifugieren für 5min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen in 2ml TE-Puffer aufgenommen, mit 3% SDS versetzt und unter gelegentlichem Schwenken 15min bei RT inkubiert. Eine erste Reinigung des Zelllysates konnte durch Zugabe von 2ml Phenol/Chloroform und nachfolgende Zentrifugation für 10min bei 3500 x g erreicht werden (Phenol/Chloroform-extraktion). Der wäßrige Überstand wurde in ein neues Falcongefäß übertragen und 0,6ml 3M Kaliumacetat (pH-Wert 5,2) zugegeben. Nach erneutem 20minütigem Zentrifugieren bei 3500 x g wurde der erhaltene Überstand mit 3ml Isopropanol versetzt. Nach 5minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugieren für 10min bei 3500 x g konnte die DNA gefällt werden. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 200µl 70% igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 30µl A. bidest gelöst.

#### **2.2.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae* („Plasmid-Rescue“)**

Da Plasmide in *S. cerevisiae* nur in einer geringen Kopienzahl pro Zelle vorliegen, mußte die Plasmid-DNA aus einer Kultur, welche sich in der stationären Phase des Wachstums befindet, isoliert werden. Dazu wurden 10ml des entsprechenden Minimalmediums mit einer Einzelkolonie des Plasmid tragenden Hefestammes beimpft und mindestens 36 Stunden kultiviert. In drei parallelen Ansätzen wurden jeweils 1,5ml dieser Kultur in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge sedimentiert. Die pelletierten Zellen wurden in je 200µl Lysispuffer resuspendiert und anschließend nach Zugabe von 200µl Phenol/Chloroform und einer kleinen Spatelspitze Gasperlen durch 2minütiges starkes Schütteln aufgeschlossen. Nach 5minütigem Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit konnten die Überstände der drei parallelen Ansätze vereinigt und das Zelllysate durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt werden. Eine anschließende Reinigung mit Chloroform/Isoamylalkohol entfernte sämtliche Phenolrückstände. Nachdem der DNA-Lösung 60µl einer 1M NaCl-Lösung zugegeben wurden, erfolgte die Fällung der DNA durch Hinzufügen von 600µl Isopropanol und 15minütiges Zentrifugieren. Anschließend wurde das Pellet dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl TE-Puffer gelöst.

Für nachfolgende Untersuchungen mußte die isolierte DNA zunächst in *E. coli* vermehrt werden. Dazu wurden 2µl DNA mittels Elektroporation in kompetente Zellen des *E. coli* - Stammes HB101 transformiert. Da HB101 Leucin-auxotroph ist, konnten durch Ausstreichen der Transformanten auf das Leucin-freie Medium M9 jene Klone gezielt isoliert werden, die ein Plasmid mit Leucin als Selektionsmarker trugen.

#### **2.2.4.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini- und Maxipräparationen)**

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte nach einer veränderten Methode der alkalischen Lyse von BIRNBOIM und DOLY (1979). In der nachfolgenden Beschreibung der Methode sind die Volumina der verwendeten Lösungen und die Inkubationszeiten für DNA-Minipräparationen und in Klammern für DNA-Maxipräparationen aufgeführt.

Aus einer 5ml (50ml)-Über-Nacht-Kultur der entsprechenden Bakterien in LBA-Medium wurden 1,5ml (50ml) in ein Reaktionsgefäß überführt und bei maximaler Geschwindigkeit für 5min (10min) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100µl (2,5ml) Lösung 1 resuspendiert und anschließend 5min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 200µl (3ml) Lösung 2 und unter leichtem Schwenken der Reaktionsgefäße erfolgte während der 5minütigen Inkubation bei Raumtemperatur die Lyse der Zellen. Im Anschluß daran wurden Proteine, chromosomale DNA und Lipide durch Zugabe von 150µl (4,5ml) Lösung 3 und 5minütiger (15minütiger) Inkubation auf Eis ausgefällt. Nach Abtrennung dieser Bestandteile durch Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C für 10min (15min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit 500µl (8ml) Isopropanol gemischt. Das auf diese Weise

gefällte Nukleinsäure-Gemisch konnte nach 5minütiger (15minütiger) Zentrifugation in 100 $\mu$ l (400 $\mu$ l) TE-Puffer gelöst werden. Durch Zugabe von 100 $\mu$ l (400 $\mu$ l) 9M Lithiumchlorid und anschließender Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 15min (1h) wurden noch vorhandene Proteine und ein großer Teil der ebenfalls isolierten RNA ausgesalzen. Diese Bestandteile konnten dann durch 15minütige Zentrifugation abgetrennt und nachfolgend die DNA im Überstand unter Zugabe von 200 $\mu$ l Isopropanol (400 $\mu$ l eiskaltem Ethanol) gefällt werden. Nach erneuter Zentrifugation für 5min (15min) bei maximaler Geschwindigkeit wurde das erhaltene DNA-Pellet einmal mit 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 40 $\mu$ l (100 $\mu$ l) A. bidest aufgenommen. Für eine nachfolgende Restriktionsanalyse der isolierten DNA wurden 5 $\mu$ l (1 $\mu$ l) DNA eingesetzt.

Die Konzentration der isolierten DNA konnte photometrisch bestimmt werden. Dazu wurden die Extinktionen  $E_{260}$  und  $E_{280}$  einer geeigneten Probenverdünnung am Spektralphotometer ermittelt und die Konzentration errechnet.

Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  ermöglicht Rückschlüsse auf die Reinheit der Präparation, ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 spricht für eine reine Präparation (SAMBROOK et al., 1989).

#### **2.2.4.4. Isolierung der DNA aus Genbanken in *E. coli***

Die Isolierung der DNA aus Genbanken in *E. coli* zur späteren Verwendung in *S. cerevisiae* erfolgte ebenfalls in Anlehnung an die Methode von BIRNBOIM und DOLY (1979).

Dazu wurden zunächst die auf LBA-Platten befindlichen Transformanten unter Zugabe von 10ml LBA-Medium pro 100mm-Platte bzw. 20ml pro 150mm-Platte vorsichtig abgeschwemmt. In einem Gesamtvolumen von 2l LBA-Medium wurden die Bakterienzellen 4h bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert, anschließend zu gleichen Volumina auf 6 sterile 500ml-Zentrifugengefäße aufgeteilt und 30min bei 3700 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 25ml Lösung 1 pro Zentrifugengefäß wurden die Pellets durch starkes Schütteln gelöst und 10min bei RT inkubiert. Im Anschluß an die Addition von 30ml Lösung 2 pro Gefäß und 10minütige Inkubation wurden jeweils 45ml Lösung 3 hinzugefügt und die Gefäße 30min auf Eis belassen. Nach 30minütiger Zentrifugation konnten die Überstände vereinigt werden. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde die Lösung mit 600ml Isopropanol gemischt, anschließend gleichmäßig auf 5 sterile 250ml-Zentrifugengefäße aufgeteilt und über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  belassen. Das nach einstündigem Zentrifugieren erhaltene Pellet wurde in 4ml TE-Puffer pro Gefäß gelöst, die Lösungen in einem Falcongefäß vereinigt und nachfolgend zweimal eine Phenol/Chloroform-Extraktion mit je 20ml Phenol/Chloroform durchgeführt. Die Nukleinsäurefällung aus dem wäßrigen Überstand erfolgte nach Zugabe von 20ml Isopropanol über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Es folgte eine Zentrifugation für 30min bei 3700 x g. Das Pellet wurde in

4ml TE-Puffer aufgenommen und einer Lithiumchloridfällung, wie unter 2.2.4.3. beschrieben, unterzogen. Das gereinigte Pellet wurde anschließend in 2ml A. bidest gelöst.

## **2.2.5. Bearbeitung isolierter DNA**

### **2.2.5.1. DNA-Restriktionsanalyse**

Zur Überprüfung isolierter Plasmid-DNA und zur Klonierung unterschiedlicher DNA-Fragmente wurde die Spaltung von DNA mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen angewandt. Die Spaltungsprodukte wurden anschließend unter Verwendung der horizontalen Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.5.5.) aufgetrennt. Für die Analyse der aus Plasmidminipräparationen gewonnenen DNA wurden jeweils 5-8µl Plasmid-DNA (0,5 - 1µg) mit 2U des entsprechenden Restriktionsenzym gespalten. Die Inkubation erfolgte in 20µl-Ansätzen unter Zugabe von 2µl des jeweiligen 10x Reaktionspuffers für eine Stunde bei der für das Enzym optimalen Temperatur. Die präparative DNA-Hydrolyse für nachfolgende Klonierungen wurde in dementsprechend größeren Ansätzen durchgeführt. Die Inkubationsdauer verlängerte sich je nach eingesetzter DNA- und Enzymmenge auf 2-3 Stunden.

### **2.2.5.2. Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA**

Bei Ligationsansätzen, denen eine Präparation von Vektor und Insert durch hydrolytische Spaltung mit nur einem Restriktionsenzym vorausging, war mitunter zunächst eine Dephosphorylierung des Vektors mittels alkalischer Phosphatase aus Garnelen (Shrimp alkaline phosphatase) notwendig. Für die Dephosphorylierung der Vektoren bei der Herstellung der HCMV-Genbanken wurden pro Ansatz ca. 5µg linearisierte Plasmid-DNA mit 1U alkalischer Phosphatase nach den Empfehlungen des Herstellers inkubiert und das Enzym anschließend inaktiviert. Bevor die dephosphorylierte DNA für weitere Klonierungsschritte verwendet werden konnte, mußte die alkalische Phosphatase durch Reinigung mit dem „QIAquick PCR Purifikation Kit“ entfernt werden. Der Erfolg der Dephosphorylierung wurde durch Ligation des Vektors ohne Insert (Religation) und anschließende Transformation in *E. coli* kontrolliert.

### **2.2.5.3. Amplifikation von DNA mit PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) wurde zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden jeweils im 50µl-Maßstab durchgeführt und das Reaktionsgemisch abschließend mit 50µl Mineralöl überschichtet. Reaktionen mit isolierter Plasmid- oder genomischer DNA als Matrize erfolgten nach dem nachstehenden Standardprotokoll. Für alle Reaktionen kam ein Gemisch aus *Taq*-Polymerase (5U/µl) und *Pwo*-Polymerase (5U/µl) (5:1) zum Einsatz, welches dem Reaktionsgemisch erst nach der Erst-Denaturierung zugegeben wurde.

Reaktionsansatz:	1µl	DNA-Matrize in entsprechender Konzentration (ca. 10-20ng)
	1µl	Primer 1 (100pmol/µl)
	1µl	Primer 2 (100pmol/µl)
	5µl	dNTP-Gemisch (2mM SL)
	5µl	10x <i>Taq</i> -Polymerase-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>
	0,4µl	Polymerasegemisch (2U)
	36,6µl	A. bidest

Bei einigen Reaktionen wurden im Zuge der PCR-Optimierung dem Reaktionsansatz 2,5µl DMSO zugesetzt bzw. die Konzentration der DNA-Matrize verändert.

Folgendes PCR-Programm wurde standardmäßig angewandt:

Erst-Denaturierung	94°C	5min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	30s	
Primeranlagerung	54-65°C	30s	25 Zyklen
Verlängerung	72°C	1-4,5min	
End-Verlängerung	72°C	10min	1 Zyklus
Kühlen	4°C		

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA und Plasmid-DNA direkt aus Hefezellen (verändert nach KLEBANOW und WEIL, 1999 und SCHENK et al.,1996) war es zunächst notwendig, die Zellwände zu lysieren. Dies geschah durch Suspendieren einer Impföse des entsprechenden Zellmaterials in Sphäroplastenpuffer und nachfolgendem Inkubieren bei 37°C für 10min. Die erhaltene Sphäroplastenlösung konnte anschließend direkt als Matrize für die PCR eingesetzt werden. Als sehr zuverlässig erwies sich für diese Anwendung die REDTAQ™ DNA- Polymerase (1U/µl). Die Reaktionsansätze wurden nach dem folgenden Protokoll zusammengestellt und abschließend mit 50µl Mineralöl überschichtet.

Reaktionsansatz:	1µl	Sphäroplastensuspension
	1µl	Primer 1 (25pmol/µl)
	1µl	Primer 2 (25pmol/µl)
	5µl	dNTP-Gemisch (2mM SL)
	5µl	10x REDTAQ™ – Puffer
	2,5µl	REDTAQ™ – Polymerase (2,5U)
	34,5µl	A. bidest

Für die PCR mit Sphäroplasten als Matrize kam folgendes PCR-Programm zum Einsatz:

Erst-Denaturierung	94°C	5min	1 Zyklus
Denaturierung	94°C	1min	
Primeranlagerung	55°C	1min	40 Zyklen
Verlängerung	72°C	2min	
End-Verlängerung	72°C	10min	1 Zyklus
Kühlen	4°C		

Die amplifizierten Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und vor der weiteren Verwendung für Klonierungen bzw. Sequenzierung mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Herstellerangaben gereinigt.

#### 2.2.5.4. Ligation von DNA

Zur Ligation überhängender bzw. glatter DNA-Enden wurde das Insert im Verhältnis zum Vektor in 3-10fachem molarem Überschuß eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 bzw. 20µl und die Ligation erfolgte unter Zugabe von 1U bzw. 2U T4-Ligase und 1x Ligationspuffer bei 16°C über Nacht. Der gesamte Reaktionsansatz wurde nach der Ligation in eine Portion kompetenter *E. coli*-Zellen (200µl) transformiert.

#### 2.2.5.5. DNA-Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten erfolgte je nach DNA-Größe in 0,8-1,5%igen 1x TAE-Agarosegelen mit 1x TAE Elektrophoresepuffer bei 7-9V/cm Elektrodenabstand. Den Agarosegelen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1µg/ml zugegeben. Vor dem Austragen auf das Agarosegel wurden die DNA-Proben mit 0,2 Vol. Gelladepuffer versetzt. Als Größenstandard dienten kommerziell erhältliche DNA-Längenstandards von 0,4- 8,6kb bzw. von 72-1353bp.

#### 2.2.5.6. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „QIAquick Gel Extraktion Kit“ nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl A. bidest. Weiterhin kamen „UltraFree-DA“- Extraktionsröhrchen zum Einsatz. Im Anschluß an diese Extraktion war hier mitunter eine DNA-Fällung aus dem Puffer mit Isopropanol notwendig.

#### 2.2.5.7. Sequenzierung von DNA

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza dGTP“ durchgeführt. Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde eine DNA-Konzentration von 0,5-2µg eingesetzt, bei der Sequenzierung von PCR-Produkten dagegen nur ca. 10ng. Die zu sequenzierende DNA wurde mit 2pmol des entsprechenden Sequenzierprimers in einem Gesamtvolumen von 17µl gemischt.



Daraus wurden jeweils 4µl zu 2µl des vom Hersteller gelieferten Reaktionsgemisches gegeben, welches je ein Nukleotid auch als terminierendes Didesoxynukleotid enthielt. Pro Probe erfolgte die Sequenzierreaktion demnach in 4 Ansätzen zu jeweils 6µl, die abschließend mit 50µl Mineralöl überschichtet wurden.

Für die Sequenzierreaktion wurde standardmäßig folgendes PCR-Programm angewandt:

Erst-Denaturierung	95°C	5min	1 Zyklus
Denaturierung	95°C	30s	
Primeranlagerung	60°C	30s	30 Zyklen
Verlängerung	70°C	1min	
Kühlen	4°C		

Im Anschluß an die PCR wurden jedem Reaktionsansatz 3µl des mitgelieferten Gelladepuffer zugegeben und jeweils 1,3µl auf ein 4%iges PAA-Gel aufgetragen. Die Analyse der Sequenzen erfolgte mit dem Sequenziergerät LiCOR und der dazugehörigen Software.

## 2.2.6. Funktionelle Untersuchungen in *S. cerevisiae*

### 2.2.6.1. Kreuzung haploider *S. cerevisiae* - Stämme und Tetradenanalyse

#### Kreuzung auf Festmedien und anschließende Tetradenanalyse

Um zwei haploide Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps (*MATa* bzw. *MATα*) miteinander zu kreuzen wurden die beiden Stämme auf einer YPD-Platte vermischt. Nach 6-8stündiger Inkubation bei 30°C wurde eine Impföse des Zellgemisches auf einem Minimalmedium dünn ausgestrichen, welches nur das Wachstum der diploiden Zellen erlaubte. Nach 2-3tägiger Inkubation konnten die angereicherten diploiden Hefen weiteren Untersuchungen zugeführt oder zur Induktion der Sporulation in 10ml Sporulationsmedium angeimpft werden. Zur Trennung der nach etwa 4tägiger Inkubation bei 30°C und unter Schütteln bei 180rpm gebildeten Tetraden (Sporen) mußte zunächst die Ascuswand entfernt werden. Dazu wurde nach Sedimentation der Zellen etwas Zellmaterial in 100µl Zymolyaselösung resuspendiert und 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurde ein Tropfen der Suspension am Rand einer YPD-Platte ausgestrichen und mit einem Mikromanipulator die vier Sporen jeweils einer Tetrade einzeln aufgenommen und untereinander abgelegt. Nach etwa 3tägiger Inkubation bei 30°C konnten die gekeimten Sporen auf Selektionsmedium übertragen und die neuen haploiden Stämme weiter charakterisiert werden.

### **Kreuzung in Flüssigmedien**

Für die Untersuchung der Proteininteraktionen zweier HCMV-Genbanken im Zweihybrid-System in *S. cerevisiae* wurde jeweils eine Genbank in einen *MAT $\alpha$* -Stamm und die andere Genbank in einen *MAT $\alpha$* -Stamm transformiert. Nach entsprechender Vorselektion (vgl. 3.5.3.) wurden die Zellen sedimentiert, in YPD-Medium gelöst und anschließend in etwa gleichem Verhältnis gemischt. Die Inkubation des Zellgemisches erfolgte als Standkultur bei 30°C für 8-10h. Nachdem das YPD-Medium durch Zentrifugation und zweimaliges Waschen der Zellen mit A. bidest entfernt wurde, konnten die Hefen auf entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert werden.

#### **2.2.6.2. Nachweis von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität**

##### **Filterassay zum Nachweis von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (BREEDEN & NASMYTH , 1985)**

Für jede zu untersuchende Agarplatte wurde ein steriler Whatmannfilter in eine saubere Petrischale gelegt und mit 2ml Z-Puffer/X-Gal-Lösung für 100mm-Petrischalen bzw. 4,5ml für 150mm-Petrischalen getränkt. Auf die mit frischen Kolonien bewachsene Agarplatte wurde ebenfalls ein steriler Whatmannfilter gelegt und mit einem Drigalsky-Spatel leicht angedrückt. Mit einer sterilen Nadel wurden Löcher durch den Filter in den Agar gestochen, um eine spätere Orientierung des Filters auf der Agarplatte zu ermöglichen. Anschließend wurde dieser Filter, an dessen Oberfläche die Hefezellen hafteten, für 10s in flüssigen Stickstoff getaucht. Auf diese Weise erfolgte der Aufschluß der Zellen. Der gefrorene Filter konnte nun mit den Zellen nach oben in die vorbereitete Petrischale gelegt und bei 30°C maximal 24h inkubiert werden.

##### **Flüssigassay zum Nachweis von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (BREEDEN & NASMYTH, 1987)**

In drei parallelen Ansätzen wurden 10 ml Minimalmedium mit einer einer Kolonie der zu untersuchenden Hefe angeimpft und über Nacht inkubiert. Nach Bestimmung der  $OD_{600}$  wurden jeweils 100 $\mu$ l der Kultur in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 700 $\mu$ l Z-Puffer/Mercaptoethanol, 50 $\mu$ l Chlorophorm und 50 $\mu$ l 0,1% SDS pro Reaktionsgefäße wurde jeder Ansatz für 30s kräftig geschüttelt. Parallel wurde eine Kontrolle mit unbewachsenem Medium mitgeführt. Nach Zugabe von 160 $\mu$ l ONPG-Lösung und leichtem Schwenken der Proben erfolgte die Inkubation bei 30°C für 1-3h. Anschließend wurde die Reaktion mit 400 $\mu$ l 1M  $Na_2CO_3$  abgestoppt und die Proben 10min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nachdem Messung der  $OD_{420}$  der Überstände mit der Kontrolle als Leerwert, konnte die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (U) nach folgender Formel berechnet werden:

$$U = 1000 \times OD_{420} / t \times V \times OD_{600}$$

t = Inkubationszeit in min

V = eingesetztes Kulturvolumen in ml

Eine Einheit des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase ist somit definiert als jene Menge Enzym, die 1  $\mu$ mol o-Nitrophenolgalaktose pro Minute und Zelle hydrolysiert.

#### 2.2.6.3. Nachweis der Aktivierung des *HIS3*-Reporters

Die Transkription des *HIS3*-Reportergens wird durch das Promoter-Hybrid  $GAL1_{UAS}$ - $HIS3_{TATA}$  kontrolliert. Dieser Promoter läßt die Bildung der von *HIS3* codierten Imidazolglycerin-Phosphatdehydratase und damit das Wachstum von Zellen in Histidin-freien Medien in einem gewissen Maß auch ohne Aktivierung durch eine Protein-Protein-Interaktion zu. Um feststellen zu können, ob der *HIS3*-Reporter tatsächlich durch eine Interaktion aktiviert wurde, mußte dieser Hintergrund unterdrückt werden. Dies geschah durch Ausplattieren der zu untersuchenden Hefen auf Histidin-freien Festmedien, denen 3-Aminotriazol (3-AT) zugegeben wurde. 3-AT kann als kompetitiver Inhibitor die Aktivität der Imidazolglycerin-Phosphatdehydratase hemmen (WALHOUT & VIDAL, 2001). Die dazu minimal notwendige 3-AT-Konzentration wurde zuvor durch Ausstreichen der nicht mit Plasmiden transformierten *S. cerevisiae*-Stämme auf Medien mit einer entsprechenden 3-AT-Verdünnungsreihe ermittelt.

#### 2.2.6.4. Nachweis der Expression des $\alpha$ -Agglutininrezeptors (BODER und WITTRUP, 1997)

Für die Vorkultur wurden 10ml YNB-CAA-Medium mit Glucose mit einer Einzelkolonie des zu untersuchenden Stammes beimpft und bei 30°C etwa 20h kultiviert. Nach Bestimmung der  $OD_{600}$  wurden die Zellen bei 2000 x g sedimentiert und anschließend in 5ml A. bidest resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde dieser Waschschrift einmal wiederholt und die Zellen nachfolgend in YNB-CAA-Medium mit Galaktose resuspendiert. Dies geschah in einem Volumen, durch welches sich die  $OD_{600}$  auf 0,8 verdünnte und das Weiterwachsen der Kultur in exponentieller Wachstumsphase gewährleistet war. Während der anschließenden Kultivierung der Zellen bei 20°C und 180rpm wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 2 OD-Einheiten Probe genommen und diese bei 4°C gelagert.

Nachdem die Kultivierung abgeschlossen war, konnten die gesammelten Proben bei 4°C und 2000 x g 5min zentrifugiert und das Zellpellet danach in 1ml 1x PBS-Puffer resuspendiert werden. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 250 $\mu$ l 1x PBS/BSA gelöst, mit 1 $\mu$ g Maus-Anti-V5-Antikörper gemischt und unter gelegentlichem Schwenken 30min auf Eis inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Zellen bei 4°C und 2000 x g sedimentiert, mit 1ml 1x PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Danach konnte das Pellet in 250 $\mu$ l 1x PBS/BSA aufgenommen und mit 1 $\mu$ g Fluorescein-konjugiertem Ziege Anti-Maus Antikörper

bzw. 1µg R-Phycoerythrin-konjugiertem Ziege Anti-Maus-Antikörper gemischt werden. Die anschließende 30minütige Inkubation auf Eis fand unter gelegentlichem Schütteln im Dunkel statt, um Photoschäden an den markierten Antikörpern zu vermeiden. Nachfolgend wurden die Zellen bei 4°C und 2000 x g sedimentiert, zweimal mit je 1ml 1x PBS gewaschen und abschließend in 40µl 1x PBS aufgenommen. Die Analyse der markierten Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie.

#### **2.2.6.5. FACS-Analyse**

Zur durchflußzytometrischen Untersuchung fluoreszierender *S. cerevisiae* – Zellen wurde ein FACStar plus mit TurboSort-Einheit und einem Argon-Laser (Excitation: 488nm, Laserstärke: 200mW) verwendet. Die detektierten Emissionswellenlängen lagen im FL1-Kanal bei 530/30 nm und im FL2-Kanal bei 575/26nm. Vor jeder Messung wurden die optischen Einstellungen unter Verwendung von CaliBRITE™ - Beads optimiert. Für die Erstellung eines Tropfenprofils zur Optimierung der Sortiereinstellungen kamen AlignFlow™ - Beads zum Einsatz. Für die Sortierung wurde ein Drop Delay von 12,9-13,1 eingestellt, die Sort Hülle (deflected drops) betrug 2 Tropfen und als Sortier-Modus wurde ‚Normal C‘ gewählt. Die Schwingungsfrequenz der Nozzle für die Sortierung lag bei etwa 28kHz. Die Durchflußrate während der Messung bzw. Sortierung wurde konstant bei etwa 3000 Zellen pro Sekunde gehalten. Als „Sheath-Flüssigkeit“ wurde 1x PBS-Puffer verwendet.

#### **2.2.6.6. Mikroskopische Untersuchung von *S. cerevisiae***

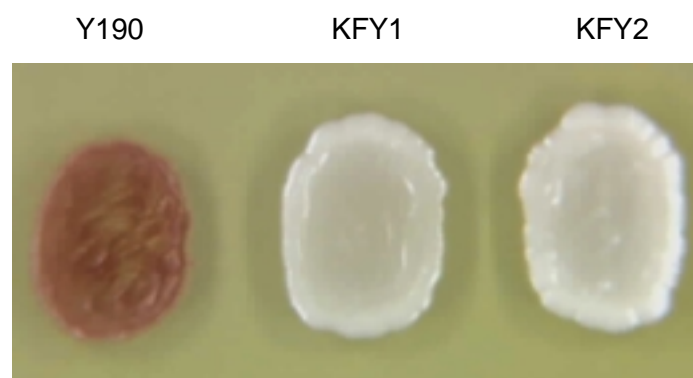
Für mikroskopische Betrachtungen fluoreszierender *S. cerevisiae* - Zellen wurden 2µl Zellsuspension mit 1µl 100% Glycerin vermischt, auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. GFP- und FITC-Fluoreszenz konnte mit dem Filtersatz 450-490nm, Sperrfilter 520nm und PE-Fluoreszenz mit dem Filtersatz 510-560nm, Sperrfilter 590nm beobachtet werden. Die Zellen wurden mit einer Gesamtvergrößerung von 1:1000 betrachtet und fotografiert.

### 3. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Reportersysteme für das Zweihybrid-System in *Saccharomyces cerevisiae* etabliert, die eine effiziente Untersuchung multipler Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe fluoreszenzaktivierter Zellsortierung ermöglichen. In den folgenden Abschnitten wird zunächst auf die Konstruktion entsprechender neuer *S. cerevisiae* - Stämme und deren Charakterisierung eingegangen.

#### 3.1. Konstruktion Adenin-prototropher *S. cerevisiae* - Stämme

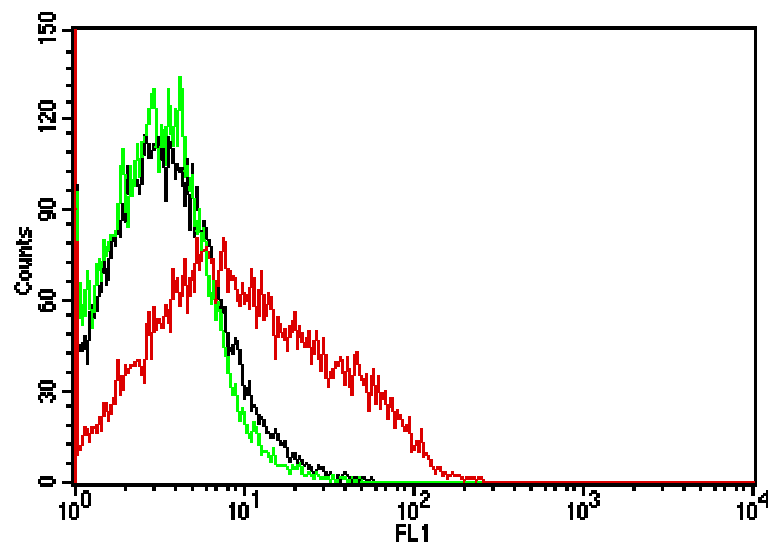
Die von der Firma Clontech angebotenen Reporterstämme für das auf dem Transkriptionsfaktor Gal4p basierende Zweihybrid-System in Hefe sind durch eine Mutation im *ADE2*-Gen (*ade2-100*) Adenin-auxotroph. Diese Zellen bilden in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie z.B. Temperatur, Sauerstoffgehalt und Nährstoffangebot, ein mehr oder minder stark ausgeprägtes rotes Pigment (CHAUDHURI et al., 1996, vgl. Abb. 3). Das Pigment verleiht den Adenin-auxotrophen Stämmen nach Anregung bei 488nm eine Grundfluoreszenz in einem Wellenlängen-Bereich, der sich mit der Emission des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) überlagert (BRUSCHI und CHUBA, 1988, vgl. Abb. 4). Aus diesem Grund konnten diese Hefen nicht als Ausgangsstämme für die Etablierung eines auf grüner Fluoreszenz basierenden Reportersystems verwendet werden. Es war zunächst notwendig, das mutierte *ADE2*-Gen durch intaktes *ADE2* zu ersetzen und auf diese Weise die Bildung des roten Pigmentes zu verhindern.



**Abb. 3:** Vergleich des Adenin-auxotrophen *S. cerevisiae*-Stammes Y190 mit den beiden neu konstruierten, Adenin-prototrophen Stämmen KFY1 und KFY2. Die in Y190 erkennbare rote Pigmentierung wird hervorgerufen durch Akkumulation eines Zwischenproduktes der durch eine Mutation in *ADE2* unterbrochenen Adeninsynthese und unterbleibt bei den Stämmen mit intaktem *ADE2*. Die Zellen wurden auf einer YPD-Platte ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert.

Für den Austausch des mutierten *ADE2* wurde in einem ersten Schritt aus dem *S. cerevisiae*- Wildtyp-Stamm S288C die genomische DNA isoliert. Mit dieser DNA als Matrize konnte das *ADE2*-Gen (1716bp) mittels PCR amplifiziert werden. Die dabei verwendeten Primer ADE1 und ADE2 wurden so gewählt, daß sie in den das *ADE2*-Gen flankierenden Bereichen lagen, d.h. ADE1 63bp stromauf vor dem Startcodon und ADE2 30bp stromab hinter dem Stopcodon. Das amplifizierte Fragment (1808bp) wurde mit Hilfe der Lithiumacetatmethode direkt in die *S. cerevisiae*-Stämme Y190 und Y187 transformiert. Durch homologe genetische Rekombination war eine ortspezifische Intergration des PCR-Produktes und damit ein Austausch des mutierten *ADE2* gegen Wildtyp-*ADE2* möglich (WINNACKER, 1990). Das Transformationsgemisch wurde auf Selektionsmedium ohne Adenin entsprechend der übrigen Auxotrophien der beiden Stämme ausplattiert. Die neuen Stämme KFY1, welcher aus Y190 hervorgegangen war und KFY2, der aus Y187 entstand, sind in Abb. 3 zusammen mit Y190 auf einer YPD-Platte zu sehen. Es ist deutlich erkennbar, daß KFY1 und KFY2 im Gegensatz zu Y190 das rote Pigment nicht mehr bilden und demzufolge ungefärbt sind.

Um vergleichen zu können, in welchem Maße sich die Grundfluoreszenz der Stämme KFY1 und KFY2 im Vergleich zu Y190 bzw. Y187 nach Anregung bei 488nm geändert hat, wurden die Stämme in einem FACS untersucht. In Abb. 4 ist das Ergebnis dieser Analyse in einem Histogramm graphisch dargestellt.



**Abb. 4:** FACS-Histogramme des Adenin-auxotrophen *S. cerevisiae*-Stammes Y190 (rot) und der Adenin-prototrophen Stämme KFY1(schwarz) und KFY2 (grün). Der auf der Abszissenachse dargestellte Parameter FL1 repräsentiert die Fluoreszenzintensität in einem Bereich von 515-545nm. Auf der Ordinatenachse ist die Anzahl aller detektierten Zellen in Abhängigkeit von ihrer Fluoreszenz dargestellt. Von jedem Hefestamm wurden insgesamt 20.000 Zellen gemessen.

Als Ergebnis der FACS-Untersuchung der Stämme KFY1 und KFY2 konnte im Vergleich zum Ausgangsstamm Y190 eine deutliche Verringerung der emittierten Grundfluoreszenz festgestellt werden. Dies war eine wichtige Voraussetzung für die weitere Verwendung von KFY1 und KFY2 in der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung.

Der Mittelwert der Gesamtfluoreszenz liegt für den Stamm Y190 bei 17,9. Wie zuvor bereits erwähnt, ist das Ausmaß der roten Pigmentierung, welche Ursache dieser Fluoreszenz ist, von verschiedenen Faktoren abhängig, so daß sie unter anderen Kultivierungsbedingungen höher oder niedriger sein kann. Es ist aber entscheidend festzustellen, daß der Mittelwert der Fluoreszenz für den unter gleichen Kulturbedingungen gewachsenen Stamm KFY1 nur bei 4,2 lag. Dies entsprach einer Reduktion der Grundfluoreszenz um 76%. KFY2 verhielt sich im Vergleich zu Y187 ähnlich wie KFY1 und Y190 zueinander, diese Werte wurden hier nicht dargestellt.

### **3.2. Konstruktion neuer *S. cerevisiae*-Stämme mit *GFP* als Reporter für das Zueihybrid-System**

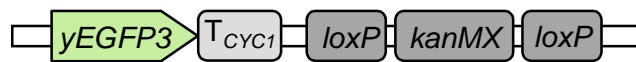
In der vorliegenden Arbeit konnte *yEGFP3* als funktionelles Reporter gen unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors stabil in das Genom von zwei haploiden Zueihybrid-Stämmen unterschiedlichen Paarungstyps integriert werden. In den folgenden Kapiteln ist die Konstruktion der neuen *S. cerevisiae*-Stämme sowie deren umfassende Charakterisierung beschrieben.

#### **3.2.1. Integration einer *GFP-kanMX*-Kassette in das *GAL1*-Gen**

Eine einfache und direkte Strategie für die Integration des *yEGFP3* bestand darin, den ORF unmittelbar hinter den nativen *GAL1*-Promotor zu integrieren und dabei das *GAL1*-Gen teilweise zu deletieren. Dazu wurde die Methode der sogenannten „SFH-PCR“ (**S**hort **F**lanking **H**omology) nach BAUDIN et al. (1993) angewandt, die in Abb. 6 graphisch dargestellt ist. Die Grundlage dieser PCR bilden 60-65bp lange Primer, die aus zwei Regionen bestehen. Ein Teil ermöglicht die Amplifikation der entsprechenden Disruptionskassette aus einem Plasmid, der andere Teil die homologe Rekombination mit dem Zielgen im Genom und damit die Integration der Kassette. Das gereinigte PCR-Produkt wird anschließend direkt für die Hefetransformation eingesetzt.

In Abb. 5 ist die mittels SFH-PCR amplifizierte Disruptionskassette *yEGFP3-loxP-kanMX-loxP* zur Intergration in das *GAL1*-Gen von KFY1 und KFY2 schematisch dargestellt.

Für die Amplifikation kamen die Primer GFP5 und GFP3 zum Einsatz, als Matrize diente das Plasmid pUG30, welches freundlicherweise von J. Hegemann, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt wurde. In Folge der Integration des 2805bp großen PCR-Produktes in die *S. cerevisiae*-Stämme KFY1 und KFY2 wurden 446bp des *GAL1*-ORFs deletiert.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Disruptionskassette, welche durch SFH-PCR aus dem Plasmid pUG30 amplifiziert wurde, für nachfolgende Integration in das *GAL1*-Gen der Stämme KFY1 und KFY2.

Für eine erste Analyse der nach Transformation des PCR-Produktes in die entsprechenden Stämme erhaltenen Kolonien wurde ein auf PCR basierender Integrationsnachweis durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode (vgl. 3.2.2.) konnte unter Verwendung der Primergemische Int1/Int2/HT114 bzw. Int3/Int4/Int5 festgestellt werden, daß sowohl in KFY1 als auch in KFY2 die Disruptionskassette an der gewünschten Stelle im Genom integriert war. Durch die Integration der *yEGFP3-kanMX*-Kassette in das *GAL1*-Gen von KFY1 und KFY2 entstanden die Stämme KFY8 und KFY9.

Für eine funktionellen Analyse der neu konstruierten *S. cerevisiae*-Stämme wurden diese zunächst mit dem Plasmid pCI1 transformiert. Dieses Plasmid trägt den vollständigen Transkriptionsfaktor Gal4p und ist deshalb sehr gut als Positivkontrolle für die Funktionsfähigkeit des Reportergens im Zweihybrid-System geeignet. Die Transformation von KFY8 und KFY9 erwies sich als sehr schwierig, d.h. auch nach Optimierung der Transformationsbedingungen und Anwendung verschiedener Methoden wurden nur sehr wenige Transformanten erhalten. Diese wuchsen auch im Zuge weiterer Kultivierungen nur sehr schlecht bzw. gar nicht. Aus bisher ungeklärten Gründen waren durch die Deletion eines großen Teils des *GAL1*-Genes Phänotypen entstanden, die eine verminderte Fähigkeit zur Aufnahme und Replikation von Plasmiden zu haben schienen. Da die Stämme mit dem Vorhaben konstruiert wurden, Genbanken im Zweihybrid-System hinsichtlich multipler Interaktionen zu untersuchen, mußte eine sehr gute Transformierbarkeit gewährleistet sein. KFY8 und KFY9 waren demzufolge nicht für die weiter geplanten Arbeiten verwendbar, so daß die Konstruktion neuer Reporterstämme notwendig wurde.

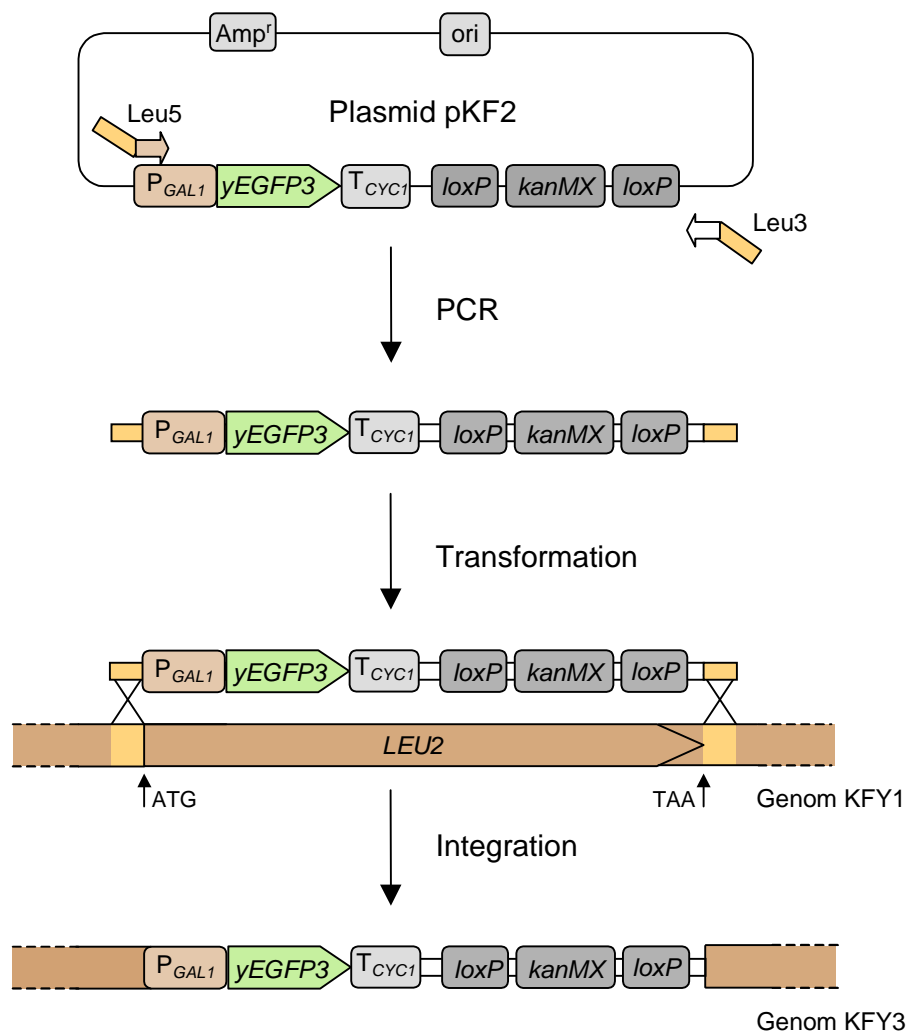
### 3.2.2. Integration einer $P_{GAL1}$ -GFP-*kanMX*-Kassette in das *LEU2*-Gen

Eine weitere Möglichkeit zur Einführung von GFP als Reportergen im Zweihybrid-System war die Integration einer Disruptionskassette, die das *yEGFP3*-Gen unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors enthält. Diese Kassette mußte so in das Genom integriert werden, daß die daraus resultierende Gendisruption keine negativen Auswirkungen auf die neu entstehenden *S. cerevisiae*-Stämme hat. Als Ergebnis der erfolgreichen Integration entstanden die Stämme KFY3 und KFY4, deren Konstruktion im Folgenden beschrieben wird. Ihre



Transformationseffizienz war im Gegensatz zu KFY8 und KFY9 nicht eingeschränkt, so daß sie für umfangreiche Zweihybrid-Untersuchungen geeignet waren.

Die Stämme KFY1 und KFY2, in die GFP integriert werden sollte, sind durch eine Mutation im *LEU2*-Gen (*leu2-3*) Leucin-auxotroph. Da der mutierte *LEU2*-ORF neben der entsprechenden Auxotrophie keine weitere Bedeutung für die beiden Stämme hat, war dieses Gen ein geeigneter Ort für die geplante Integration. In Abb. 6 ist die auf Grundlage der SFH-PCR durchgeführte Integration von *yEGFP3* zusammen mit dem *GAL1*-Promotor in den *LEU2*-ORF schematisch dargestellt.



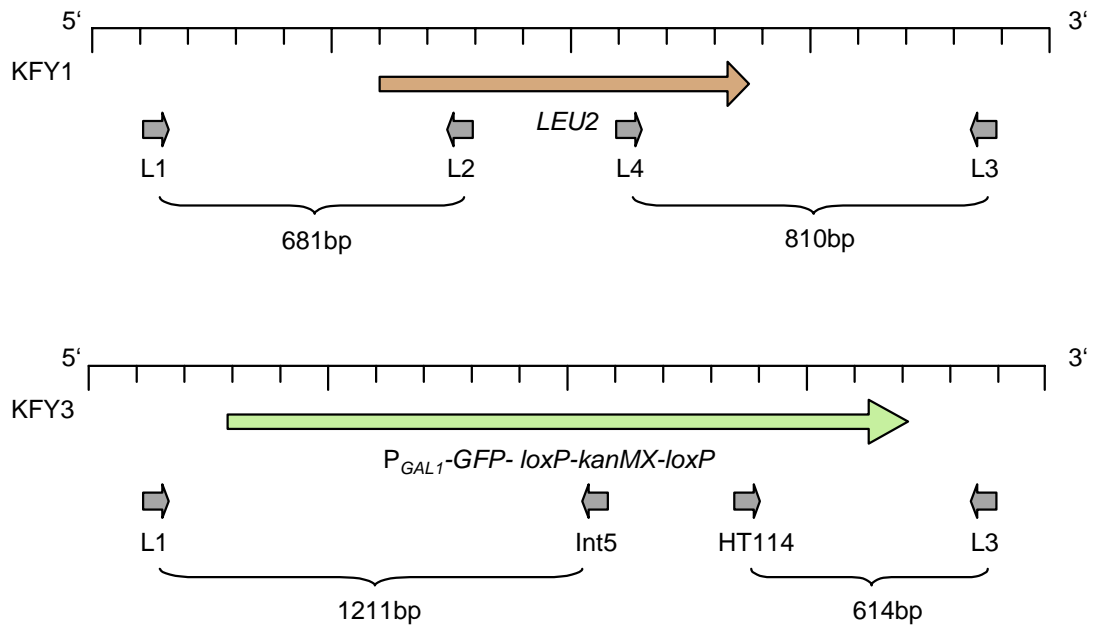
**Abb. 6:** Schematische Darstellung der SFH-PCR zur Amplifikation der Integrationskassette *P<sub>GAL1</sub>-yEGFP3-loxP-kanMX-loxP* und anschließender Integration in das *LEU2*-Gen des Stammes KFY1 durch homologe Rekombination (verändert nach GÜLDENER et al. 1996). Die dargestellten Größenverhältnisse entsprechen nicht den tatsächlichen Verhältnissen.

In Anlehnung an die Arbeit von GÜLDENER et al. (1996) wurden alle Integrationen mit einer Kasette, die kanMX als heterologen Resistenzmarker und das Cre-loxP Rekombinationssystem enthält, durchgeführt.

Für die Zusammenstellung der Disruptionskasette war zunächst die Konstruktion des Plasmides pKF2 notwendig. Dazu wurde aus dem Plasmid pUG30 ein 2779bp großes *Bam*HI/*Not*I-Fragment isoliert, welches die *yEGFP3-loxP-kanMX-loxP*-Kasette trug. Dieses Fragment konnte mit dem *Bam*HI/*Not*I gespaltenen Vektor pTM68 ligiert werden, wodurch die Expression von *yEGFP3* in dem neu entstandenen Plasmid unter die Kontrolle des *GAL1*-Promotors gestellt wurde. Der auf diese Weise konstruierte Vektor pKF2 konnte anschließend als Matrize für eine SFH-PCR verwendet werden. Der dabei eingesetzte Vorwärtsprimer Leu5 hybridisierte mit pKF2 am Beginn des *GAL1*-Promotors, der die homologe Rekombination mit dem Zielort im *S. cerevisiae*-Genom ermöglichende Teil dieses Primers begann 40bp stromauf vor dem Startcodon des *LEU2*-Gens. Der Rückwärtsprimer Leu3 hatte auf dem Plasmid seine Bindungsstelle wenige Basenpaare hinter dem zweiten loxP-Ort und auf dem Genom 40bp stromab hinter dem Stopcodon von *LEU2*. Der *LEU2*-ORF wurde durch die Integration vollständig deletiert.

Um nach der Transformation der Disruptionskasette in die *S. cerevisiae*-Stämme KFY1 und KFY2 die Integration zu überprüfen, wurde eine PCR mit Sphäroplasten der entsprechenden Hefen als Matrize durchgeführt. Diese als Integrationsnachweis bezeichnete Methode wird im Folgenden kurz erläutert. Wie in Abb. 7 dargestellt, wurden 17-20bp lange Primer so gewählt, daß jeweils ein Oligonukleotid seine Bindungsstelle direkt im Zielgen für die Disruption hatte, der dazugehörige andere Primer aber in dem das Zielgen flankierenden Bereich lag. Um die Spezifität des Integrationsnachweises zu erhöhen, wurde jeweils ein Primerpaar für den dem 5'-Ende des Disruptionsortes zugewandten Bereich und eines für den dem 3'-Ende zugewandten Bereich herausgesucht. In den Ausgangsstämmen KFY1 und KFY2 waren dies die Primerpaare L1/L2 und L3/L4, welche die Amplifikation eines 681bp und eines 810bp langen Fragmentes erlaubten. Bei der Wahl der Primer für die PCR in den mit der Disruptionskasette transformierten Hefen mußte darauf geachtet werden, daß die amplifizierten Fragmente in ihrer Größe von den in den Ausgangsstämmen amplifizierten Fragmenten unterscheidbar waren. Dies war gewährleistet, da durch die Primerpaare L1/Int5 und L3/HT114 Fragmente in der Größe von 1211bp bzw. 614bp erhalten werden konnten. Für die PCR wurden sowohl mit den Ausgangsstämmen als auch mit dem transformierten Stämmen als Matrize jeweils alle drei in dem entsprechenden Bereich des Disruptionsortes liegenden Oligonukleotide eingesetzt. Das heißt, für den dem 5'-Ende zugewandten Bereich kamen die Primer L1, L2 und Int5 zur Anwendung und für den gegenüberliegenden Bereich die Primer L3, L4 und HT114. Dies geschah zum einen, um unspezifische Amplifikationen herausfinden zu können und zum anderen, um in den transformierten Stämmen bei falscher

Integration die Amplifikation des entsprechenden Fragmentes des Ausgangsstammes zu ermöglichen. In Abb. 7 ist der Integrationsnachweis für die Disruption des *LEU2*-Gens durch die  $P_{GAL1}$ -*yEGFP3-kanMX*-Kassette schematisch dargestellt.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des auf PCR basierenden Nachweises für die Integration der Disruptionskassette  $P_{GAL1}$ -*yEGFP3-loxP-kanMX-loxP* in das *LEU2*-Gen im Vergleich zum Ausgangsstamm. Die dargestellten Größenverhältnisse entsprechen nicht den tatsächlichen Verhältnissen.

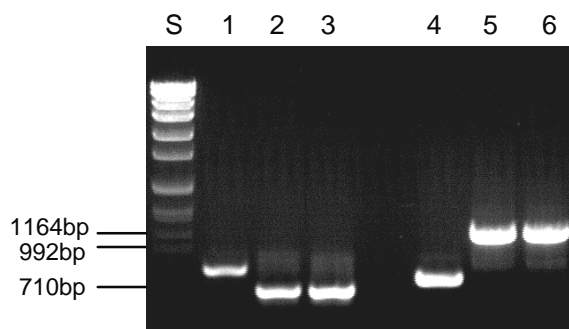
Als Ergebnis des Integrationsnachweises wurde festgestellt, daß die Integration der Disruptionskassette in das *LEU2*-Gen nur im Stamm KFY1 erfolgreich war. In dem dadurch entstandenen neuen Stamm KFY3 konnten sowohl mit dem Primergemisch L1/L2/Int5 als auch mit L3/L4/HT114 die erwarteten Fragmente amplifiziert werden (siehe Abb. 8). Im Gegensatz dazu wurden bei der PCR mit den aus der Disruption in Stamm KFY2 hervorgegangenen Transformanten bei der Testung von mehr als 20 Kolonien stets die gleichen Fragmente wie im Ausgangsstamm erhalten. Dies ließ darauf schließen, daß die Disruptionskassette nicht an der gewünschten Stelle in das Genom integriert wurde.

Ein weitere Möglichkeit für die Konstruktion eines GFP-tragenden Reporterstammes des Kreuzungstypes  $MAT\alpha$  war die Kreuzung des Stammes KFY3 ( $MAT\alpha$ ) mit KFY2 ( $MAT\alpha$ ). Da der Stamm KFY3 das *yEGFP3*-Gen trägt, war es wahrscheinlich, daß unter den haploiden Nachkommen des durch die Kreuzung entstehenden diploiden Stammes auch GFP-enthaltende Hefen zu finden sind.

Um nach der Kreuzung der entsprechenden Stämme die diploiden Zellen auf Selektionsmedium anreichern zu können, mußte jeweils ein Stamm eine Auxotrophie des anderen

Stammes komplementieren. Dies war gewährleistet, da KFY2 im Gegensatz zu KFY3 Lysin-prototroph, aber Methionin-auxotroph ist. Laut der Genotypangabe (vgl. Tab. 1 und Tab. 2) sollte der ursprünglich aus Y190 hervorgegangene Stamm KFY3 ebenfalls Lysin-prototroph sein. In einem Handbuch der Firma Clontech war aber der Hinweis zu finden, daß der Stamm Y190 Lysin-haltiges Medium benötigt. Demzufolge ist auch KFY3 Lysin-auxotroph, so daß die diploiden Zellen auf einem Medium ohne Lysin und ohne Methionin angereichert werden konnten. Die diploiden Zellen wurden durch mehrtägige Inkubation in einem Mangelmedium zur Sporenbildung angeregt und die Sporen nachfolgend einer Tetradisdissektion unterzogen. Die auf YPD-Medium ausgekeimten Sporen wurden anschließend auf G-418 Platten überstrichen, um jene Zellen herauszufinden, die ebenso wie KFY3 die Disruptionskassette trugen.

In einem weiteren Kreuzungsversuch mußte nun herausgefunden werden, welche der isolierten G-418-resistenten Hefen den Paarungstyp MAT $\alpha$  haben. Der dazu verwendete Tester-Stamm CB023 hat den Paarungstyp MATa und ist Histin-prototroph, aber Adenin-auxotroph. Alle haploiden Nachkommen aus dem vorhergehenden Kreuzungsexperiment waren Histidin-auxotroph und Adenin-prototroph, so daß die diploiden Zellen auf Histidin- und Adenin-freiem Medium selektioniert werden konnten. Ein Wachstum von Zellen auf diesem Selektionsmedium ließ den Schluß zu, daß der jeweilige für die Kreuzung eingesetzte haploide Nachkomme den Paarungstyp MAT $\alpha$  haben mußte, da nur diese in der Lage waren, sich mit CB023 zu kreuzen.



**Abb. 8:** Nachweis der Integration der Disruptionskassette  $P_{GAL1}\text{-}yEGFP3\text{-}loxP\text{-}kanMX\text{-}loxP$  in den Stämmen KFY3 und KFY4 im Vergleich zum Ausgangsstamm. Die Spuren 1-3 repräsentieren den dem 3'-Ende zugewandten Bereich der Disruptionskassette, die Spuren 4-6 den dem 5'-Ende zugewandten Bereich. Die Spuren 1 und 4 stellen die mit dem Ausgangsstamm KFY1 amplifizierte Fragmente dar, die Spuren 2 und 5 die mit KFY3 und die Spuren 3 und 6 die mit KFY4 erhaltenen PCR-Produkte. In der Spur S ist der DNA-Längenstandard VII aufgetragen.

Die Bestimmung der Auxotrophiemarker der Stämme, für die der Paarungstyp MAT $\alpha$  bestimmt wurde, erfolgte durch Ausstreichen der Hefen auf unterschiedlichen Selektionsmedien, denen jeweils eine essentielle Aminosäure fehlte. Aus dem Ergebnis dieser Untersuchung konnte der in Tab. 2 angeführte Genotyp abgeleitet werden.

Wie zuvor bereits beschrieben, wurde die vollständige und richtige Integration der Disruptionskassette mit Hilfe eines Integrationsnachweises auch in den nach der Kreuzung erhaltenen Hefen überprüft. Im Zuge dieses Versuches konnten auf beiden Seiten der Disruptionskassette jene Fragmente amplifiziert werden, die nur bei korrekter Integration entstehen können. Der aus der Kreuzung von KFY3 und KFY2 entstandene neue GFP-tragende Stamm wurde als KFY4 bezeichnet. In Abb. 8 ist ein Agarosegel dargestellt, auf welchem die beim Integrationsnachweis amplifizierten Fragmente von KFY3 und KFY4 im Vergleich zum Ausgangsstamm KFY1 aufgetrennt wurden.

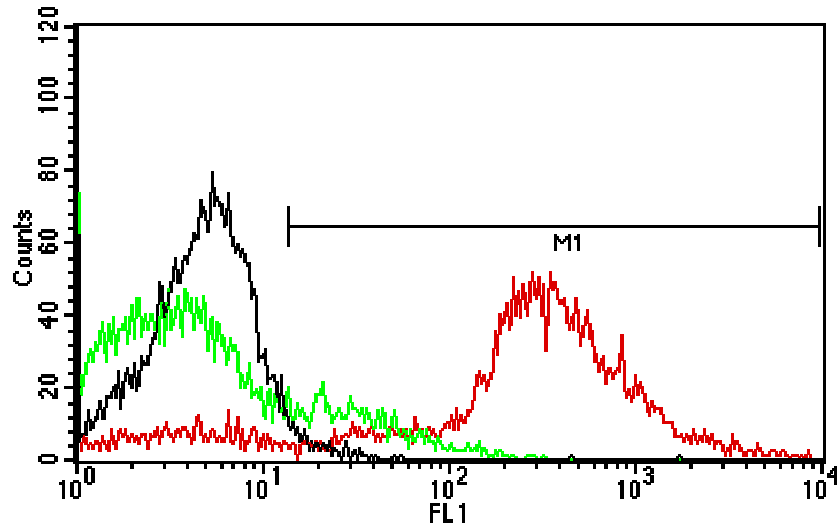
### 3.2.3. Funktionelle Charakterisierung der Stämme KFY3 und KFY4

Nachdem GFP als neues Reporter-gen in erfolgreich in *S. cerevisiae* integriert werden konnte, wurde die Funktionalität dieses Reporters im Vergleich zu dem bereits etablierten *lacZ*-Reporter untersucht. Als Resultat einer umfassenden Untersuchung konnte festgestellt werden, daß in KFY3 und KFY4 die Zellen je nach Beschaffenheit des Transkriptionsfaktors Gal4p unterschiedlich intensiv fluoreszieren. Im Vergleich mit dem *lacZ*-Reporter läßt sich daraus der Schluß ziehen, daß in den beiden neu konstruierten Stämmen *yEGFP3* als funktioneller und sensitiver Reporter genutzt werden kann.

Die neu konstruierten Hefestämme wurden zunächst mit den Plasmiden pCI1 und pTM145/pTM146 transformiert. Während pCI1 das Gen für den intakten Transkriptionsfaktor Gal4p enthält und somit die am stärksten mögliche Aktivierung des Reporters hervorrufen sollte, wird durch pTM145/pTM146 eine echte Protein-Protein-Interaktion repräsentiert. Beide Plasmide enthalten die cDNA der ersten 500bp (166AS) der regulatorischen Untereinheit (BCY1) der cAMP-abhängigen Proteinkinase aus *S. cerevisiae*, in pTM145 als Fusion an die Gal4p-DNA-BD und in pTM146 als Fusion an die Gal4p-AD (persönliche Mitteilung von T. Munder). BCY1 bildet Homodimere (TODA et al., 1987) und ermöglicht dadurch im Zweihybrid-System die Aktivierung des Reporter-gens.

In Abb. 9 ist ein FACS-Histogramm des mit pCI1 bzw. pTM145/pTM146 transformierten Stammes KFY3 im Vergleich zu einer Negativkontrolle dargestellt. Für die Negativkontrolle wurde KFY3 mit den Plasmiden pGBT9 und pGAD424 transformiert, welche die *GAL4*-DNA-BD bzw. die *GAL4*-AD enthalten. Im Histogramm ist erkennbar, daß in Anwesenheit des intakten Transkriptionsfaktors Gal4p die stärkste Aktivierung des Reporters erfolgte. Mehr als 87% aller gemessenen Zellen emittierten Licht einer Wellenlänge, welche in FL1 detektiert

werden konnte. Diese, eindeutig von *yEGFP3* abgegebene Fluoreszenz (CORMACK et al. 1997) ist mit einem Mittelwert von etwa 430 bei dem Gal4p enthaltenden Stamm besonders hoch. Im Vergleich dazu lag die Gesamtfluoreszenz der Zellen, welche als Negativkontrolle gemessen wurden, nur bei knapp 6.



Auswertung:

File: KFY3/pCI1  
(rot)

File: KFY3/pTM145/pTM146  
(grün)

File: KFY3/pGBT9/pGAD424  
(schwarz)

Marker	Events	%	Mean	Marker	Events	%	Mean	Marker	Events	%	Mean
All	10000	100	433,4	All	10000	100	10,0	All	10000	100	5,7
M1	8771	87,7	493,5	M1	1763	17,6	38,5	M1	269	2,7	26,4

**Abb. 9:** Histogramme der FACS-Analyse des mit unterschiedlichen Plasmiden transformierten Stammes KFY3 zur Überprüfung der Funktionalität von GFP als Reporter im Zweihybrid-system. KFY3/pCI1 (rot) stellt die Positivkontrolle dar, KFY3/pTM145/pTM146 (grün) eine echte Interaktion und KFY3/pGBT9/pGAD424 (schwarz) die Negativkontrolle.

Die Achsenbeschriftung ist in Abb. 4. erläutert. Der Marker M1 wurde nach der Messung zum Zwecke der Auswertung eingeführt. In den Tabellen ist unter der Bezeichnung ‚Events‘ die Anzahl der Zellen dargestellt, die entweder im gesamten Meßbereich (‚All‘) oder im Bereich von M1 detektierbar waren. Die Prozentangabe verdeutlicht den jeweiligen Anteil der Zellen an der Gesamtpopulation. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität ist unter ‚Mean‘ aufgeführt.

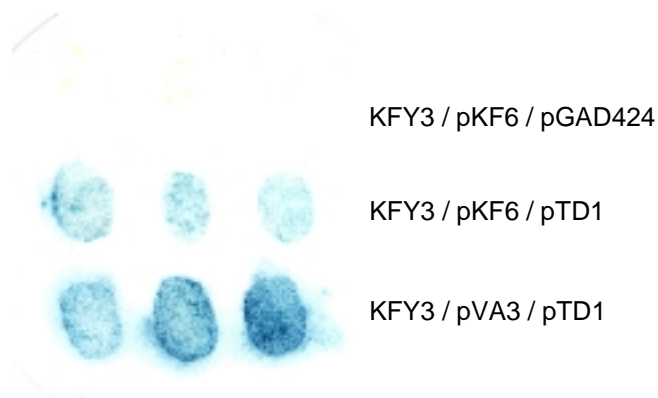
Im Histogramm des mit den Plasmiden pTM145/pTM146 transformierten Stammes sind zwei Populationen von Zellen erkennbar. Zum einen fluoreszierende Zellen, welche im Bereich des Markers M1 liegen und zum anderen nicht fluoreszierende Zellen. Diese Aufteilung in zwei Zellpopulationen deutet darauf hin, daß nicht in jeder Zelle das Reporter-gen GFP exprimiert wurde. Die Gesamtfluoreszenz dieser Zellen war erwartungsgemäß um ein

Vielfaches niedriger als in der Zellen, welche den ungeteilten Transkriptionsfaktor enthielten. Deutlich wichtiger aber war der Vergleich dieser Zellen mit der entsprechenden Negativkontrolle. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Fluoreszenz der Hefen, in denen *yEGFP3* als Folge einer Protein-Protein-Interaktion exprimiert wurde, im Bereich des Markers M1 um etwa 31% höher war, als in den Zellen, welche die Gal4p-DNA-BD und die Gal4p-AD ohne Fusionsprotein enthielten. Fluoreszierende, d.h. GFP-bildende und nicht fluoreszierende Zellen konnten deutlich voneinander unterschieden werden, was eine grundlegende Voraussetzung für die geplante Anwendung war.

Um die Eignung von GFP als Reporter im Zweihybrid-System weitergehend zu untersuchen, wurde überprüft, ob unterschiedlich starke Interaktionen auch eine unterschiedlich starke Transkription von *yEGFP3* hervorrufen und dies im FACS detektierbar ist. Dazu wurde die als Standardinteraktion im Zweihybrid-System bekannte Wechselwirkung zwischen dem large T-Antigen aus dem Virus SV40 und dem p53 aus Maus (LI und FIELDS, 1993) verwendet. In der Arbeit von LI und FIELDS ist beschrieben, daß das large T-Antigen mit murinem p53 stärker interagiert als mit humanem p53. Da nur die Wechselwirkungen eines Proteins mit verwandten Partnern gut miteinander vergleichbar sind, wurden die Interaktionen des large T-Antigen mit murinem und humanen p53 hinsichtlich der Aktivierung des *lacZ*- und des GFP-Reporters untersucht und miteinander verglichen.

Dazu wurde zunächst humanes, N-terminal verkürztes p53 an die Gal4p-DNA-BD fusioniert. Laut Literatur (LI und FIELDS, 1993) hat p53 im N-terminalen Bereich eine transaktivierende Domäne, so daß mittels PCR ein Fragment von Aminosäure 74 bis 393 des humanen p53 amplifiziert wurde. Als Matrize diente p53-cDNA, die freundlicherweise von F. Große, IMB Jena, zur Verfügung gestellt wurde. Die für die PCR eingesetzten Primer p53Uneu und p53D wurden so gewählt, daß dem amplifizierten Fragment die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *BamHI* angefügt waren. Nach entsprechender Restriktion konnte das p53-Fragment mit dem durch *EcoRI/BamHI*-Spaltung linearisierten Vektor pGBT9 ligiert werden. Die korrekte Amplifikation von p53 und dessen Fusion an die Gal4p-DNA-BD wurden durch Sequenzierung des entstandenen Plasmides pKF6 überprüft. Zur Untersuchung der Interaktionen zwischen humanem bzw. murinem p53 und large T-Antigen wurden die Plasmide pKF6/pTD1, pVA3/pTD1 und als Negativkontrolle pKF6/pGAD424 in den Stamm KFY3 transformiert. Das Plasmid pVA3 trägt die Fusion von murinem p53 an die Gal4p-DNA-BD entsprechend der Abschnitte des humanen p53. Der Vektor pTD1 enthält SV40 large T-Antigen fusioniert an die Gal4p-AD und auf dem Vektor pGAD424 ist die Gal4p-AD allein codiert. Die transformierten Hefen wurden zunächst hinsichtlich der Aktivierung des *lacZ*-Reporters untersucht. In Abb. 10 ist ein Filterassay zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität dargestellt. Wie erwartet, ist die Aktivierung des *lacZ*-Reporters durch die Interaktion von murinem p53 mit large T-Antigen stärker als durch die

Wechselwirkung von humanem p53 mit large T-Antigen. Der mit den Plasmiden pVA3 und pTD1 transformierte Stamm KFY3 zeigte nach 18stündiger Inkubation des Filterassays eine deutlich stärkere Blaufärbung und somit eine höhere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als der pKF6/pTD1-tragende Stamm. In diesem Versuch konnte ebenfalls gezeigt werden, daß durch das N-terminal verkürzte, auf pKF6 codierte humane p53 keine Transaktivierung des Reportergens hervorgerufen wird. Dies war dadurch erkennbar, daß im Filterassay die mit pKF6/pGAD424 transformierten Hefen weiß blieben.



**Abb. 10:** Filterassay zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Die Intensität der Blaufärbung ist direkt proportional zur  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Von jedem Stamm wurden parallel drei repräsentative Klone ausgestrichen.

Da mit einem Filterassay die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nicht quantifiziert werden kann, wurde diese in den mit Plasmiden transformierten Hefen zusätzlich in einem Flüssigassay bestimmt. Dazu wurden wie im Filterassay jeweils drei voneinander unabhängige Klone untersucht und der Mittelwert der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität berechnet. Die Ergebnisse des Flüssigassays sind in Tab. 9 dargestellt. In den zuvor besprochenen, mit den Plasmiden pTM145/pTM146 bzw. pCI1 transformierten Hefen wurde ebenfalls die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität bestimmt und die Ergebnisse als Vergleich mit in Tab. 9 aufgeführt.

**Tab. 9:** Ergebnisse des Flüssigassays zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

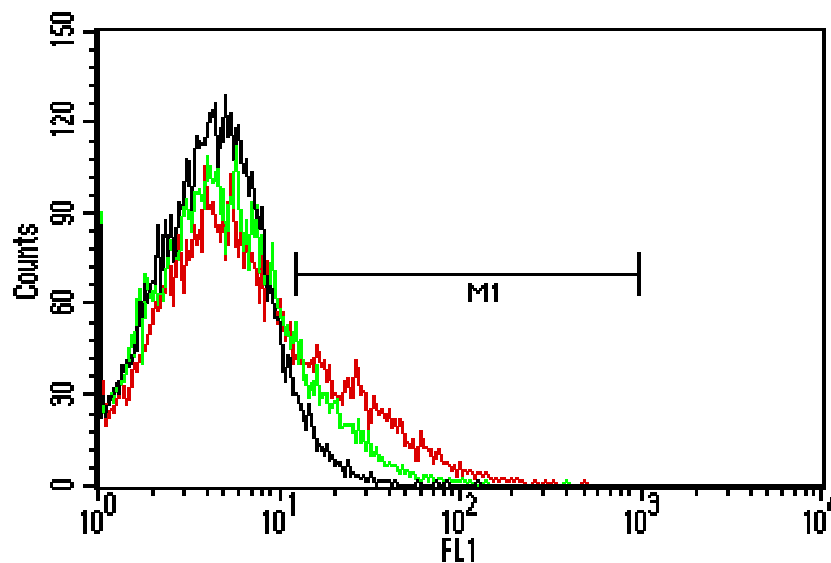
<i>S. cerevisiae</i> -Stamm	$\beta$ -Galaktosidaseaktivität (U) <sup>a</sup>
KFY3 / pFK6 / pGAD424	0
KFY3 / pKF6 / pTD1	1,9 $\pm$ 0,5
KFY3 / pVA3 / pTD1	7,2 $\pm$ 0,5
KFY3 / pTM145 / pTM146	10,7 $\pm$ 2,2
KFY3 / pCI1	219,9 $\pm$ 44,5

a Die Einheit der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist in Kapitel 2.2.6.2. definiert.



Die Ergebnisse des Flüssigassays bestätigten die mit Hilfe des Filterassays erhaltenen Erkenntnisse über die unterschiedliche Stärke der Wechselwirkungen zwischen murinem und humanem p53 mit large T-Antigen. Durch Messung im FACS wurde nun untersucht, ob sich diese Unterschiede auch in der Aktivierung des GFP-Reporters zeigen.

Die Histogramme der FACS-Analyse der bereits im  $\beta$ -Galaktosidase-Assay getesteten Hefen sind in Abb. 11 dargestellt. In der Überlagerung der einzelnen Histogramme sind deutliche Unterschiede im jeweiligen Anteil der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtzellpopulation und in der Intensität der Fluoreszenz erkennbar.



Auswertung:

File: KFY3/pVA3/pTD1  
(rot)

File: KFY3/pKF6/pTD1  
(grün)

File: KFY3/pKF6/pGAD424  
(schwarz)

Marker	Events	%	Mean	Marker	Events	%	Mean	Marker	Events	%	Mean
All	20000	100	10,9	All	20000	100	7,0	All	20000	100	5,1
M1	4527	22,6	32,0	M1	2550	12,8	22,3	M1	822	4,1	17,2

**Abb. 11:** Histogramme der FACS-Analyse des mit entsprechenden Plasmiden transformierten Stammes KFY3 zum Vergleich der unterschiedlich starken Wechselwirkung von murinem (rot, KFY3/pVA3/pTD1) und humanem (grün, KFY3/pKF6/pTD1) p53 mit large T-Antigen aus SV40. Humanes p53 ohne Interaktionspartner ist als Negativkontrolle dargestellt (schwarz, KFY3/pKF6/pGAD424). Die Achsenbeschriftungen und die Bezeichnungen in den Tabellen sind in Abb. 4 und 9 erläutert.

Während in Folge der Interaktion zwischen murinem p53 und large T-Antigen etwa 23% der Zellen GFP bildeten, waren es bei humanem p53 als Interaktionspartner etwa 13%. In der Negativkontrolle, d.h. humanes p53 ohne Interaktionspartner, gaben dagegen nur etwa 4%

der Zellen fluoreszierendes Licht ab. Ein Vergleich mit den Daten der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zeigt, daß die Interaktion zwischen murinem p53 und large T-Antigen gegenüber der Interaktion von humanem p53 und large T-Antigen in einer gleichermaßen höheren GFP-Bildung wie höheren  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität resultiert. Die stärkere Interaktion bewirkte einen etwa doppelt so hohen Anteil an fluoreszierenden Zellen und eine etwa 3,5x höhere  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als die schwächere Interaktion.

Es ist weiterhin wichtig zu beachten, daß in den Zellen mit der schwächeren Interaktion nicht nur der Anteil GFP-bildender Zellen geringer war, sondern auch weniger GFP pro Zelle produziert wurde. Die Interaktion zwischen murinem p53 und largeT-Antigen rief eine um etwa 30% stärkere Fluoreszenz pro Zelle hervor als die Interaktion mit humanem p53.

Die in Tab. 9 aufgeführten Werte der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität für die mit pTM145/pTM146 bzw. pCI1 transformierten Hefen decken sich ebenfalls mit den Ergebnissen der durchflußzytometrischen Untersuchung dieser Zellen (vgl. Abb. 9). Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist in den mit dem intakten Transkriptionsfaktor GAL4p transformierten Zellen ist gleichfalls um ein Vielfaches höher als in Zellen, deren Reporter-gen-Aktivierung auf eine Protein-Protein-Interaktion beruht.

### **3.3. Konstruktion neuer *S. cerevisiae*-Stämme mit dem $\alpha$ -Agglutininrezeptor als Reporter im Zweihybrid-System**

Nach der Etablierung von GFP als neues Reporter-gen im Zweihybrid-System wurde versucht, ein weiteres, alternatives Reportersystem zu entwickeln, welches die Markierung positiver Zellen mit unterschiedlichen, synthetischen Farbstoffen erlaubt. In den Stämmen KFY6 und KFY7, deren Konstruktion und Charakterisierung im Folgenden beschrieben wird, resultiert eine Protein-Protein-Interaktion in der Exposition eines Oberflachenrezeptors. Dieser kann über eine einfache Antikörperbindung mit beliebigen Fluoreszenzfarbstoffen, die ein Emissionsspektrum jenseits der natürlichen Autofluoreszenz haben, markiert werden. Auf diese Weise ist mit KFY6 und KFY7 eine völlig neuartige Variante der Detektion positiver Zellen im Zweihybrid-System möglich.

Als geeignet für die Entwicklung des neuen Reportersystems erwies sich der  $\alpha$ -Agglutininrezeptor, welcher in *S. cerevisiae* eine wichtige Funktion für die Anlagerung von haploiden  $\alpha$ - und  $\alpha$ -Zellen zur Induktion der Paarung hat (LU et al., 1995). Der Rezeptor setzt sich aus den zwei Glycoproteinen Aga1 und Aga2 zusammen, wobei Aga1 über eine kovalente  $\beta$ -Glucan-Bindung an der Zelloberfläche verankert und über zwei Disulfidbrücken mit Aga2 verbunden ist (LU et al., 1995, CAPPELLARO et al., 1994).

BODER und WITTRUP (1997) entwickelten ein System, welches über C-terminale Fusion an Aga2p die Exposition unterschiedlicher Proteine an der Zelloberfläche ermöglicht. Dazu

wurde *AGA2* auf einem Plasmid unter die Kontrolle des *GAL1*-Promotors gebracht und mit einer multiplen Klonierungsstelle sowie einem V5-Epitop und einem His-Tag verbunden. Die Expression von Aga1p wurde im Genom ebenfalls der Kontrolle des *GAL1*-Promotors unterstellt. Die Induktion der Expression von Aga1p und Aga2p erfolgte durch Überführen der Hefezellen von Glukosemedium in Galaktosemedium. Dieses System wurde als Grundlage für die Konstruktion der neuen Reporterstämme genutzt.

### 3.3.1. Integration des *GAPDH*-Promotors vor das *AGA1*-Gen

Unter natürlichen Bedingungen wird die Expression von Aga1p und Aga2p in Anwesenheit eines Paarungspartnes induziert (ORLEAN et al., 1986). Um in einem Reporterstamm für das Zweihybrid-System die Bildung des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors unabhängig von äußeren Einflüssen regulieren zu können, wurde die Transkription von *AGA1* unter die Kontrolle des konstitutiven *GAPDH*-Promotors gestellt. Da *AGA2* auf dem Plasmid durch den *GAL1*-Promotor kontrolliert wird, kann in einem Reporterstamm, in dem *GAL4* deletiert ist, der vollständige  $\alpha$ -Agglutininrezeptor nur bei einer Protein-Protein-Interaktion bzw. bei Anwesenheit von GAL4p gebildet werden.

Für die Integration des *GAPDH*-Promotors wurde zunächst ein Plasmid konstruiert, welches die Amplifikation der gesamten Disruptionskassette mittels SFH-PCR (vgl. 3.2.1.) ermöglicht. Aus dem Vektor pTM104 konnte dafür durch Spaltung mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Sac*II ein Fragment isoliert werden, welches den *GAPDH*-Promotor trägt. Dieses Fragment wurde mit dem durch *Eco*RV und *Sac*II linearisierten Vektor pUG6 ligiert, wobei das Plasmid pKF3 mit einer Größe von 4510bp entstand. Unter Verwendung der Primer *AGA1* und *AGA2* konnte die in Abb. 12 schematisch dargestellte Disruptionskassette amplifiziert werden. Durch die Integration der Kassette in den *S. cerevisiae*-Stamm KFY2 wurden 50bp des nativen *AGA1*-Promotors deletiert.



**Abb. 12:** Schematische Darstellung der mittels SFH-PCR aus pKF3 amplifizierten Disruptionskassette für die nachfolgende Integration in KFY2 zum Austausch des *AGA1*-Promotors.

Nach der Integration wurde mit den G-418-resistenten Transformanten mittels PCR ein Integrationsnachweis durchgeführt (vgl. 3.2.2.). Dabei kamen die Primergemische *GAPDH1*/*GAPDH2*/*HT114* und *GAPDH3*/*GAPDH4*/*HT83* zum Einsatz. Der im Integrationsnachweis als positiv identifizierte *S. cerevisiae*-Stamm wurde mit KFY5 bezeichnet.

Für eine funktionelle Untersuchung des Stammes KFY5 wurde dieser zunächst mit den Plasmiden pCI1 und pYD1 transformiert. Der Vektor pYD1 ist in der Arbeit von BODER und WITTRUP (1997) beschrieben und enthält das *AGA2*-Gen unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Als Negativkontrolle wurde KFY5 mit dem Vektor pGAD424, der die *GAL4*-AD allein enthält und pYD1 transformiert. Da unter diesen Voraussetzungen der Transkriptionsfaktor GAL4p inaktiv ist, dürfte auch keine Bildung des Aga2p erfolgen und damit der vollständige  $\alpha$ -Agglutininrezeptor nicht exponiert werden. Nach einer entsprechenden Kultivierung der Zellen einschließlich Überführung von Glukosemedium in Galaktosemedium wurde der exprimierte  $\alpha$ -Agglutininrezeptor spezifisch markiert. Dies erfolgte mittels Antikörperbindung an das mit dem C-Terminus des Aga2p fusionierte V5-Epitop. Als primärer Antikörper (AK) kam dabei ein Anti-V5-AK aus Maus zum Einsatz, als sekundärer AK ein FITC-markierter Anti-Maus-AK aus Ziege. Als Positivkontrolle für die Markierung wurde der von BODER und WITTRUP (1997) konstruierte, mit pYD1 transformierte *S. cerevisiae*-Stamm EBY100 mitgeführt. Als Negativkontrolle für die Markierung diente eine Probe aus der Kultur von EBY100 unmittelbar nach der Überführung in Galaktosemedium. Da in EBY100 die Expression von Aga1p und Aga2p durch Galaktose induziert wird, kann der  $\alpha$ -Agglutininrezeptor erst nach einer gewissen Kultivierungsdauer in Galaktosemedium gebildet werden.

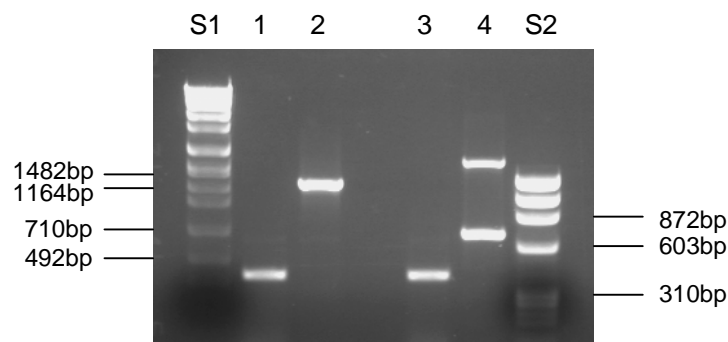
Als Ergebnis der FACS-Analyse der beschriebenen Stämme wurde deutlich, daß der *GAPDH*-Promotor offensichtlich nicht für eine konstitutive Expression von Aga1p geeignet war. Mit dem Stamm KFY5 konnten keine FITC-markierten Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnten mit dem Stamm EBY100 nach 24stündiger Kultivierung in Galaktosemedium etwa 65% aller untersuchten Zellen als FITC-markiert identifiziert werden. In der entsprechenden Negativkontrolle fluoreszierten nur etwa 10% der Zellen. Die Daten sind hier nicht dargestellt. Es konnte gezeigt werden, daß eine erfolgreiche Markierung des Aga2p mit den verwendeten Antikörpern möglich war, der Stamm KFY5 aber ungeeignet war.

### 3.3.2. Integration des *GAL1*-Promotors vor das *AGA1*-Gen

Nachdem der Austausch des nativen *AGA1*-Promotors gegen den konstitutiven *GAPDH*-Promotor nicht das gewünschte Ergebnis brachte, wurde im Folgenden der *GAL1*-Promotor vor *AGA1* integriert. Dazu mußte zunächst wiederum ein Plasmid konstruiert werden, welches die Amplifikation der Disruptionskassette ermöglichte. Aus dem Vektor pTM68 wurde durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *SacII* ein den *GAL1*-Promotor tragendes Fragment isoliert. Das nach Ligation mit dem durch *EcoRV* und *SacII* linearisierten Vektor pUG6 entstandene Plasmid wurde mit pKF7 bezeichnet und hatte eine Größe von 4691bp.

Für die Amplifikation der Kasette aus pKF7 wurde der Vorwärtsprimer AGA1 verwendet, der auf dem Genom 50bp vor dem Startcodon des AGA1-Gens hybridisierte und auf pKF7 wenige bp vor dem ersten loxP-Ort. Die Bindungsstelle des reversen Primers AGA3 endete direkt am Startcodon des AGA1 und der für die Amplifikation der Kasette aus dem Plasmid benötigte Teil lag am Ende des *GAL1*-Promotors. Die amplifizierte Disruptionskasette war im Prinzip wie die den *GAPDH*-Promotor tragende Kasette aufgebaut (vgl. Abb. 12), ihre Integration am Zielort im Genom des *S. cerevisiae* -Stammes KFY2 führte ebenfalls zur Deletion von 50bp des nativen Promotors.

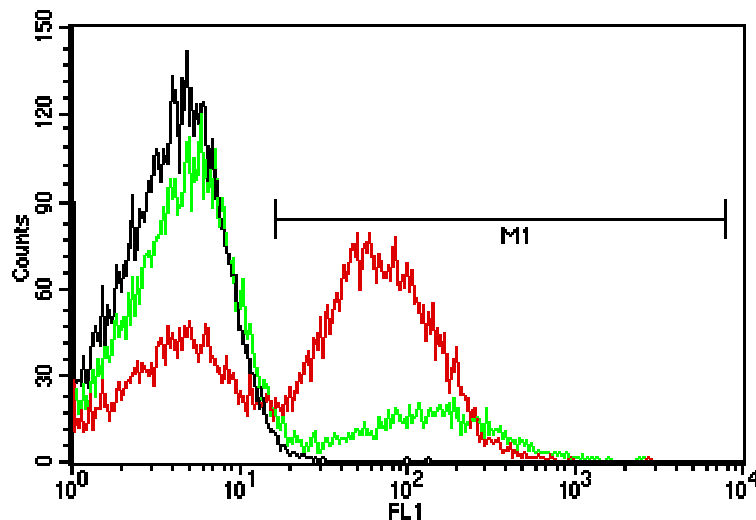
Für den Integrationsnachweis mittels PCR konnten die gleichen Primer wie bei der Integration des *GAPDH*-Promotors verwendet werden. Dies war möglich, weil die Nachweisprimer HT83 und HT114 für das integrierte PCR-Produkt im Bereich des loxP-kanMX-loxP-Markers lagen und beide Kassetten am gleichen Zielort integriert wurden. In Abb. 13 ist ein Agarosegel dargestellt, auf welchem die amplifizierten Fragmente für den Integrationsnachweis aufgetrennt wurden. Im dem 5'-Ende zugewandten Bereich der Disruptionskasette konnte im Ausgangsstamm KFY2 mit den Primern GAPDH1, GAPDH2 und HT114 ein 401bp großes Fragment amplifiziert werden und im transformierten Stamm ein 1236bp großes Fragment. Die Primer GAPDH3, GAPDH4 und HT83 lieferten in KFY2 ein 402bp großes PCR-Produkt und im disruptierten Stamm ein 680bp großes Produkt.



**Abb. 13:** 1%iges Agarosegel der im Rahmen des Integrationsnachweises des *GAL1*-Promotors vor *AGA1* amplifizierten Fragmente. In Spur 1 und 2 sind die im dem 5'-Ende der Integrationskasette zugewandten Bereich amplifizierten Fragmente dargestellt und in Spur 3 und 4 die im dem 3'-Ende zugewandten Bereich erhaltenen PCR-Produkte. Spur 1 und 3 repräsentieren den Ausgangsstamm KFY2 und Spur 2 und 4 den disruptierten Stamm. Das in Spur 4 erkennbare größere Fragment ist das Produkt einer unspezifischen Amplifikation. In den Spuren S1 und S2 sind die DNA-Längenstandards VII bzw. IX aufgetragen.

Der bezüglich der Integration des *GAL1*-Promotors vor *AGA1* als positiv identifizierte Stamm wurde mit KFY6 bezeichnet.

Die funktionelle Charakterisierung von KFY6 erfolgte in gleicher Weise, wie die des Stammes KFY5. Nach erfolgreicher Transformation mit den jeweiligen Plasmiden und entsprechender Kultivierung konnten die Stämme im Durchflußzytometer (FACS) analysiert werden. Die FACS-Analyse zeigte, daß in KFY6 durch den *GAL1*-Promotor die Transkription von *AGA1* kontrolliert werden konnte. In dem mit den Plasmiden pYD1 und pCI1 transformierten Stamm exprimierten etwa 63% aller untersuchten Zellen den  $\alpha$ -Agglutininrezeptor, welcher durch Kopplung des FITC-markierten AK die entsprechenden Zellen nach Anregung fluoreszierendes Licht abgeben ließ. In einer zum gleichen Kultivierungszeitpunkt, d.h. 23h nach Überführung der Zellen von Glukosemedium in Galaktosemedium, genommenen Probe aus der Negativkontrolle (KFY6 transformiert mit pYD1 und pGAD424) fluoreszierten nur etwa 0,6% der Zellen (vgl. Abb. 14).



Auswertung:

File: KFY6/pYD1/pCI1 in Gal (rot)			File: KFY6/pYD1/pCI1 in Glu (grün)			File: KFY6/pYD1/pGAD424 in Gal (schwarz)		
Marker	Events	%	Marker	Events	%	Marker	Events	%
All	20000	100	All	20000	100	All	20000	100
M1	12524	62,6	M1	1797	16,7	M1	464	0,6

**Abb. 14:** FACS-Histogramme des Stammes KFY6/pYD1/pCI1 nach 23stündiger Kultivierung in Galaktosemedium (rot) und in Glukosemedium (grün). Die schwarze Kurve verdeutlicht den Stamm KFY6/pYD1/pGAD424 als Negativkontrolle nach 23stündiger Kultivierung in Galaktosemedium. Nach gleicher Kultivierungsdauer in Glukosemedium wurde mit diesem Stamm ein vergleichbares Histogramm aufgenommen, welches hier aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt ist. Die Achsenbeschriftung und die Bezeichnungen in den Tabellen sind in Abb. 4 und 9 erklärt.

Im Gegensatz zu EBY100, in welchem die Expression von Aga1p und Aga2p nur in Galaktosemedium möglich ist, sollte die Zusammensetzung des Mediums in KFY6 keinen entscheidenden Einfluß auf die Induktion der Expression der  $\alpha$ -Agglutininrezeptors haben. Diese Vermutung bestätigte sich zum einem dadurch, daß bereits unmittelbar nach der Überführung der Zellen in Galaktosemedium 51% aller untersuchten Zellen den Rezeptor exprimierten. In der Negativkontrolle waren es zu diesem Kultivierungszeitpunkt nur etwa 0,5% (Daten nicht dargestellt). Zum anderen konnte gezeigt werden, daß in KFY6 auch bei Überführung der Zellen von Glukosemedium in frisches Glukosemedium Aga1p und Aga2p gebildet werden. Auffällig war aber, daß der Anteil der Zellen, die den Rezeptor exponierten, deutlich geringer war als bei Überführung der Zellen in Galaktosemedium. In Abb. 14 ist ebenfalls das FACS-Histogramm des Stammes KFY6/pYD1/pCI1 23h nach Überführung in Glukosemedium dargestellt. Unmittelbar nach dem Transfer der Zellen konnten etwa 22% der Zellen mittels AK markiert werden, 23h später waren es etwa 17%. In der entsprechenden Negativkontrolle traf dies zu beiden Zeitpunkten auf etwa 0,4% der Zellen zu. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß in KFY6 Aga1p und Aga2p nur bei Anwesenheit des intakten Gal4p exprimiert wurden und der Stamm demzufolge für die weiter geplanten Arbeiten geeignet war.

### 3.3.3. Integration einer *kanMX-P<sub>GAL1</sub>-AGA1*-Kassette in das *TRP1*-Gen

Parallel zu dem Stamm KFY6 wurde ein weiterer *S. cerevisiae*-Stamm konstruiert, in den eine *loxP-kanMX-loxP-P<sub>GAL1</sub>-AGA1* -Kassette integriert wurde. Dies geschah, um einen Stamm zu haben, der neben dem vom *GAL1*-Promotor kontrollierten *AGA1* auch das von seinem nativen Promotor kontrollierte *AGA1* enthält. Der  $\alpha$ -Agglutininrezeptor hat eine wichtige Funktion bei der Kreuzung haploider Zellen, so daß dessen Beeinflußung evtl. negative Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Kreuzung haben könnte (ROY et al., 1991). Da das auf der Expression des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors basierende neue Reportersystem perspektivisch ebenfalls für die Untersuchung multipler Proteininteraktionen mit Hilfe der sogenannten „Kreuzungsstrategie“ (vgl. 3.5.3.) eingesetzt werden sollte, mußte eine optimale Paarung mit dem neuen Reporterstamm möglich sein.

Zu diesem Zweck wurde zunächst in das unter 3.3.2. beschriebene Plasmid pKF7 das *AGA1*-Gen eingeführt. Dieses konnte unter Verwendung der Primer Ag1 und Ag2 aus genomischer DNA des Wildtyp-Stammes S288C amplifiziert werden. Die Primer wurden so gewählt, daß dem 2177bp großen PCR-Produkt die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sac*II angehängt waren. Nach entsprechender Spaltung konnte das amplifizierte Fragment mit dem durch *Bam*HI und *Sac*II linearisierten Vektor pKF7 ligiert werden. Das daraus resultierende Plasmid pKF8 hatte eine Größe von 6847bp.

Aus pKF8 wurde anschließend die Disruptionskassette *loxP-kanMX-loxP-P<sub>GAL1</sub>-AGA1* für die nachfolgende Integration in das *TRP1*-Gen des Stammes KFY2 amplifiziert. Da KFY2 Tryptophan-auxotroph ist, dürfte eine Deletion des *TRP1* keine weiteren negativen Auswirkungen auf den daraus resultierenden Stamm haben. Die Bindungsstelle des verwendeten Vorwärtsprimers Trp1 endete im Zielort für die Integration unmittelbar vor dem Startcodon des *TRP1*-Gens, die Bindungsstelle des Rückwärtsprimers Trp2 auf dem Genom begann 25bp stromab hinter dem Stopcodon. Auf diese Weise wurde durch die Integration der aus pKF8 amplifizierten Kassette das *TRP1*-Gen vollständig deletiert. Der für die Amplifikation benötigte Teil von Trp1 lag auf pKF8 wenige bp vor der ersten loxP-Stelle und der von Trp2 wenige bp hinter dem Stopcodon des *AGA1*.

Für den Integrationsnachweis wurden die Primer trp1N, trp2N und HT83 für den dem 5'-Ende zugewandten Bereich der Disruptionskassette und trp3N, trp4N und trp5N für den gegenüberliegenden Bereich verwendet. In dem die *kanMX-P<sub>GAL1</sub>-AGA1*-Kassette tragenden Stamm pKF7 wurde eine funktionelle Analyse mittels FACS durchgeführt. Bei Anwesenheit der Plasmide pYD1 und pCI1 exprimierten nach 24stündiger Inkubation in Galaktosemedium etwa 45% der Zellen Aga1p und Aga2p. Im Gegensatz dazu konnten in der entsprechenden Negativkontrolle mit pYD1 und pGAD424 zum gleichen Kultivierungszeitpunkt nur etwa 1% der Zellen mit dem FITC-gekoppelten AK markiert werden.

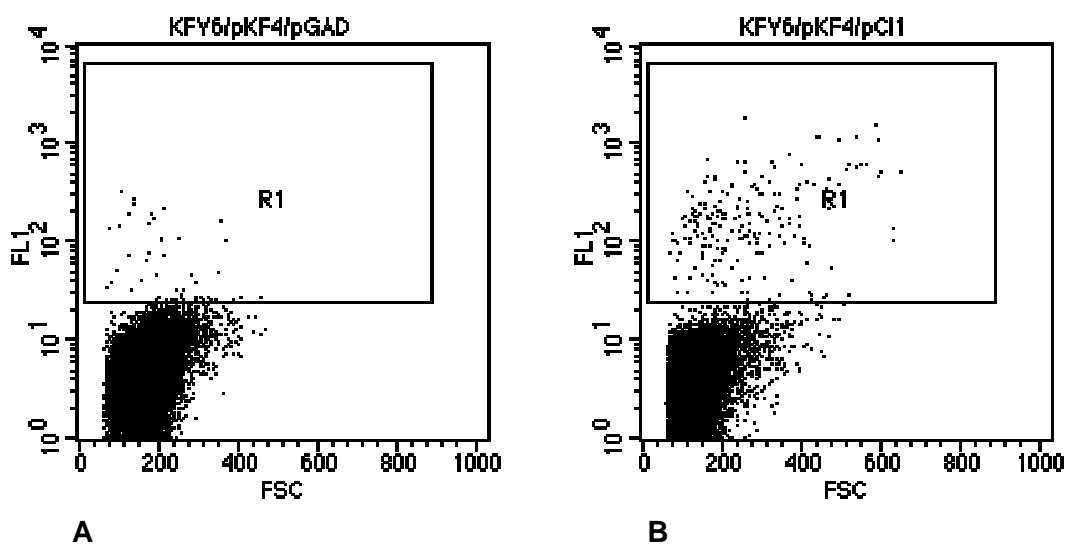
#### **3.3.4. Testung der Stämme KFY6 und KFY7 bezüglich ihrer Fähigkeit zur Paarung**

In Folge der beschriebenen Manipulationen am **a**-Agglutininrezeptor war es möglich, daß die haploiden Stämme KFY6 und KFY7 in der Fähigkeit zur Kreuzung mit haploiden MAT**a**-Stämmen und der nachfolgenden Bildung diploider Zellen eingeschränkt sind. Um dies zu untersuchen, wurden beide Stämme mit dem Plasmid pTM145 transformiert und auf Festmedium mit dem pTM146 tragenden Stamm KFY3 (MAT**a**) gekreuzt. Das Gemisch wurde anschließend in einem Verdünnungsausstrich auf eine Minimalmedium-Platte ausgebracht, die nur jenen Zellen das Wachstum erlaubte, die sowohl pTM145 als auch pTM146 trugen und demzufolge diploid sein mußten. Als Negativkontrolle wurden KFY6 und KFY7 miteinander gekreuzt, die beide den Kreuzungstyp MAT $\alpha$  haben und miteinander keine diploiden Zellen bilden dürften. Im Ergebnis dieses Versuches konnte festgestellt werden, daß weder KFY6 noch KFY7 in ihrer Fähigkeit zur Paarung eingeschränkt waren.



### 3.3.5. Konstruktion eines die $P_{GAL1}$ -AGA2-Kassette tragenden Plasmides mit Histidin als Selektionsmarker

Das von BODER und WITTRUP (1997) konstruierte und für alle bisherigen Untersuchungen verwendete Plasmid pYD1 trägt Tryptophan als Selektionsmarker. Da alle üblichen Vektoren und darauf basierenden Genbanken für das Gal4p-basierte Zweihybrid-System Leucin bzw. Tryptophan als Marker tragen, war pYD1 für die geplanten Arbeiten nicht verwendbar. Die Stämme KFY6 und KFY7 sind Histidin-auxotroph (*his3-200*), so daß diese Aminosäure als Selektionsmarker für Plasmide in Betracht kam. Für die Konstruktion eines solchen Plasmides wurde zunächst mittels PCR die  $P_{GAL1}$ -AGA2-Kassette vom *GAL1*-Promotor bis einschließlich  $MAT\alpha$ -Transkriptionsterminator aus pYD1 amplifiziert. Die dabei verwendeten Primer pYD3 und pYD4 wurden so gewählt, daß dem 1493bp großem PCR-Produkt die Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *SacI* und *SalI* angehängt waren. Nach entsprechender Restriktion konnte das Fragment mit dem durch *SacI* und *SalI*-Spaltung linearisierten Vektor pRS423 ligiert werden. Das aus dieser Ligation resultierende Plasmid pKF4 hatte eine Größe von 7207bp.



Auswertung:

File: KFY6/pKF4/pGAD

Region	Events	%
All	20000	100
R1	57	0,29

File: KFY6/pKF4/pCI1

Marker	Events	%
All	20000	100
R1	209	1,04

**Abb. 15:** Dot Plots (Punktdiagramme) der FACS-Analyse des mit den Plasmiden pKF4/pGAD424 (A) und pKF4/pCI1 (B) transformierten Stammes KFY6 zur Überprüfung der Funktionalität von pKF4. Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert eine Zelle. Auf der Abszissenachse ist als Parameter FSC die Intensität des an den Zellen gestreuten Lichtes aufgetragen. Auf der Ordinatenachse ist die Fluoreszenzintensität in einem Bereich von 515-545nm dargestellt. Die Region R1 wurde nach der Messung zum Zwecke der Auswertung eingeführt. Zur Erläuterung der Bezeichnungen in den Tabellen vgl. Abb. 9.

Um zu testen, ob mit pKF4 in einer funktionellen Untersuchung die gleichen Ergebnisse wie mit pYD1 erzielt werden können, wurde nach entsprechender Transformation in KFY6 eine FACS-Analyse durchgeführt. Wie in den Dot Plots in Abb. 15 dargestellt, konnten nur sehr wenige Zellen detektiert werden, die den vollständigen  $\alpha$ -Agglutininrezeptor exprimierten. Zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten waren nur maximal 1,04% der Zellen mit dem Fluorescein-gekoppelten AK markierbar, in den entsprechenden Negativkontrollen waren es maximal 0,3% aller gemessenen Zellen. Das Plasmid pKF4 war demzufolge für die geplante Verwendung ungeeignet.

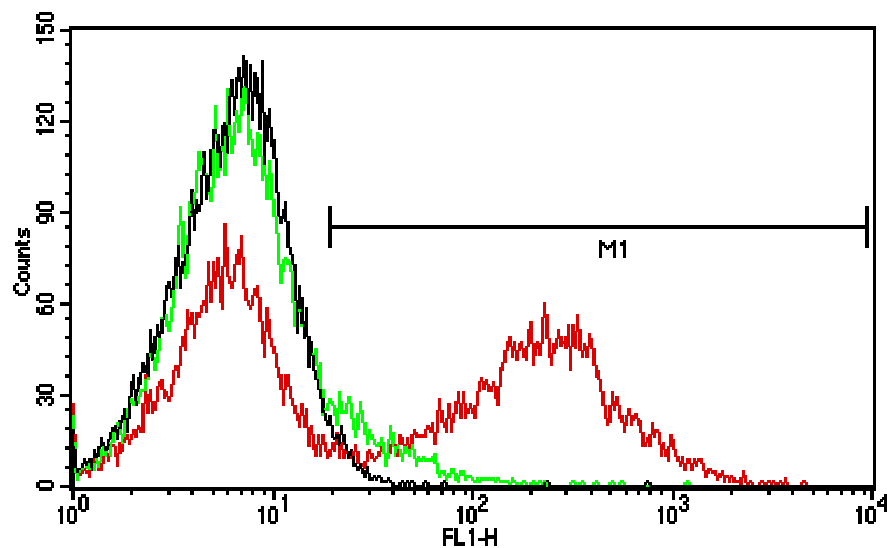
Der einzig wichtige Unterschied zwischen pYD1 und pKF4, welcher evtl. Einfluß auf die Funktionalität haben konnte, war der Replikationsursprung. Auf pYD1 ist dies ein Cen6/Ars4 und auf pKF4 ein 2micron. In einer Arbeit von DURFEE et al. (1999) ist beschrieben, das mit Cen6/Ars4-Vektoren im Zweihybrid-System eine höhere Aktivierung des Reportergens erreicht werden konnte, als mit 2micron-Vektoren, obwohl bei letzterem mehr Plasmidkopien pro Zelle vorhanden sind. Vor diesem Hintergrund beinhaltete die neue Klonierungsstrategie deshalb den Austausch des Tryptophan-Markers gegen einen Histidin-Marker direkt auf pYD1. Dazu wurde zunächst unter Verwendung der Primer His1 und His2 aus genomischer DNA des Wildtypstammes S288C das *HIS3*-Gen amplifiziert. Der Vorwärtsprimer hatte seine Bindungsstelle 451bp vor dem Startcodon des *HIS3*, um die gesamte Promotorregion mit amplifizieren zu können. Über die dem 1139bp großem PCR-Produkt angehängten Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *AccI* und *MunI* konnte *HIS3* mit dem durch *AccI* und *MunI* linearisierten Vektor pYD1 ligiert werden. Dabei wurden 144bp des *TRP1*-Markers von Startcodon ausgehend deletiert. Der neu konstruierte Vektor pKF9 hatte eine Größe von 5981bp.

Unter der gleichen Vorgehensweise wie für die bisher beschriebenden funktionellen Untersuchungen wurde getestet, ob über pKF9 Aga2p selektiv exprimiert werden konnte. Die in Abb. 16 dargestellte FACS-Analyse für den Stamm KFY6 nach einer Kultivierungsdauer von 23h nach Überführung in Galaktosemedium zeigt, daß dies der Fall war. In dem mit pCI1 und pKF9 transformierten Stamm waren über 50% der Zellen mit dem FITC-gekoppelten AK markierbar und als fluoreszierende Zellen im FACS detektierbar. In der entsprechenden Negativkontrolle (KFY6/pFK9/pGAD424/pGBT9) fluoreszierten nur etwa 2% der Zellen. Der in gleicher Weise untersuchte Stamm KFY7 brachte in Verbindung mit pKF9 ähnliche Ergebnisse. Etwa 43 % der Zellen in KFY7/pKF9/pCI1 konnten als positiv detektiert werden, in der Negativkontrolle waren es rund 2% (Daten nicht dargestellt).

Nachdem gezeigt wurde, daß durch Expression des intakten Gal4p in KFY6 und KFY7 die Transkription von *AGA1* im Genom und *AGA2* auf dem Plasmid induzierbar war, mußte anschließend getestet werden, ob dies auch im Falle einer echten Interaktion möglich war. Wie bereits für die funktionelle Untersuchung des etablierten GFP-Reporters beschrieben

(vgl. 3.2.3.), wurde hierfür die Homodimerisierung von BCY1 als Modellinteraktion verwendet. Das Histogramm der FACS-Analyse des mit den entsprechenden Plasmiden transformierten Stammes KFY6 nach einer Kultivierungsdauer von 23h ist ebenfalls in Abb. 16 dargestellt. Etwa 9% aller untersuchten Zellen konnte bei Homodimerisierung von BCY1 Aga1p und Aga2p bilden. Übereinstimmend mit den Messungen des GFP-tragenden Stammes waren dies deutlich weniger Zellen, als bei Anwesenheit des intakten Gal4p. Außerdem exprimierten die pTM145/pTM146 tragenden Hefen weniger Rezeptoren pro Zelle, was dadurch deutlich wurde, daß die im Bereich des Markers M1 detektierte Fluoreszenz um ein Vielfaches niedriger war als die im gleichem Bereich gemessene Fluoreszenz der Positivkontrolle (vgl. Abb. 16).

Es ist weiterhin wichtig festzustellen, daß durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen eine deutliche Steigerung des Anteils positiver Zellen an der Gesamtzellpopulation möglich ist. Im Vergleich zu den ersten Untersuchungen mit dem Stamm KFY6 konnte allein durch mehrmaliges Waschen der Zellen vor der Überführung in Galaktosemedium eine um etwa 25% gesteigerte Anzahl markierter Zellen erreicht werden.



Auswertung:

File: KFY6/pKF9/pCI1  
(rot)

File: KFY6/pKF9/pTM145/146  
(grün)

File: KFY6/pKF9/pGAD/pGBT9  
(schwarz)

Marker	Events	%	Mean	Marker	Events	%	Mean	Marker	Events	%	Mean
All	20000	100	147,4	All	20000	100	9,74	All	20000	100	7,4
M1	10164	50,8	284,0	M1	1797	9,0	38,2	M1	464	2,3	25,6

**Abb. 16:** Histogramme der FACS-Analyse des Stammes KFY6 zur Testung des auf der Expression des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors basierenden Reportersystems. Der mit pKF9 und pCI1 transformierte Stamm dient Positivkontrolle (rot), der pKF9 und pGAD424/pGBT9 tragende Stamm (schwarz) als Negativkontrolle. KFY6/pTM145/pTM146 repräsentiert eine echte Interaktion (grün).

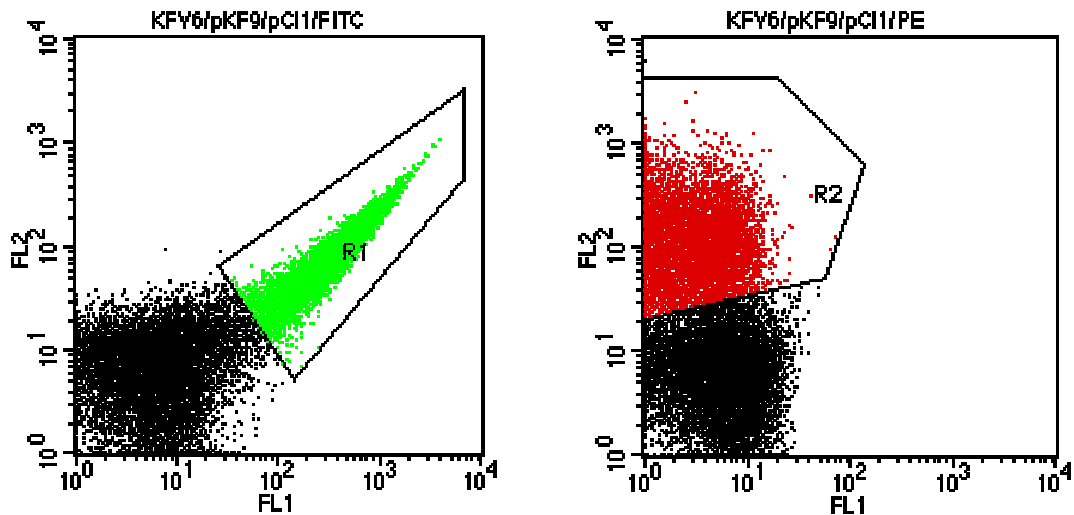
Zusammenfassend konnte als Ergebnis der Untersuchungen im FACS festgestellt werden, daß in dem neu konstruierten Stamm KFY6 bei gleichzeitiger Transformation mit pKF9 und entsprechenden Plasmiden des Zweihybrid-Systems die Expression des Agglutininrezeptors unmittelbar von der Gegenwart und Beschaffenheit des Transkriptionsfaktors Gal4p abhängig war.

Während der Kultivierung der Zellen für nachfolgende Untersuchung im FACS fiel auf, daß nur jene Stämme in Galaktosemedium wachsen konnten, die funktionelles Gal4p enthielten. Die  $OD_{600}$  in dem pCI1 tragenden Stamm erhöhte sich nach 24stündiger Kultivierung in Galaktosemedium von 0,8 auf 3,9. In dem pTM145/pTM146 tragenden Stamm war im gleichen Kultivierungszeitraum eine deutlich geringere, aber dennoch signifikante Erhöhung der  $OD_{600}$  von 0,8 auf 1,2 zu verzeichnen. Im Gegensatz dazu blieb in dem mit pGAD424 transformierten Stamm die  $OD_{600}$  konstant bei etwa 0,8. Trotz Schwankungen der Werte für die  $OD_{600}$  beim Vergleich mehrerer Versuche untereinander, war dieser Trend in jedem Test erkennbar.

### **3.3.6. Markierung des $\alpha$ -Agglutininrezeptors mit verschiedenen Antikörpern**

Das auf der Expression des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors basierende Reportersystem wurde mit dem Ziel entwickelt, positive Zellen mit unterschiedlichen Farbstoffen markieren zu können. Nachdem festgestellt wurde, daß die Stämme KFY6 und KFY7 einschließlich dem dazugehörigen Plasmid pKF9 für das Zweihybrid-System einsetzbar sind, wurde nun überprüft, ob die Markierung des Aga2p mit unterschiedlichen Antikörpern vergleichbare Ergebnisse liefert.

In Abb. 17 sind Dot Plots des Stammes KFY6 dargestellt, der mit pKF9 und pCI1 transformiert, 24h in Galaktosemedium kultiviert und anschließend in zwei parallelen Proben mit FITC-gekoppeltem AK bzw. Phycoerythrin (PE)-gekoppeltem AK markiert wurde. Wie anhand der Auswertung der Markerregionen R1 für die FITC-markierten Zellen und R2 für die PE-markierten Zellen erkennbar ist, stimmte der Anteil der markierten Zellen an der Gesamtzellpopulation bei beiden Proben sehr gut überein. Mit dem FITC-markierten AK konnten 42,4% der Zellen angefärbt werden und mit dem PE-markierten AK 42,8% der Zellen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Eignung des neu konstruierten Reportersystems für den flexiblen Einsatz in der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung.

**A**

Auswertung:

File: KFY6/pKF9/pCI1/FITC

Region	Events	%
All	20000	100
R1	8478	42,4

**B**

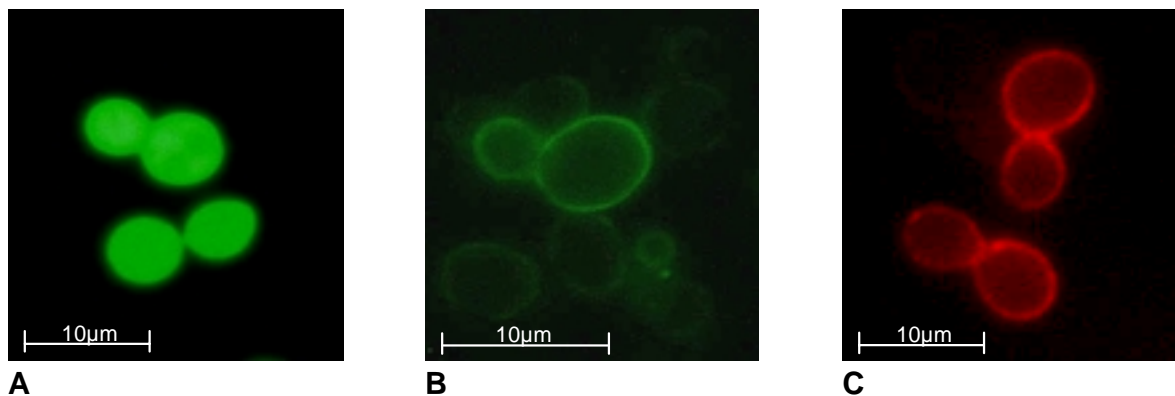
File: KFY6/pKF9/pCI1/PE

Marker	Events	%
All	20000	100
R2	8555	42,8

**Abb. 17:** Dot Plots des die Plasmide pCI1 und pKF9 tragenden Stammes KFY6, der den  $\alpha$ -Agglutininrezeptor exprimierte und in parallelen Ansätzen mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierten AK inkubiert wurde. In Bild A sind die FITC-gefärbten Zellen dargestellt (grün= fluoreszierende Zellen) und in Bild B die Phycoerythrin-gefärbten Zellen (rot= fluoreszierende Zellen). Auf der Abszissenachse ist die Intensität der grünen Fluoreszenz aufgetragen (515-545nm) und auf der Ordinatenachse die Intensität der roten Fluoreszenz (562-588nm). Die Regionen R1 und R2 wurden nach der Messung eingeführt, um Aussagen bezüglich des Anteils markierter Zellen treffen zu können. Zur Erläuterung der Bezeichnungen in den Tabellen vgl. Abb. 9.

### 3.4. Mikroskopische Untersuchung der Stämme KFY3 und KFY6

Die Stämme KFY3/pCI1 und KFY6/pKF9/pCI1 wurden parallel zur durchflußzytometrischen Untersuchung auch im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In Abb. 18/A ist erkennbar, daß sich GFP in der gesamten Zelle verteilte. Im Gegensatz dazu konnte mit den FITC-markierten AK (Abb. 18/B) und dem PE-markierten AK (Abb18/C) nur die Zelloberfläche, d.h. der dort exponierte  $\alpha$ -Agglutininrezeptor angefärbt werden.



**Abb. 18:** Mikroskopische Betrachtung der Stämme KFY3/pCI1 und KFY6/pKF9/pCI1. In Bild A ist die GFP-Fluoreszenz in Stamm KFY3/pCI1 dargestellt. In Bild B und C ist der den Agglutininrezeptor exprimierende Stamm KFY6/pKF9/pCI1 nach Markierung mit FITC-gekoppeltem AK (B) bzw. PE-gekoppeltem AK (C) abgebildet.

### 3.5. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen des Humanen Cytomegalovirus unter Verwendung der GFP-Reporterstämme KFY3 und KFY4

Nach Etablierung neuer Reportergene für das Zweihybrid-System wurde die Strategie der Durchführung umfassender Zweihybrid-Untersuchungen unter Einsatz der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung anhand der Analyse multipler Interaktionen zwischen Proteinen des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) evaluiert. Da entsprechende Genbanken für HCMV kommerziell nicht verfügbar waren, mußten diese zunächst sowohl in Fusion mit der Gal4p-DNA-BD als auch in Fusion mit der Gal4p-AD konstruiert werden. In den folgenden Kapiteln ist weiterhin die Vorselektion der DNA-BD-Genbank zur Eliminierung selbstaktivierender Klone und im Anschluß daran die erfolgreiche Identifizierung verschiedener Protein-Wechselwirkungen in HCMV beschrieben.

#### 3.5.1. Konstruktion neuer Vektoren mit der Gal4p-AD für das Zweihybrid-System

Die Konstruktion der Genbanken sollte unter Verwendung von DNA, die durch das Restriktionsenzym *Sau3AI* partiell gespalten wurde, erfolgen. Um die Wahrscheinlichkeit dafür zu erhöhen, daß diese für unterschiedliche Genabschnitte codierenden DNA-Fragmente im gleichen Leserahmen wie die *GAL4-AD* mit dem entsprechenden Plasmid ligierten, wurden Vektoren konstruiert, die sich nur im Leserahmen ihrer multiplen Klonierungsstelle unterschieden. Für die *GAL4-DNA-BD* lagen solche Vektoren in Form von pGBT9-MCS1-3 bereits vor (B. Kaiser, HKI Jena). Aus diesen Plasmiden wurden durch Spaltung mit *SaI* und *EcoRI* die jeweiligen multiplen Klonierungsstellen isoliert. Die drei 52bp, 54bp und 54bp

großen Fragmente konnten mit den jeweils durch *SaI* und *EcoRI*-Spaltung linearisierten Vektor pGAD424 ligiert werden, wodurch die Plasmide pGAD424-MCS1, pGAD424-MCS2 und pGAD424-MCS3 entstanden. Die DNA-Sequenz der multiplen Klonierungsstelle in den neuen Plasmiden wurden durch Sequenzierung überprüft und ist im Anhang dargestellt.

### **3.5.2. Konstruktion von HCMV-Genbanken in Fusion an die Gal4p-DNA-BD und an die Gal4p-AD**

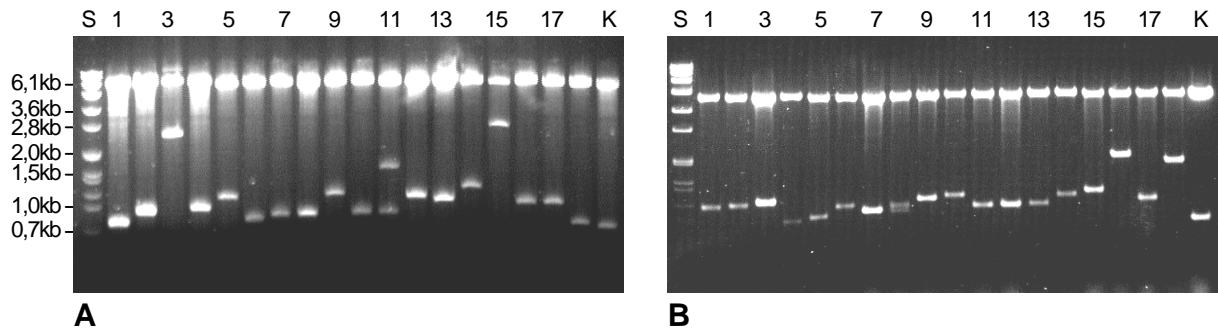
Die HCMV-Genbanken in den entsprechenden Vektoren für das Zweihybrid-System wurden auf der Grundlage einer HCMV-Cosmidbank hergestellt. Diese Cosmidbank enthielt das gesamte HCMV-Genom als teilweise überlappende *HindIII*-Fragmente kloniert in acht Cosmide. Durch Spaltung mit geeigneten Restriktionsendonukleasen und nachfolgende Auftrennung der Spaltungsprodukte über Agarosegele konnten die HCMV-DNA-Fragmente vom Cosmid getrennt werden. Die Restriktionsenzyme wurden dabei so gewählt, daß die entstehenden HCMV-DNA-Fragmente in ihrer Größe gut von dem Vektorfragment unterscheidbar waren. Bei den Cosmiden pCM1015, pCM1017, pCM1029, pCM1075 und pCM1035 war dies durch eine Spaltung mit *HindIII* gegeben, bei pCM1052 und pCM1058 kamen *HindIII* und *BglII* gemeinsam zum Einsatz und bei pCM1007 *HindIII* und *BamHI*. Nachfolgend wurden alle HCMV-DNA-Fragmente aus den Agarosegelen extrahiert und vereinigt.

Die auf diese Weise erhaltene HCMV-DNA wurde anschließend für eine partielle Spaltung mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* behandelt. *Sau3A* hat eine kurze Erkennungssequenz von vier Basenpaaren und liefert bei vollständiger Spaltung der 229354bp großen HCMV-DNA 778 Fragmente. Für eine partielle Spaltung wurden die eingesetzte Enzymaktivität und Inkubationsdauer so gewählt, daß der größte Teil der entstandenen Fragmente in einem Größenbereich von etwa 600-3000bp lag.

Durch Spaltung mit *BamHI* konnten die Vektoren pGAD424-MCS1-3 und pGBT9-MCS1-3 linearisiert werden. Um bei nachfolgenden Ligationen den Anteil an Religationen, d.h. Wiederherstellung des zirkulären Vektors ohne Aufnahme eines Fragmentes, möglichst gering zu halten, wurden die linearisierten Vektoren dephosphoryliert. Die nach *BamHI* und *Sau3A*-Spaltung zurückbleibenden Überhänge erlauben eine komplementäre Basenpaarung, so daß eine Ligation der partiell *Sau3A* gespaltenen HCMV-DNA mit den auf diese Weise vorbereiteten Vektoren möglich war.

Im Anschluß an die Transformation in *E. coli* wurde in Stichproben die Größe der von den Vektoren aufgenommenen HCMV-DNA-Fragmente überprüft. Dies geschah durch Minipräparationen mit nachfolgender *HindIII*-Spaltung der isolierten DNA. Die Vektoren pGAD424-MCS1-3 ohne HCMV-DNA-Insert lieferten dabei ein 5964bp und ein 735bp großes

Fragment, bei pGBT9-MCS1-3 entstanden ein 4615bp und ein 948bp großes Spaltungsprodukt. In Abb. 19 sind Agarosegele dargestellt, auf denen jeweils 18 repräsentative Minipräparationen in beiden Vektoren nach entsprechender enzymatischer Spaltung aufgetrennt wurden.



**Abb. 19:** Repräsentative DNA-Minipräparationen mit anschließender Spaltung der DNA durch *Hind*III zur Überprüfung der Größe der in die Vektoren pGAD424 MCS1-3 (Bild A) und pGBT9-MCS1-3 (Bild B) klonierten HCMV-DNA-Fragmente während der Konstruktion von HCMV-Genbanken. In Spur S ist auf beiden 1%igen Agarosegelen der DNA-Längenstandard VII aufgetragen. Die Spuren K repräsentieren den jeweiligen durch *Hind*III gespaltenen Vektor ohne HCMV-DNA-Insert.

Aus mehreren Ligationen und Transformationen wurden für die HCMV-Genbank fusioniert an die Gal4p-AD in den Vektoren pGAD424-MCS1-3 etwa 305.000 unabhängige Transformanden erhalten. Aus insgesamt 72 DNA-Minipräparationen dieser Genbank konnte berechnet werden, daß etwa 24% aller Transformanden HCMV-DNA-Fragmente, die größer als 300bp waren, enthielten. Die an die Gal4p-DNA-BD fusionierte HCMV-Genbank in den Vektoren pGBT9-MCS1-3 setzte sich aus etwa 400.000 unabhängigen Transformanden zusammen. Wie eine Analyse aus 126 Minipräparationen dieser Genbank ergab, trugen etwa 14% aller Transformanden HCMV-DNA-Fragmente mit einer Größe von über 300bp. Mindestens 85% der Klone beider Genbanken enthielten HCMV-DNA-Fragmente beliebiger Größe.

Aufgrund der Anzahl an unabhängigen Transformanden mit größeren Inserts wurde eingeschätzt, daß die konstruierten HCMV-Genbanken das HCMV-Genom, welches für 208 Gene codiert (CHEE et al. 1990) gut repräsentieren. Als Vergleich für diese Beurteilung diente eine von der Firma Clontech angebotene HeLa-Bank in einem Vektor für das Zweihybrid-System. Laut Herstellerangaben setzt sich diese Genbank aus 6.000.000 unabhängigen Transformanden zusammen und repräsentiert das nach neuen Erkenntnissen etwa 35.000 Gene (EWING & GREEN, 2000) umfassende menschliche Genom.



### 3.5.3. Testung der konstruierten HCMV-Genbanken im modifizierten Zweihybrid-System hinsichtlich multipler Interaktionen untereinander

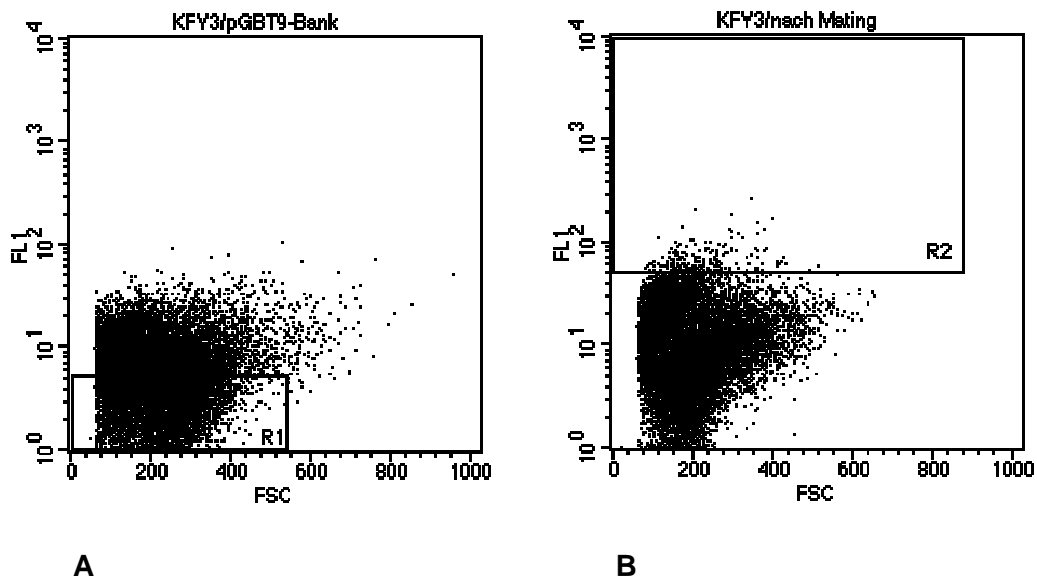
Die unter 3.5.2. beschriebenen HCMV-Genbanken wurden unter Anwendung der sogenannten „Kreuzungsstrategie“ mit Hilfe der neu entwickelten Stämme KFY3 und KFY4 im Zweihybrid-System in Bezug auf interagierende Proteine untersucht. Dazu wurde die HCMV-Genbank in pGBT9-MCS1-3 in KFY3 transformiert und die HCMV-Genbank in pGAD424-MCS1-3 in KFY4. Nach entsprechender Vorselektion, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird, wurden die beiden mit den Genbanken transformierten Hefestämme untereinander gekreuzt und die daraus resultierenden diploiden Zellen hinsichtlich der Aktivierung verschiedener Reportersysteme untersucht.

Die Transformation der Genbanken in die entsprechenden Hefestämme wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt und konnte durch Variation der Dichte der kompetenten Zellen und der eingesetzten DNA-Mengen bezüglich der Anzahl der erhaltenen Transformanden optimiert werden. Auf diese Weise konnten pro Versuch unter Einsatz von 20-30µg DNA zwischen 50.000 und 60.000 Transformanden mit KFY3 und etwa 35.000-40.000 Transformanden mit KFY4 erhalten werden. Da die Analyse der Genbanken im Zweihybrid-System in mehreren Schritten erfolgte und die Genbanken jedesmal neu transformiert wurden, standen insgesamt etwa 600.000 Transformanden der HCMV-Genbank in pGBT9-MCS1-3 und ungefähr 400.000 Transformanden der HCMV-Genbank in pGAD424-MCS1-3 für die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen zur Verfügung.

Manche Proteine oder Proteindomänen können die Transkription des entsprechenden Reportergens durch Fusion an die Gal4p-DNA-BD aktivieren, ohne daß ein an die Gal4p-AD gebundener Interaktionspartner daran beteiligt ist. Durch eine Vorselektion der HCMV-Genbank in pGBT9-MCS1-3 wurde versucht, solche transaktivierenden Klone im Vorfeld des Zweihybrid-Assays zu eliminieren. Dazu wurden die entsprechenden Transformanden von den Agarplatten abgeschwemmt und 2h in Minimalmedium kultiviert. Aliquots dieser in Hefezellen befindlichen Genbank wurden im Anschluß daran mit 1x PBS-Puffer 1:6 verdünnt und im Durchflußzytometer (FACS) sortiert.

In Abb. 20A ist ein Dot Plot einer Vorselektion einschließlich des dabei verwendeten Sortierfensters R1 dargestellt. Es ist erkennbar, daß bei dieser Sortierung die fluoreszierenden, d.h. bezüglich der Aktivierung der Transkription von *yEGFP3* als positiv zu bezeichnenden Zellen nicht sortiert und demzufolge als „Abfall“ betrachtet wurden. Da nur die in pGBT9-MCS1-3 klonierte Genbank in diese Zellen enthalten war, konnten keine Interaktionspartner vorhanden sein, so daß alle positiven Zellen als falsch positiv einzuordnen waren. Auf diese Weise wurden pro Versuch etwa 6-8ml verdünnte Hefekultur sortiert und rund 100ml sortierte Zellen (etwa 20-40 x 10<sup>6</sup> Zellen) in PBS-Puffer erhalten. Die

sortierten Zellen wurden anschließend sedimentiert und mit den Zellen des Stammes KFY4 gekreuzt, welche die HCMV-Genbank in pGAD424-MCS1-3 trugen.



Auswertung:

File: KF3/pGBT9-Bank

Region	Events	%
All	20000	100
R1	9288	46,4
R2	14	0,07

File: KFY3/nach Mating

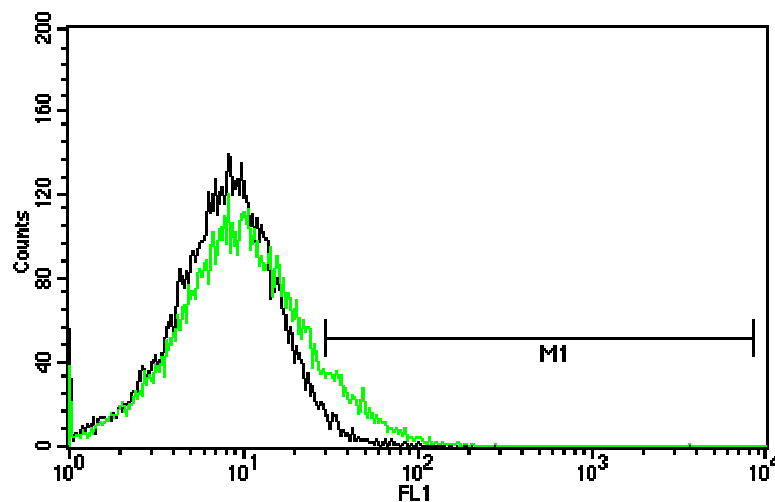
Marker	Events	%
All	20000	100
R1	5548	27,7
R2	246	1,2

**Abb. 20:** Dot Plots zur Veranschaulichung der Vor- (A) und Hauptselektion (B) im FACS. A verdeutlicht den mit der HCMV-Genbank in pGBT9-MCS1-3 (Gal4p-DNA-BD) transformierten Stamm KFY3 nach der Vorselektion und B die diploiden Zellen, die aus der Kreuzung von KFY3 und KFY4, der die HCMV-Genbank in pGAD424-MCS1-3 (Gal4p-AD) enthielt, entstanden sind. Die Regionen R1 und R2 stellen hier das jeweilige Sortierfenster dar. Das bedeutet, daß alle Zellen, die in dem jeweiligen Fenster lagen, im FACS sortiert und anschließend weiter kultiviert wurden. Alle anderen Zellen wurden verworfen. Die Achsenbeschriftungen und die Bezeichnungen in den Tabellen sind in Abb. 15 und 9 erläutert.

Nach der Paarung in YPD-Medium wurde die diploiden Zellen einer Hauptselektion im FACS unterzogen. Dafür wurden die Zellen in gleicher Weise wie für die Vorselektion vorbereitet. In Abb. 20B ist das Sortierfenster für die Hauptselektion dargestellt. Im Gegensatz zur Vorselektion wurden hier die fluoreszierenden Zellen, d.h. in Folge einer Interaktion GFP exprimierenden Hefen als positive Zellen sortiert. In manchen Versuchen wurde für die Hauptselektion noch ein weiteres Sortierfenster gelegt, welches die weniger stark leuchtenden Zellen erfaßte. Da alle positiven Zellen später noch hinsichtlich der Aktivierung zweier weiterer Reportersysteme untersucht wurden, war es an dieser Stelle nicht von

Nachteil, wenn einige wenige nicht fluoreszierende Zellen mit sortiert wurden. Nach der Hauptselektion wurden die Zellen sedimentiert und ebenfalls auf 3-AT-haltigem Medium ausplattiert.

Um der Erfolg der Vorselektion überprüfen zu können, wurde die vorselektionierten KFY3-Zellen mit KFY4 gekreuzt, der den Vektor pGAD424 ohne Fusionsprotein enthielt. Die diploiden Zellen wurden anschließend parallel zu denen, die aus der Paarung mit den die Gal4p-AD-Genbank tragenden KFY4-Zellen hervorgegangen waren, 3-AT-haltigem Selektionsmedium ausplattiert bzw. im FACS untersucht. Die Auszählung der auf diesem Medium gewachsenen Hefen ergab, daß bei etwa gleicher Ausgangszellzahl nach der Kontroll-Kreuzung keine bzw. nur vereinzelte Zellen wachsen konnten. Bei mehreren derartigen Versuchen wuchsen auf den Kontrollplatten immer unter 0,3% der Zellen, die nach Kreuzung mit dem die Gal4p-AD-Fusionsbank tragenden Stamm wachsen konnten.



Auswertung:

File: Kreuzung mit Gal4p-AD  
(schwarz)

File: Kreuzung mit HCMV-AD-Genbank  
(grün)

Marker	Events	%	Mean	Marker	Events	%	Mean
All	20000	100	9,7	All	20000	100	13,9
M1	1499	7,5	27,7	M1	3777	18,9	35,2

**Abb. 21:** FACS-Histogramme zur Kontrolle der Vorselektion. Die schwarze Kurve verdeutlicht als Negativkontrolle die diploiden Zellen nach der Paarung von KFY3, der die vorselektionierte Genbank (HCMV-DNA-BD) enthielt, mit KFY4, welcher nur die Gal4p-AD trug. Die grüne Kurve stellt die eigentliche Zweihybrid-Untersuchung dar. KFY3 mit vorselektionierter Genbank wurde hier mit KFY4, der die HCMV-AD-Genbank enthielt, gekreuzt. Der Marker M1 wurde nach der Messung zum Zwecke der Auswertung eingeführt. Zur Erläuterung der Achsenbeschriftung und der Bezeichnungen in den Tabellen vgl. Abb. 4 und 9.

Die in Abb. 21 dargestellten Histogramme bestätigen die durch Ausplattieren der Zellen auf Histidin-freiem Medium erhaltene Aussage bezüglich des Erfolges der Vorselektion. In dem Histogramm der Kontrollzellen ist nur eine Zellpopulation erkennbar. Im Vergleich dazu teilen sich die Zellen in dem anderen Histogramm, welches die diploiden Zellen nach Kreuzung der jeweils eine Genbank enthaltenden Stämme repräsentiert, in zwei Populationen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz auf. Neben einer Population nicht fluoreszierender Zellen, welche den Hauptanteil an der Gesamtpopulation darstellt, gibt es eine Gruppe fluoreszierender Zellen, die Bereich des Markers M1 liegt. Letzterer stellt hier nicht die Sortierregion für eine Hauptselektion dar, sondern wurde nur eingefügt, um anhand der statistischen Auswertung den Unterschied zwischen beiden Histogrammen besser einschätzen zu können.

Im Zusammenhang mit der Vorselektion fiel auf, daß Zellen, die nach der Transformation mehrere Tage bei 4°C gelagert wurden, im FACS ein verändertes Bild im Vergleich zu frischen Transformanden zeigten. Im Histogramm war die gesamte Zellpopulation in Richtung höherer Fluoreszenz verschoben, was evtl. auf die Akkumulation von Stoffwechselprodukten hindeutete. Aus diesem Grund erfolgte die Vorselektion stets mit frischen, d.h. maximal vier Tage alten Transformanden.

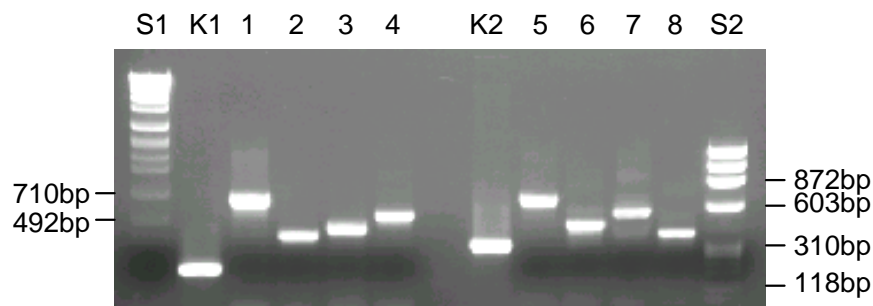
Bei einigen Versuchen kam es vor, daß die Hefezellen nach der Sortierung mit Bakterien oder anderen Pilzen kontaminiert waren. Dies konnte zum einen durch gelegentliche Reinigung des kompletten Schlauchsystems im FACS mit der Lösung FACS-Safe und Spülen des Probenzuflusses mit 70%igem Ethanol sowie Oberflächen-Desinfektion der Sortierkammer verhindert werden. Zum anderen wurde der als „Sheath-Flüssigkeit“ verwendete 1x PBS-Puffer autoklaviert und dem Selektionsmedium, auf welchem die Zellen nach der Sortierung ausplattiert wurden, Ampicillin und Geneticin (G-418) zugegeben.

#### **3.5.4. Identifizierung der HCMV-DNA-Fragmente in Hefezellen mit einer Protein-Protein-Interaktion**

Die auf 3-AT-haltigem Medium gewachsenen Zellen wurden einem Filterassay zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität unterzogen, um auch die Aktivierung des *lacZ*-Reporters durch die entsprechende Interaktion zu überprüfen. Nur in denjenigen Zellen, in denen alle drei Reportersysteme aktiviert waren, d.h. der GFP-, der *HIS3*- und der *lacZ*-Reporter, wurden anschließend die HCMV-DNA-Fragmente identifiziert. Dies geschah mittels PCR, bei welcher Sphäroplasten der jeweiligen Hefen als Matrize dienten.

In Arbeiten von KLEBANOW und WEIL (1999) und SCHENK et al. (1996) sind dafür geeignete Protokolle einschließlich der verwendeten Primer beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Amplifizierung der HCMV-DNA-Fragmente nach einer veränderten Methode

und mit einer Primerkombination, die sich aus den beiden Publikationen zusammensetzte, bewerkstelligt. Für die Amplifikation der an die Gal4p-DNA-BD fusionierten Fragmente kamen die Primer B und C zum Einsatz und für die mit der Gal4p-AD fusionierten Fragmente die Primer A und D. Mit dem Vektor pGAD424-MCS1-3 ohne Fusionsprotein als Matrize entstand ein 212bp großes PCR-Produkt, bei pGBT9-MCS1-3 ein 334bp großes Produkt. In Abb. 22 ist ein Agarosegel dargestellt, auf welchem direkt aus Hefezellen amplifizierte HCMV-DNA-Fragmente und als Vergleich die mit den Ausgangsvektoren erhaltenen Produkte aufgetrennt wurden.



**Abb. 22:** 1%iges Agarosegel mit PCR-Produkten, die aus Hefezellen mit einer Interaktion zwischen HCMV-Proteinen amplifiziert wurden. In den Spuren 1-4 sind an die Gal4p-AD fusionierte HCMV-DNA-Fragmente aufgetragen und in den Spuren 5-8 an die Gal4p-DNA-BD fusionierte Fragmente. Die Spuren K1 und K2 verdeutlichen die mit den Ausgangsvektoren pGAD424-MCS1-3 und pGBT9-MCS1-3 erhaltenen PCR-Produkte. In den Spuren S1 und S2 sind die DNA-Längenstandards VII und IX aufgetrennt.

Die PCR-Produkte konnten anschließend direkt sequenziert werden. Als Sequenzierprimer kamen dabei GAD424 für die mit den Primern A und D erhaltenen Produkte und GBT9 für die mit den Primern B und C erhaltenen Produkte zum Einsatz. Nach Optimierung der Sequenzierreaktion durch Reinigung der PCR-Produkte und starke Reduktion der eingesetzten DNA-Menge wurden sehr gut auswertbare Sequenziergele erhalten.

### 3.5.5. Gefundene Interaktionen zwischen Proteinen des Humanen Cytomegalovirus

Alle Hefeklone, in denen durch die Interaktion nicht alle getesteten Reportersysteme aktiviert werden konnten, wurden verworfen. Außerdem wurden all jene Klone nicht weiter identifiziert, bei denen durch PCR mit den Primerpaaren A und D bzw. B und C mehr als jeweils ein Produkt entstand.

Die nach Sequenzierung der PCR-Produkte erhaltenen DNA-Sequenzen konnten anhand von Sequenzvergleichen mit der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/> identifiziert werden. In Tab. 10 sind alle gefundenen Interaktionen zwischen Proteinfragmenten des HCMV aufgeführt. In den entsprechenden Hefen konnte durch Plasmidisolierung („Rescue“) und Retransformation der Plasmide in Hefe die Interaktion bestätigt werden.

**Tab. 10:** Gefundene Interaktionen zwischen Proteinfragmenten des HCMV

Nr.	Fusion mit <i>GAL4</i> -DNA-BD, Fragmentgröße (Gesamtgröße des ORF, Position des Fragmentes)	Fusion mit <i>GAL4</i> -AD, Fragmentgröße (Gesamtgröße des ORF, Position des Fragmentes)
1	HCMVUS12, 126bp (845bp, 309-434)	HCMVUL117, 155bp (1274bp, 257-411)
2	HCMVUS12, 126bp (845bp, 309-434)	HCMVUL117, 100bp (1274bp, 900-999)
3	HCMVUS15, 230bp (1454bp, 723-952)	HCMVUS26, 107bp (1811bp, 211-317)
4	HCMVUS15, 230bp (1454bp, 723-952)	HCMVUL44, 104bp (1301bp, 860-963)
5	HCMVUS19, 40bp (722bp, 284-323)	HCVUL25, 29bp (1970bp, 271-299)
6	HCMVUL30, 138bp (365bp, 263-400)	HCMVUL56, 52bp (2552bp, 702-753)
7	HCMVUL39, 98bp (374bp, 121-218)	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)
8	HCMVUL44, 104bp (1301bp, 860-963)	HCMVUL29, 166bp (1082bp, 623-788)
9	HCMVUL54, 37bp (3728bp, 2628-2664)	HCMVUL33, 49bp (1172bp, 260-308)
10	HCMVUL75, 49bp (2231bp, 2263-2311)	HCMVUL35, 141bp (1922bp, 1137-1277)
11	HCMVUL84, 175bp (1760bp, 1220-1394)	HCMVUL37exon1, 109bp (487bp, 413-521)
12	HCMVUL84, 171bp (1760bp, 1220-1390)	HCMVUL27, 91bp (1826bp, 1724-1814)
13	HCMVUL84, 171bp (1760bp, 1220-1390)	HCMVUL51, 117bp (473bp, 99-215)
14	HCMVUL86, 59bp (4112bp, 2908-2966)	HCMVUL28, 148bp (1139bp, 525-672)
15	HCMVUL86, 67bp (4112bp, 2900-2966)	HCMVUL29, 267bp (1082bp, 329-597)
16	HCMVUL86, 67bp (4112bp, 2900-2966)	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)
17	HCMVUL95, 337bp (1595bp, 87-423)	HCMVUL35, 141bp (1922bp, 1137-1277)

18	HCMVUL98, 154bp (1754bp, 1086-1239)	HCMVUL75, 75bp (2231bp, 1748-1822)
19	HCMVUL105, 102bp (2867bp, 1265-1366)	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)
20	HCMVUL105, 120bp (2870bp, 1152-1271)	HCMVUL105, 35bp (2870bp, 1268-1302)
21	HCMVUL111A, 110bp (236bp, 35-144)	HCMVUL16, 157bp (692bp, 140-296)
22	HCMVUL111A, 110bp (236bp, 35-144)	HCMVUL69, 116bp (2234bp, 1145-1260)
23	HCMVUL111A, 110bp (236bp, 35-144)	HCMVUL98, 60bp (1754bp, 1178-1239)
24	HCMVUL25, 120bp (1970bp, 153-274)	HCMVUL16, 122bp (692bp, 499-620)
25	HCMVUL25, 120bp (1970bp, 153-274)	HCMVUL32, 179bp (3146bp, 2861-3039)
26	HCMVUL25, 127bp (1970bp, 147-274)	HCMVUL44, 51bp (1301bp, 171-221)
27	HCMVUL25, 127bp (1970bp, 147-274)	HCMVUL82, 104bp (1679bp, 869-972)
28	HCMVUL25, 127bp (1970bp, 147-274)	HCMVIRL6, 49bp (335bp, 87-135)
29	HCMVUL108, 51bp (371bp, 42-92)	HCMVUL27, 91bp (1826bp, 1724-1814)
30	HCMVUL108, 57bp (371bp, 36-92)	HCMVUL47, 58bp (2948bp, 398-455)
31	HCMVUL108, 51bp (371bp, 42-92)	HCMVUL80, 112bp (2126bp, 525-636)
32	HCMVUL108, 51bp (371bp, 42-92)	HCMVUL114, 82bp (752bp, 150-231)

Im Gegensatz zu den in Tab. 10 aufgeführten Interaktionen zeigten wenige, an die GAL4p-DNA-BD fusionierte Proteinfragmente nach Isolierung der Plasmide aus den Hefezellen und anschließender Retransformation in Hefe eine Aktivierung des *lacZ*-Reporters auch ohne Anwesenheit des entsprechenden Interaktionspartners. Diese sind in Tab. 11 aufgeführt. Die eigentlich als falsch positiv zu bezeichnenden ‚Interaktionen‘ wurden nicht verworfen, da sie aus verschiedenen Gründen, welche in Abschnitt 4.4. diskutiert werden, trotzdem interessant sind.

**Tab. 11.** Fusionsproteine mit der Gal4p-DNA-BD, die transaktivierende Fähigkeiten haben und die mit ihnen detektierten Fusionsproteine mit der Gal4p-AD.

Nr.	Fusion mit GAL4-DNA-BD, Fragmentgröße (Gesamtgröße des ORF, Position des Fragmentes)	Fusion mit GAL4-AD, Fragmentgröße (Gesamtgröße des ORF, Position des Fragmentes)	Bemerkungen
1.1	HCMVUL27, 145bp (1826bp, 1583-1727)	HCMVUL28, 148bp (1139bp, 525-672)	
1.2	HCMVUL27, 145bp (1826bp, 1583-1727)	HCMVUL28, 114bp (1139bp, 669-782)	vgl. Nr. 1.1
1.3	HCMVUL27, 145bp (1826bp, 1583-1727)	HCMVUL48, 185bp (6725bp, 644-828)	
1.4	HCMVUL27, 145bp (1826bp, 1583-1727)	HCMVUL117, 156bp (1274bp, 256-411)	
2.1	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL25, >491bp (1970bp, 271- >761)	
2.2	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL27, 89bp (1826bp, 726-814)	
2.3	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL27, 284bp (1826bp, 446-729)	vgl. Nr. 2.2
2.4	HCMVUL47, 67bp (2948bp, 1199-1265)	HCMVUL28, 111bp (1139bp, 672-782)	2x gefunden
2.5	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL28, 148bp (1139, 525-672)	vgl. Nr. 2.4 2x gefunden
2.6	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL35, 72bp (1922bp, 10-81)	
2.7	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL35, 76bp (1922bp, 1274-1349)	vgl. Nr. 2.6 2x gefunden
2.8	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL35, 142bp (1922, 1301-1442)	vgl. Nr. 2.6, 2.7
2.9	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL47, 71bp (2948bp, 998-1068)	2x gefunden
2.10	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL48, 56bp (6725bp, 3668-3723)	
2.11	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL57, 37bp (3707bp, 1347-1383)	7x gefunden
2.12	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL57, 91bp (3707bp, 1380-1470)	vgl. Nr. 2.11
2.13	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL83, 169bp (1685bp, 1353-1521)	
2.14	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	HCMVUL89exon1, 129bp (827bp, 1-128)	3x gefunden
3.1	HCMVUL93, 140bp (1784bp, 21-160)	HCMVUL27, 93bp (1826bp, 724-816)	
3.2	HCMVUL93, 140bp (1784, 21-160)	HCMVUL28, 88bp (1139bp, 327-414)	2x gefunden



3.3	HCMVUL93, 268bp (1784bp, 612-879)	HCMVUL28, 118bp (1139, 411-528)	vgl. Nr. 3.2
3.4	HCMVUL93, 140bp (1784bp, 21-160)	HCMVUL28, 118bp (1139bp, 411-528)	vgl. Nr. 3.2, 3.3
3.5	HCMVUL93, 140bp (1784bp, 21-160)	HCMVUL47, 58bp (2948bp, 398-455)	2x gefunden
4.1	HCMVUL117, 100bp (1274bp, 900-999)	HCMVUL47, 85bp (2948bp, 2670-2754)	2x gefunden
4.2	HCMVUL117, 100bp (1274bp, 900-999)	HCMVUL47, 91bp (2948bp, 452-542)	vgl. Nr. 4.1
4.3	HCMVUL117, 100bp (1274bp, 900-999)	HCMVUL48, 57bp (6725bp, 2616-2672)	
4.4	HCMVUL117, 100bp (1274bp, 900-999)	HCMVUL48, 161bp (6725bp, 4994-5154)	vgl. Nr. 4.3
4.5	HCMVUL117, 100bp (1274bp, 900-999)	HCMVUL93, 140bp (1784bp, 21-160)	

## 4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes Zweihybrid-System entwickelt, welches mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung eine effiziente Untersuchung multipler Protein-Interaktionen ermöglicht. Dabei können variabel zwei verschiedene Reportersysteme eingesetzt werden: das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) und der  $\alpha$ -Agglutininrezeptor. Am Beispiel des Humanen Cytomegalovirus wurde gezeigt, daß mit Hilfe dieses neu entwickelten Systems Protein-Interaktionskarten („linkage maps“) verschiedener Organismen erstellt werden können. Viele der dabei gefundenen Protein-Protein-Interaktion des HCMV können Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen bieten und zum genaueren Verständnis dieses hoch komplexen, humanpathogenen Virus beitragen.

### 4.1. Etablierung von GFP als Reporter gen im Zweihybrid-System

Die neuen Reporterstämme wurden auf Grundlage von Hefestämmen konstruiert, die neben den für das Zweihybrid-System notwendigen Deletionen von *GAL4* und *GAL80* sowie der Integration von *lacZ* bzw. *HIS3* als Reportergene u.a. eine Mutation in *ADE2* trugen, wodurch die Zellen Adenin-auxotroph waren. *ADE2* codiert für die Phosphoribosylaminoimidazol-carboxylase, welche Phosphoribosylaminoimidazol (AIR) in Phosphoribosylaminoimidazol-carboxylat (CAIR) umwandelt. Die Akkumulation des farblosen Zwischenproduktes AIR führt durch Konjugatbildung mit verschiedenen Aminosäuren und nachfolgender oxidativer Kondensation und Polymerisation zur Bildung des charakteristischen roten Pigmentes in Adenin-auxotrophen *S. cerevisiae* - Stämmen (CHAUDHURI et al., 1996). In einer Arbeit von BRUSCHI und CHUBA (1988) ist beschrieben, daß rot pigmentierte Hefezellen unter Anregung bei 488nm und nach Subtraktion eines Spektrums von nicht pigmentierten Hefezellen im Spektrum des sichtbaren Lichtes einen breiten Peak mit einem Maximum bei 569nm aufweisen. Diese Beobachtung nutzten BRUSCHI und CHUBA (1988) zur Anreicherung von Adenin-Mutanten unter Verwendung eines FACS. Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte yEGFP3 emittiert bei Expression in *S. cerevisiae* nach Anregung bei 488nm fluoreszierendes Licht einer Wellenlänge von 490-540nm mit einem Maximum bei etwa 510nm (eigene Messungen). Da sich in Adenin-auxotrophen Hefestämmen die Fluoreszenz des GFP mit der des roten Pigmentes teilweise überlagern würde, wurden in dieser Arbeit Adenin-prototrophe Hefen konstruiert. Neben der beschriebenen Anwendung dieser Stämme für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung sind sie auch für den herkömmlichen Filterassay zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität besser geeignet, als Adenin-auxotrophe Hefen. Bei letzteren ist die rote Pigmentierung mitunter so stark, daß auf den Filtern die Detektion der durch  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität blau gefärbten Kolonien erschwert wird (T. Munder, persönliche Mitteilung).

### **GFP wurde erfolgreich in das Genom von *S. cerevisiae* integriert**

Unter Verwendung von kanMX als heterologen Resistenzmarker (WACH et al., 1994) konnte *yEGFP3* zusammen mit dem *GAL1*-Promotor mittels SFH-PCR (vgl. 3.2.1.) erfolgreich in das Genom von *S. cerevisiae* integriert werden. Diese Integration des neuen Reportergens hat gegenüber der Expression auf einem Plasmid den Vorteil, daß bei anschließender Verwendung des Stammes für Untersuchungen im Zweihybrid-System nur zwei und nicht drei Plasmide von der Zelle aufgenommen und repliziert werden müssen. Dies ist vor allem bei der Untersuchung von Genbanken von Bedeutung, da hier eine hohe Transformationseffizienz besonders wichtig ist (vgl. 4.3.). Die Anwendung von kanMX als Marker wurde der Komplementation einer Auxotrophie vorgezogen, da bei letzterem oft Probleme mit falsch positiven Transformanden auftreten (WACH, 1996) und außerdem der Genotyp der verwendeten Stämme in Anbetracht nachfolgender Plasmidtransformationen eine zusätzliche Komplementation kaum erlaubt. Das *kan<sup>r</sup>*-Gen (*kanMX*), welches für die Aminoglykosidphosphotransferase codiert (WACH, 1996), wurde zusammen mit dem Cre-loxP-Rekombinationssystem integriert, womit durch Expression der Cre-Recombinase der Marker wieder aus dem Genom entfernt und für spätere Integrationen erneut eingesetzt werden kann (GÜLDENER et al., 1996). Ein weiterer Vorteil im Zusammenhang mit einem Einsatz der kanMX-tragenden Hefen im FACS besteht darin, daß für nachfolgende Kultivierungen dem Medium das Aminoglykosid G-418 (JIMINEZ & DAVIES, 1980) zugesetzt werden kann, welches das Wachstum der resistenten Transformanden nicht beeinflusst, die Ausbreitung von Kontaminationen aber weitgehend verhindert.

Anhand einer FACS-Messung der neu konstruierten Stämme mit dem intakten Transkriptionsfaktor Gal4p als Positivkontrolle, einer echten Interaktion und dem geteilten Gal4p ohne Fusionsprotein als Negativkontrolle konnte gezeigt werden, daß die Bildung von GFP direkt von der Beschaffenheit des GAL4p abhängig ist. Das in das Genom integrierte GFP ist demzufolge als Reportergen für das Zweihybrid-System geeignet (vgl. Abb. 9). Ebenso wie mit dem *lacZ*-Reportersystem konnte dabei mit dem intakten GAL4p eine wesentlich höhere Expression des Reporters beobachtet werden, als mit einer echten Interaktion. Dies ist möglicherweise damit erklärbar, daß die AD für eine optimale Aktivierung des *GAL1*-Promotors möglichst dicht an der UAS lokalisiert sein muß und dies bei einer direkten Bindung an die DNA-BD am besten gewährleistet ist. Außerdem ist auf pCI1 der vollständige Transkriptionsfaktor Gal4p codiert, auf den Plasmiden für das Zweihybrid-System aber nur die essentiellen Regionen der jeweiligen Domäne.

Bei der Auswertung der mit dem FACS aufgenommenen Histogramme ist zu beachten, daß nur Fluoreszenzmessungen innerhalb eines Tages direkt miteinander vergleichbar sind. Wenngleich die elektronischen Geräteeinstellungen, wie PMT-Spannung, Schwellenwert und Signalverstärkung bei jeder Messung identisch waren, unterschieden sich die optischen

Einstellungen je nach erfolgter Signaloptimierung, welche zu Beginn jedes Meßtages durchgeführt werden mußte. Auf diese Weise kommt es zu Unterschieden in den absoluten Werten für die Fluoreszenz. Die prozentualen Anteile fluoreszierender Zellen und das Verhältnis zu den entsprechenden Negativkontrollen können aber auch zwischen Messungen unterschiedlicher Tage miteinander verglichen werden.

### **Mit dem GFP-Reportersystem können unterschiedlich starke Wechselwirkungen detektiert werden**

In dieser Arbeit konnte weiterhin demonstriert werden, daß in Übereinstimmung mit dem *lacZ*-Reportersystem verschieden starke Interaktionen auch eine unterschiedlich hohe Expression des GFP-Reporters bewirken. Dies wurde am Beispiel der von LI und FIELDS (1993) gefundenen Interaktion des SV40 large T-Antigen mit murinem und humanem p53 untersucht. Wie anhand eines Sequenzvergleiches festgestellt werden konnte, besteht zwischen p53 aus Mensch und p53 aus Maus eine Homologie von 76,8%. Dieser deutliche Unterschied spiegelt sich auch in der Stärke der Wechselwirkung mit dem large T-Antigen wider. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde übereinstimmend mit den Erkenntnissen von LI und FIELDS (1993) als Resultat der Interaktion mit murinem p53 im Zweihybrid-System eine signifikant höhere  $\beta$ -Galaktosidasebildung festgestellt. Parallel dazu konnte durch das GFP-Reportersystem eine deutlich stärkere Fluoreszenz in diesen Zellen beobachtet werden (vgl. Abb. 11). Die Übereinstimmung in der Aktivierung des GFP-Reporters und des *lacZ*-Reporters hinsichtlich unterschiedlich starker Interaktionen unterstreicht die Eignung von GFP als Reporter gen für das Zweihybrid-System.

Der Anteil der fluoreszierenden Zellen an der Gesamtpopulation war in Anwesenheit der stärker miteinander interagierenden Proteine höher. Ein mögliche Erklärung hierfür könnte sein, daß eine Interaktion, die offenbar ohnehin nicht in jeder Zelle stattfindet, bei einer schwächeren Wechselwirkung zwischen den beteiligten Proteinen in weniger Zellen zustande kommt, als dies bei einer stärkeren Interaktion der Fall ist. Gleichzeitig war bei einer schwächeren Interaktion die Fluoreszenz pro Zelle geringer, was vermuten läßt, daß ein intensiverer Kontakt zwischen den Interaktionspartnern auch eine bessere Verbindung der Gal4p-AD zur UAS bewirkt. Ein Vergleich dieser Überlegungen mit den Ergebnissen bezüglich der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist nicht möglich, da sowohl im Filter- als auch im Flüssigassay stets die gesamte Zellpopulation betrachtet wird und nicht Einzelzellen wie in der Durchflußzytometrie (FACS). Es kann nicht festgestellt werden, ob die geringere Blau- bzw. Gelbfärbung das Resultat einer geringeren  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität pro Zelle ist oder ob weniger Zellen  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren. Weiterhin hängt sowohl die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität als auch die Intensität der Fluoreszenz als Folge einer Interaktion im Zweihybrid-System sehr stark von jeweiligen Zustand der entsprechenden Hefezellen ab, so

daß die gleiche Interaktion bei unterschiedlichen Messungen mitunter deutlich differierende Werte liefern kann.

#### **4.2. Entwicklung eines neuartigen Reportersystems auf der Grundlage des $\alpha$ -Agglutininrezeptors**

Ein Nachteil der Verwendung von GFP als Reporter gen besteht darin, daß im Wellenlängenbereich der von GFP abgegebenen Fluoreszenz auch in Zellen Adenin-prototropher Hefestämme in unterschiedlichem Maße Autofluoreszenz detektierbar ist, welche als Hintergrund die Messung schwacher GFP-Fluoreszenz beeinträchtigen kann (vgl. 1.1.3., BILLINTON & KNIGHT, 2001). Obwohl durch die Anwendung des für den Einsatz in Hefe optimierten yEGFP3 eine relativ intensive Fluoreszenz mit längerer Excitations- und Emissionswellenlänge erreicht wurde (CORMACK et al., 1997), gab es gerade bei älteren Zellen oder bei schwacher Expression des GFP-Reporters mitunter Überlagerungen mit der natürlichen Fluoreszenz der Hefen. Um dieses Problem umgehen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein zusätzliches, alternatives Reportersystem entwickelt, welches erstmals außerhalb der Zelle den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen mit einem Emissionsspektrum jenseits des natürlichen Hintergrundes erlaubt.

#### **Der $\alpha$ -Agglutininrezeptor wird bei einer positiven Interaktion an der Zelloberfläche exponiert und kann beliebig markiert werden**

Auf der Grundlage einer Arbeit von BODER und WITTRUP (1997) konnte die Expression des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors in den Stämmen KFY6 und KFY7 unter die Kontrolle des *GAL1*-Promotors gestellt werden und ist damit direkt abhängig von der Beschaffenheit des Transkriptionsfaktors Gal4p.

In Abb. 23 ist die Expression des vollständigen  $\alpha$ -Agglutininrezeptors als Resultat einer Interaktion schematisch dargestellt. Dabei ist ein Teil (Aga1p) des aus zwei Glycoproteinen bestehenden Rezeptors im Genom codiert und der andere Teil (Aga2p) auf dem Plasmid pKF9. Bei einer Protein-Protein-Interaktion wird sowohl der *GAL1*-Promotor vor Aga2p als auch vor Aga1p aktiviert, was in der Expression des vollständigen  $\alpha$ -Agglutininrezeptors und dessen Exposition an der Zelloberfläche resultiert. Anschließend kann über ein an den C-Terminus des Aga2p fusioniertes V5-Epitop ein primärer Antikörper (AK) an den Rezeptor gebunden werden. Dieser wird wiederum von einem sekundären, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten AK erkannt. Eine unspezifische Bindung des primären AK an Epitope von *S. cerevisiae* ist relativ unwahrscheinlich, da es sich bei V5 um ein Epitop auf den P- und V-Proteinen des Paramyxovirus SV5 handelt (SOUTHERN et al., 1991).



daß die Markierung des exponierten Rezeptors mit unterschiedlichen sekundären AK übereinstimmende Ergebnisse liefert. Nach einer parallelen Markierung mit FITC- und PE gekoppelten AK wurden in der FACS-Analyse nahezu identische Zellzahlen grün und rot fluoreszierender Zellen detektiert (vgl. Abb. 17), was den Schluß zuläßt, daß der Markierungsprozeß stabil und unabhängig vom eingesetzten sekundären AK ist. Damit besteht die Möglichkeit, den exponierten Rezeptor mit Farbstoffen zu markieren, die nach Anregung langwelliges rotes oder infrarotes Licht abgeben. Dadurch könnten die Zellen in einem Bereich detektiert werden, der jenseits der biologischen Autofluoreszenz liegt. Dabei wäre z.B. der Einsatz des von der Firma Molecular Probes angebotenen sekundären, mit dem Farbstoff Texas Red<sup>®</sup> gekoppelten AK möglich. Texas Red<sup>®</sup> absorbiert langwelliges Licht bei etwa 595nm und emittiert fluoreszierendes Licht mit einem Maximum bei 615nm. Die Sortierung positiver Zellen könnte dadurch wesentlich gezielter erfolgen und würde nicht positive Zellen effektiver ausschließen können.

Eine weitere, völlig neue Möglichkeit der Sortierung von Zellen mit einer Protein-Protein-Interaktion ist die Kopplung magnetischer Beads, die mit dem sekundären AK umhüllt sind, an den  $\alpha$ -Agglutininrezeptor und anschließende Isolierung dieser Zellen durch einen Magneten. Auf diese Weise wäre eine sehr einfache und schnelle Abtrennung positiver Zellen aus einem Zellgemisch ohne großen apparativen Aufwand möglich. LAMARRE et al. (2000) nutzten magnetische Beads für die Expressionsklonierung eines Antigens an der Myceloberfläche von *Candida albicans* unter Verwendung von *S. cerevisiae* als Modelorganismus. Dabei wurden die *S. cerevisiae*-Transformanten mit den magnetischen Beads versetzt und die freien und zellgebundenen Beads nach entsprechender Inkubation über einen lateralen Magneten an der Gefäßwand festgehalten. Der Überstand konnte abgossen und die isolierten Zellen in Puffer aufgenommen werden. Sekundäre AK gekoppelt an magnetische Beads werden z.B. von der Firma Metachem Diagnostics Ltd., Northhampton, UK angeboten.

### **Ein Vergleich zwischen GFP- und $\alpha$ -Agglutininrezeptor-Reportersystem**

Im Vergleich der beiden Reportersysteme untereinander bestätigt sich die Beobachtung mit den GFP-tragenden Stämmen, daß bei einer echten Interaktion gegenüber der Anwesenheit des intakten Gal4p nicht nur weniger Zellen das Reporter gen exprimieren, sondern auch die Expression pro Zelle geringer ist. Mit dem  $\alpha$ -Agglutininrezeptor-Reportersystem war bei einer Modellinteraktion ebenfalls der Anteil fluoreszierender Zellen und die Fluoreszenz pro Zelle geringer als in Zellen mit intaktem Gal4p. Da der sekundäre AK immer gleich stark fluoresziert, kann daraus geschlossen werden, daß weniger Zellen den Rezeptor exprimierten und außerdem pro Zelle weniger Rezeptoren an der Oberfläche exponiert wurden.

GFP als Reporter im Zweihybrid-System bietet den Vorteil, das für dessen Expression keinerlei Cofaktoren oder spezielle Kultivierungen erforderlich sind und die entsprechenden

Hefen direkt im FACS gemessen und sortiert werden können. Nachteilig ist die bereits beschriebene teilweise Überlagerung der GFP-Fluoreszenz mit der Autofluoreszenz der Zellen. Dieser Nachteil kann mit dem  $\alpha$ -Agglutininrezeptorsystem umgangen werden, was allerdings den Einsatz von Antikörpern erfordert sowie aufwendigere Kultivierungen und Markierungsschritte verlangt. Ein entscheidender Vorteil dieses Systems ist weiterhin die beschriebene, sehr flexible Einsetzbarkeit.

#### **4.3. Einsatz des neuen GFP-Reportersystems für die Untersuchung von Genbanken des Humanen Cytomegalovirus im Zweihybrid-System**

Für die Untersuchung des HCMV hinsichtlich multipler Protein-Protein-Interaktionen unter Anwendung des modifizierten Zweihybrid-Systems wurden zwei Genbanken in Fusion an die *GAL4*-DNA-BD bzw. an die *GAL4*-AD konstruiert. Beide Genbanken entstanden durch Ligation partiell gespaltener HCMV-DNA mit den entsprechenden linearisierten Vektoren. In mehreren Arbeiten, deren Ziel die Erstellung von Protein-Protein-Interaktionskarten („linkage maps“) unterschiedlicher Organismen war, wurden gerichtete Einzelklonierungen aller relevanten ORFs in die für das Zweihybrid-System geeigneten Vektoren durchgeführt (z.B. UETZ et al., 2000, ITO et al., 2000, CUONATI et al., 1998). Dem gegenüber hat die Verwendung von Genbanken mit zufällig hergestellten DNA-Fragmenten einige Vorteile (BARTEL et al., 1996). Zum einen können auf diese Weise Proteinfragmente erzeugt und untersucht werden, die im Gegensatz zum dem jeweiligen gesamten Protein keine Transaktivierung des Reportergens ohne interagierenden Partner hervorrufen. Weiterhin ist es mit dieser Strategie möglich, Aussagen bezüglich spezifischer Proteindomänen zu erhalten, über welche die Proteininteraktionen bewerkstelligt werden. Manche Protein-Protein-Interaktionen können mit den vollständigen Proteinen nicht detektiert werden, da sie in isolierten Proteindomänen stattfinden (AMBERG et al., 1995). Zum anderen erfordert die Herstellung von Genbanken mit zufällig generierten DNA-Fragmenten wesentlich weniger Klonierungsschritte und ist dadurch besser geeignet für eine Anwendung in Hochdurchsatzverfahren.

Ein Nachteil solcher Genbanken ist darin zu sehen, daß bei deren Herstellung mitunter kleine DNA-Fragmente bevorzugt mit den linearisierten Vektoren ligiert werden. Dies könnte durch eine Größenseparation der zufällig erzeugten DNA-Stücke verhindert werden, wobei aber zu bedenken ist, daß auch kleine Proteinfragmente spezifische Interaktionsdomänen repräsentieren können. Die Verwendung von Genbanken, die durch Einzelklonierungen entstanden sind, erlaubt außerdem eine Ausgrenzung jener Fusionsproteine, die allein eine Aktivierung des Reportergens hervorrufen können (ITO et al., 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dies durch eine Vorselektion der die an die Gal4p fusionierten HCMV-Genbank exprimierenden Hefen mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung bewerkstelligt.



In den Arbeiten von BARTEL et al. (1996) und RAIN et al. (2001) wurden für die Erstellung von Protein-Protein-Interaktionskarten des Bakteriophagen T7 bzw. des humanpathogenen Bakteriums *Helicobacter pylori* beide Strategien der Konstruktion von Genbanken parallel angewandt und kombiniert.

Die Untersuchung der beiden konstruierten HCMV-Genbanken im Zweihybrid-System hinsichtlich der Protein-Protein-Interaktionen untereinander wurde durch Transformation jeweils einer Genbank in die Hefestämme KFY3 (MAT $\alpha$ ) und KFY4 (MAT $\alpha$ ) und nachfolgender Paarung der Hefen bewerkstelligt. Durch diese Strategie war einerseits eine Vorselektion der DNA-BD-Genbank zur Eliminierung transaktivierender Klone möglich und andererseits konnte die ansonsten notwendige Kotransformation zweier Genbanken in einen Hefestamm umgangen werden. Plasmidtransformationen in Hefe sind trotz optimierter Methoden deutlich weniger effizient als Transformationen in *E. coli* und stellen gerade bei ausgiebigen Untersuchungen von Genbanken oft den limitierenden Schritt dar (BENDIXEN et al., 1994). Die Transformationseffizienz bei Kotransformationen ist geringer als bei Einzeltransformationen.

Obwohl Aliquots der mit den Genbanken transformierten Hefen in Glycerinkulturen gelagert und für weitere Tests verwendet werden können, wurden für jede Untersuchung im Zweihybrid-System die Genbanken neu in die Hefestämme transformiert. Auf diese Weise wurde in der Gesamtheit aller Testrunden die Variabilität der in Hefe befindlichen Genbanken deutlich erhöht und die Anzahl der Transformanden konstant hoch gehalten. Außerdem konnte dadurch verhindert werden, daß die auf Fluoreszenz basierende Sortierung durch in älteren Hefezellen angehäufte und mitunter ebenfalls fluoreszierende Stoffwechselprodukte beeinträchtigt wird.

#### **Anhand des GFP-Reportersystems ist eine Vorselektion der mit Genbanken transformierten Hefen möglich**

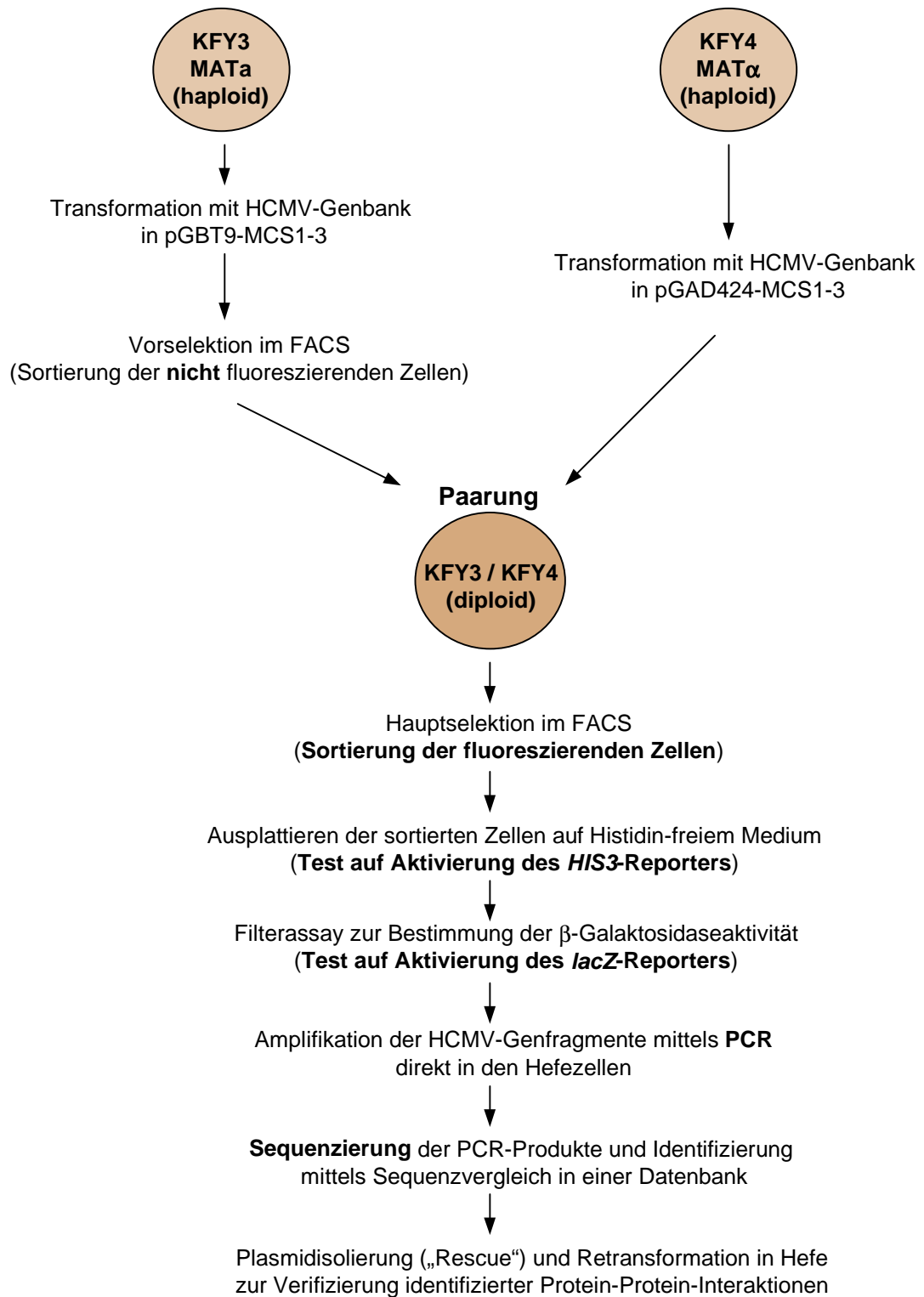
Mit GFP als Reporter gen im Zweihybrid-System war es möglich, durch die bereits erwähnte Vorselektion jene Klone aus der DNA-BD-Genbank weitgehend zu eliminieren, die allein eine Transkription des Reportergens hervorrufen können. Bei dieser Sortierung der transformierten Hefen im FACS wurde das Sortierfenster so gelegt, daß die nicht fluoreszierenden Zellen als positiv betrachtet und sortiert wurden (vgl. Abb. 20). Dabei war es wichtig zu beachten, daß auch schwach fluoreszierende Zellen von der Sortierung ausgeschlossen wurden. Bei der Beurteilung dieser Vorselektion ist zu bedenken, daß aus mehreren Gründen die Eliminierung der transaktivierenden Klone, ebenso wie bei der Anwendung anderer Methoden, nicht komplett erfolgen kann. Erstens beträgt die Sortierreinheit des FACStar Plus nicht 100% sondern liegt je nach Geräteeinstellung zwischen 93% und 97%. Zweitens ist ein FACS ursprünglich dafür ausgelegt, relativ seltene Ereignisse zu sortieren, was bei der beschriebenen Anwendung eine weitere Fehlerquelle birgt. Drittens zeigen nicht

alle transaktivierenden Klone diese Aktivität in jedem Test (persönliche Mitteilung von T. Munder). Dies bedeutet, daß ein nicht fluoreszierender Hefeklon (oder ein im  $\beta$ -Galaktosidase-Test negativer Klon) mitunter zu einem anderen Zeitpunkt eine transaktivierende Wirkung zeigen kann. Um die Qualität der Vorselektion zu überprüfen, wurden die in Abschnitt 3.5.3. beschriebenen Kontrollkreuzungen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß in der vorselektionierten DNA-BD-Genbank transaktivierende Klone nur sehr vereinzelt oder gar nicht auftraten.

In Abb. 24 ist ein Flußschema der gesamten Testung von HCMV-Genbanken untereinander im modifizierten Zweihybrid-System dargestellt. In diesem Schema ist zu erkennen, daß mit der an die Gal4p-AD fusionierten Genbank keine Vorselektion durchgeführt wurde. Eine Aktivierung des Reportergens durch an die AD fusionierte Proteine ohne interagierenden Partner ist z.B. dann möglich, wenn das entsprechende Protein eine DNA-bindende Domäne enthält. Da solche Proteine jedoch sehr selten in Untersuchungen mit dem Zweihybrid-System auftreten (persönliche Mitteilung von T. Munder) und auch in Arbeiten mit sehr restriktiven Selektionsbedingungen (vgl. BARTEL et al., 1996) keine diesbezügliche Analyse der AD-Genbank erfolgte, wurde in dieser Arbeit ebenfalls darauf verzichtet.

Die sich an die Vorselektion anschließende Paarung der sortierten Hefen mit den die AD-Genbank tragende Zellen in dem Vollmedium YPD erwies mit etwa 70% Paarungseffizienz als geeignet für eine Untersuchung von Genbanken.

In Abb. 24 sind alle weiteren Schritte dargestellt, die zur Selektion der diploiden Zellen mit einer positiven Protein-Protein-Interaktion führten. Im Zuge der Hauptselektion im FACS wurden jetzt die fluoreszierenden Zellen sortiert. Im Unterschied zur Vorselektion, bei welcher das Sortierfenster sehr restriktiv gewählt wurde, konnten in der Hauptselektion neben stark leuchtenden auch schwach fluoreszierende Zellen in einem großzügig gelegten Fenster sortiert werden. Durch Ausplattieren der sortierten Hefen auf Histidin-freiem, 3-AT-haltigem Medium und anschließendem Filterassay zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden die diploiden Zellen insgesamt hinsichtlich der Aktivierung von drei Reportersystemen getestet. Auf diese Weise konnte die Wahrscheinlichkeit für die Detektion falsch positiver Interaktionen, welche auch in Folge von Mutationen im *GAL1*-Promotor auftreten können, deutlich reduziert werden. Da nur jene Zellen weitergehend charakterisiert wurden, in welchen durch die Interaktion alle Reportersysteme aktivierbar waren, konnte unnötige Amplifikation von HCMV-DNA-Fragmenten mittels PCR und deren Sequenzierung vermieden werden.



**Abb. 24:** Flußschema der Untersuchung von HCMV-Genbanken in Fusion an die *GAL4*-DNA-BD bzw. an die *GAL4*-AD hinsichtlich multipler Protein-Protein-Interaktionen untereinander im Zwei-hybrid-System unter Verwendung fluoreszenzaktivierter Zellsortierung.

### **Die Suche nach positiven Interaktionen kann automatisiert werden**

Bei der Erstellung von Protein-Interaktionskarten unterschiedlicher Organismen sind der enorme Arbeitsaufwand und die hohen Kosten für umfangreiche Untersuchungen von Genbanken meist der limitierende Faktor (LEGRAIN et al., 2001). In vielen Arbeiten wurden deshalb Hochdurchsatz-Untersuchungen unter Verwendung von Labor-Robotern und spezieller Computersoftware durchgeführt (UETZ et al., 2000, RAIN et al., 2001). In einer sehr interessanten Arbeit von CHO et al. (1998) ist die Anwendung von Oligonukleotid-Arrays zur parallelen Identifizierung von Interaktionspartnern ausgewählter *Saccharomyces cerevisiae*-Proteine beschrieben. Dabei wurden Hefezellen mit positiver Interaktion, die aus einem Zweihybrid-Test einem bekannten, an die GAL4p-DNA-BD fusioniertem Protein und einer an die GAL4p-AD fusionierten Genbank hervorgegangen waren, vereinigt und die unbekannt Genfragmente mittels Vektor-basierten Primern amplifiziert. Das Gemisch aus PCR-Produkten konnte anschließend durch Hybridisierung auf einem Hochdichte-Oligonukleotid-Array, welcher verschiedene Oligonukleotide aller *S. cerevisiae*-Gene enthielt, analysiert werden.

Die vorliegende Arbeit bietet ebenfalls einige Ansatzpunkte für eine Optimierung in Hinsicht auf Hochdurchsatz-Anwendungen und Automatisierung. Die Sortierung der Zellen mit einer Protein-Protein-Interaktion (Hauptselektion) mit dem FACS könnte direkt in Mikrotiterplatten, welche 3-AT-haltiges Festmedium enthalten, erfolgen. Nach entsprechender Inkubation der Mikrotiterplatten und anschließender simultaner PCR könnten die amplifizierten Produkte mittels PCR-Reinigungs-Kit der Firma MACHERY-NAGEL, welcher im Rahmen der Arbeit bereits erfolgreich angewandt wurde, im 96-well-Format gereinigt und direkt sequenziert werden. Eine Identifizierung der PCR-Produkte durch Hybridisierung mit einem entsprechenden HCMV-Array, ähnlich wie in der Arbeit von CHO et al. (1998) wäre allerdings nur dann möglich, wenn für die Zweihybrid-Untersuchungen nicht zwei Genbanken, sondern eine Genbank und ein bekanntes Fusionsprotein eingesetzt werden würden.

#### **4.4. Multiple Interaktionen zwischen Proteinen des Humanen Cytomegalovirus**

Die in der Literatur zu findenden Daten über Studien bezüglich Protein-Protein-Interaktionen des HCMV unter Verwendung des Zweihybrid-Systems beschränken sich auf relativ wenige Arbeiten, welche auf Interaktionen ausgewählter Proteine fokussiert sind (z.B. HUANG et al., 2000, HOFMANN et al., 2000, AHN et al., 1998). Dabei stehen besonders die „immediate early“-Proteine, welche für den Lebenszyklus des Virus essentiell zu sein scheinen (COLBERG-POLEY, 1996), und Strukturproteine im Mittelpunkt des Interesses. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals auf Grundlage des Zweihybrid-Systems eine partielle Protein-Interaktionskarte des HCMV erstellt. Als Ergebnis der Untersuchung zweier HCMV-Genbanken untereinander konnten insgesamt 31 Interaktionen identifiziert werden, an denen 35 verschiedene Proteine beteiligt sind. Außerdem wurden 4 Proteine gefunden, die nach

Isolierung der entsprechenden Plasmide und deren Retransformation in Hefe eine Aktivierung des *lacZ*-Reporters auch in Abwesenheit des interagierenden Partners zeigten (vgl. Tab. 11). Diese Proteine, die demzufolge eine transaktivierende Wirkung zu haben scheinen, werden in einem späteren Kapitel diskutiert. In Tab. 12 sind alle detektierten Interaktionen zusammengefaßt und nach ihrer Funktion geordnet, für die keine transaktivierende Aktivität des an die GAL4p-DNA-BD fusionierten Proteinfragments festgestellt wurde und deren Interaktion nach Plasmidisolation und Retransformation im *lacZ*-Assay wieder detektiert werden konnte.

**Tab. 12 :** Übersicht der gefundenen Protein-Protein-Interaktionen sortiert nach ihrer Funktion

Interaktionen im Zusammenhang mit DNA-Replikation	
HCMVUL54 (DNA-Polymerase)	HCMVUL33 (vermutlich homolog zu G-Protein gekoppelten Rezeptoren)
HCMVUL84 (Rolle bei Initiation der DNA-Synthese, unbekannte Funktion)	HCMVUL37exon1 („immediate early“ protein, Funktion bei der DNA-Replikation)
HCMVUL84	HCMVUL51 (evtl. Funktion bei der Prozessierung der Produkte der DNA-Synthese)
HCMVUL84	HCMVUL27 (unbekannte Funktion)
HCMVUL30	HCMVUL56 (evtl. Funktion bei der Prozessierung der Produkte der DNA-Synthese)
HCMVUL105 (Helicase)	HCMVUL105
HCMVUL105	HCMVUL47 (Tegument-Protein)
HCMVUS15 (multipel hydrophobes Protein, US12 Familie)	HCMVUL44 („Polymerase-Helfer“-Protein)
HCMVUL44	HCMVUL29 (US22 Familie, unbekannte Funktion)
Interaktionen im Zusammenhang mit DNA-Metabolismus	
HCMVUL98 (DNase)	HCMVUL75 (GlycoproteinH)
HCMVUL111A (Oncogen)	HCMVUL98 (DNase)
Interaktion im Zusammenhang mit DNA-Reparatur	
HCMVUL108 (unbekannte Funktion)	HCMVUL114 (Uracil-DNA-Glycosylase)
Interaktionen im Zusammenhang mit der Virusstruktur	
HCMVUL86 (Haupt-Capsid Protein)	HCMVUL47 (Tegument-Protein, kleinstes Capsid-Protein)
HCMVUL86	HCMVUL28 (US22 Familie, Funktion unbekannt)
HCMVUL86	HCMVUL29 (US22 Familie, Funktion unbekannt)
HCMVUL39 (unbekannte Funktion)	HCMVUL47
HCMVUL108 (unbekannte Funktion)	HCMVUL47
HCMVUS19 (multipel hydrophobes Protein, unbekannte Funktion)	HCMVUL25 (Strukturprotein)

HCMVUL25 (Strukturprotein)	HCMVUL16 (Glycoprotein)
HCMVUL25	HCMVUL32 (großes strukturelles-Phosphoprotein, pp150)
HCMVUL25	HCMVUL82 (strukturelles Matrix-Phosphoprotein pp71)
HCMVUL25	HCMVUL44 („Polymerase-Helfer“-Protein)
HCMVUL25	HCMVIRL6 (gehört zu den früh exprimierten Genen, am häufigsten transkribiert)
Interaktionen zwischen weiteren Proteinen mit z.T. bekannter Funktion	
HCMVUL111A (Oncogen)	HCMVUL16 (Glycoprotein)
HCMVUL111A (Oncogen)	HCMVUL69 (induziert Arretierung des Zellzyklus in G1-Phase)
HCMVUL108	HCMVUL80 (Protease)
HCMVUL75 (GlycoproteinH)	HCMVUL35 (HCMVUL25 Familie)
HCMVUS12 (multipel hydrophobes Protein, US12 Familie)	UL117 („immediate early“ Protein, regulatorische Rolle in frühen Infektionsstadien)
Interaktionen zwischen Proteinen mit unbekannter Funktion	
HCMVUL108	HCMVUL27
HCMVUL95 (liegt in sehr konservierter Region auf dem Genom)	HCMVUL35 (HCMVUL25 Familie)
HCMVUS15 (multipel hydrophobes Protein, US12 Familie)	HCMVUS26 (US22 Familie)

Anhand der in Tab. 12 dargestellten Interaktion werden 16,8% der Proteine des HCMV-Proteoms miteinander verknüpft. Während für 60% dieser Proteine wenigstens teilweise eine Funktion beschrieben ist, stellen 40% weitgehend uncharakterisierte Proteine dar, die z.T. nur einer Genfamilie zugeordnet werden konnten. Über diese Proteine wurden in der Literatur keine deutlichen Aussagen hinsichtlich ihrer Bedeutung und Funktion gefunden. Im folgenden Abschnitt werden jene Interaktionen ausführlicher diskutiert, die in Verbindung mit den in der Literatur verfügbaren Daten besonderes interessant erscheinen.

### **Mehrere Interaktionen haben eine Bedeutung in der Pathogenität des HCMV**

Das von HCMVUL111A codierte virale Oncogen mtrII, welches im Zusammenhang mit der malignen Transformation menschlicher Zellen von Bedeutung ist, wurde in dieser Arbeit mit drei verschiedenen Interaktionspartnern gefunden. THOMPSON et al. (1994) konnten zeigen, daß stabile, mtrII (HCMVUL111A)-mRNA exprimierende Zelllinien nach Inokulation in immundefiziente Mäuse Tumoren hervorriefen. Der Mechanismus, über welchen mtrII in der Lage ist, eine maligne Transformation von Zellen zu bewirken, ist bisher nicht vollständig geklärt (DONIGER et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion von pUL111A mit pUL69 detektiert werden. Diese Interaktion stellt einen vielversprechenden

Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen dar, da pUL69 an der Arretierung des Zellzyklus durch HCMV beteiligt ist. In einer Arbeit von HAYASHI et al. (2000) ist beschrieben, daß pUL69 auch in Abwesenheit einer HCMV-Infektion den Zellzyklus in der G1-Phase arretieren kann, wodurch vermutet wurde, daß durch Viruspartikel abgegebenes pUL69 auch ohne weitere Synthese durch das infizierende virale Genom den Zellzyklus blockieren kann. Die mögliche Bedeutung der gefundenen Interaktion wird durch die Tatsache unterstrichen, daß das virale Oncogen pUL111A mit dem Tumorsuppressorprotein p53 interagiert (DONIGER et al., 1999). Ebenso wie pUL69 spielt p53 eine Rolle bei der Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase und hat, ebenfalls in Übereinstimmung mit pUL69, transaktivierende Eigenschaften (RYAN et al., 2001, DONIGER et al., 1999, SARISKY & HAYWARD, 1996). Mehrere Studien mit anderen viralen Oncogenen, wie z.B. dem SV40 large T-Antigen, haben gezeigt, daß diese Proteine an zelluläre Tumorsuppressorproteine binden und damit wichtige Kontrollstellen im Zellzyklus außer Kraft setzen (SCHREIER & GRUBER, 1990). Denkbar, wengleich sehr spekulativ ist die Annahme, daß pUL111A, um seine transformierenden Eigenschaften entfalten zu können, an pUL69, ebenso wie an p53 bindet, und es inaktiviert nachdem es seine Funktion erfüllt hat. Dies würde auch damit korrelieren, daß pUL111A zu den spät exprimierten Proteinen gehört, während pUL69 eher in früheren Phasen der Infektion exprimiert wird (CHAMBERS et al., 1999).

Die beiden weiterhin detektierten Interaktionen von pUL111A beziehen sich auf die DNase (pUL98) und das Glycoprotein pUL16. Die Interaktion mit dem Glycoprotein muß dabei mit Skepsis betrachtet werden, da Proteine, die posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen erfordern, mitunter für eine Analyse im Zweihybrid-System nicht geeignet sind (Munder et al., 1997).

Ein Teil der detektierten Protein-Protein-Interaktionen steht im Zusammenhang mit der DNA-Replikation des HCMV. Eine möglichst genaue Kenntnis darüber ist besonders in Bezug auf die Behandlung HCMV-infizierten Patienten interessant, da diese derzeit direkte und indirekte Polymerase-Hemmer einschließt. Während das Medikament Ganciclovir dabei als Dihydroxypropoxymethylguanin einen Kettenabbruch bei der Nukleinsäureproduktion bewirkt, inhibiert Foscarnet direkt die HCMV-DNA-Polymerase (SULLIVAN et al., 1992, SNOECK et al., 1993). Obwohl mit einer Kombination dieser beiden Medikamente der Virustiter in HCMV-infizierten Patienten derzeit stark verringert werden kann, erfordert die besonders bei AIDS-Patienten, für welche eine HCMV-Infektion lebensbedrohliche Folgen haben kann, steigende Resistenz gegenüber beiden Wirkstoffen eine Entwicklung neuer Medikamente. Ansatzpunkte für die Suche nach neuen antiviral wirksamen Verbindungen könnten z.B. Proteine bilden, die mit der DNA-Polymerase interagieren oder anderweitig in die DNA-Replikation involviert sind (ANDERS & MCCUE, 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit pUL33 ein Interaktionspartner der HCMV-DNA-Polymerase detektiert. Über

dieses Protein konnten in der Literatur keine Aussagen hinsichtlich seiner Funktion gefunden werden und auch die Daten bezüglich der kinetischen Klasse der Genexpression variieren (CHAMBERS et al., 1999). Es wurde allerdings festgestellt, das dieses Protein homolog zu zellulären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist, wodurch eine Rolle bei der Beeinflussung intrazellulärer Prozesse vermutet wird (MARGULIES et al., 1996). Die Relevanz der gefundenen Interaktion im Virus und deren mögliche Bedeutung können erst durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Weitere interessante Interaktionen in diesem Zusammenhang stellen die Wechselwirkungen des Proteins pUL84 dar. In einer Arbeit von SPECTOR und TEVETHIA (1994) ist beschrieben, daß pUL84 und das „immediate early“-Protein IE2 miteinander einen Komplex bilden. Das Protein pUL84 ist essentiell für die Expression jener Proteine, welche die Replikationsgabel bilden (SARISKY & HAYWARD, 1996). Da es selbst nicht in der Lage ist, frühe Promotoren zu aktivieren, wird eine Funktion in der Initiation der DNA-Synthese vermutet (ANDERS & MCCUE, 1996). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Interaktion von pUL84 mit dem „immediate early“-Protein pUL37, für welches ebenfalls eine Rolle DNA-Replikation angenommen wird, gefunden werden. Eine genauere Kenntnis dieser Interaktion könnte ebenso die Wechselwirkung von pUL84 mit pUL51, für eine Charakterisierung des offenbar sehr wichtigen Proteins pUL84 von Nutzen sein. Auf der Grundlage von Homologien zu Genen des HSV-1 wird für pUL51 eine Funktion in der Prozessierung der Produkte der DNA-Synthese vermutet, genaue Erkenntnisse darüber liegen aber noch nicht vor (ANDERS & MCCUE, 1996).

#### **Weitere Interaktionen stehen im Zusammenhang mit der Virusstruktur**

Angesichts der sehr komplexen Zusammensetzung des HCMV ist es nicht verwunderlich, daß ein großer Teil der gefundenen Interaktionen in Beziehung zur Virusstruktur steht. Protein-Protein-Interaktionen haben im Prozess des Zusammenbaus der Viruspartikel wahrscheinlich initiiierende und regulatorische Bedeutung (GIBSON, 1996). Das von HCMVUL86 codierte Capsidprotein (major capsid protein, MCP) ist das größte der vier Proteine, aus welchen sich das HCMV-Capsid zusammensetzt. Die drei anderen Proteine, welche durch das kleine Capsidprotein (minor capsid protein, mCP), das mCP-bindende Protein (mC-BP) und das kleinste Capsid-Protein (smallest capsid protein, SCP) repräsentiert werden, tragen zusammen nur 10% zur Masse des Capsids bei. Über das SCP, auf welches im folgenden Kapitel näher eingegangen wird, besteht ein Zusammenhang mit der Tegumentschicht des Virus, die zwischen dem Capsid und der Virushülle liegt (GIBSON, 1996). Eine in dieser Arbeit gefundene Interaktion zwischen dem MCP (pUL86) und pUL47 als Bestandteil des SCP könnte daher eine Rolle in der Vermittlung zwischen dem Capsid und dem Tegument spielen. Weitere, in dieser Arbeit detektierte Protein-Wechselwirkungen verknüpfen Bestandteile des Teguments untereinander. Das in einer



Arbeit von BATTISTA et al. (1999) charakterisierte Tegumentprotein pUL25 trat mit fünf verschiedenen Interaktionspartnern auf. Zwei davon, das von HCVMUL32 codierte Phosphoprotein pp150 (basic phosphoprotein, BPP) und das von HCMVUL82 codierte ‚obere‘ Matrixprotein pp71 (upper matrix protein, UM) sind ebenfalls im Tegument lokalisiert. Obwohl das Tegument etwa 40% zur Gesamtmasse des Virusparikels beiträgt, ist die Funktion der darin enthaltenen Proteine im Detail nicht geklärt (BATTISTA et al., 1999). Während das BPP als eines der am stärksten immunogenen Proteine des HCMV bekannt ist, kann pp71 als transkriptionaler Transaktivator der ‚immediate early‘-Promotoren fungieren (GIBSON et al., 1996). Die drei anderen gefundenen Interaktionspartner sind das Glycoprotein pUL16, pIRL6 und pUL44, über deren Bedeutung im Zusammenhang mit pUL25 nur spekuliert werden könnte. So scheint z.B. das mit der DNA-Polymerase assoziierte Protein pUL44 ein unerwarteter Partner eines Strukturproteins zu sein. Es ist allerdings zu bedenken, daß Strukturproteine an der Verpackung der DNA beteiligt sind und dieser Prozeß ebenfalls noch nicht vollständig geklärt ist.

Für die von HCMVUL105 codierte Helicase wurde im Rahmen dieser Arbeit eine intramolekulare Wechselwirkung zweier dicht nebeneinanderliegender und sich z.T. überlappender Proteindomänen gefunden. Solche intermolekularen Verbindungen sind auch aus anderen Arbeiten bekannt (BARTEL et al., 1996) und könnten auf eine entsprechende Proteinfaltung hindeuten. Die ebenfalls detektierte Interaktion der Helicase mit dem Strukturprotein pUL47 scheint zunächst wenig wahrscheinlich. Vor dem Hintergrund der Tatsache, daß die vollständige Funktion und Bedeutung von pUL47 bisher nicht geklärt ist, könnte dies dennoch eine wichtige Information darstellen.

Die Wechselwirkung von pUS12 mit pUL117 wurde in zwei unterschiedlichen Proteinregionen von pUL117 detektiert. Da die interagierenden Domänen oft auf einen bestimmten Bereich der Proteine beschränkt sind, könnte dies evtl. auf eine entsprechende Faltung des Proteins pUL117 hindeuten.

#### **Vier an die Gal4p fusionierte Proteine zeigen transaktivierende Aktivität**

Das Genom des Humanen Cytomegalovirus codiert für mehrere regulatorische Proteine, die in sehr frühen Phasen der HCMV-Infektion von unterschiedlichen Orten des Genoms transkribiert und in der Literatur als ‚immediate early‘-Proteine (IE-Proteine) bezeichnet werden. Die Aktivierung dieser Gene, welche in HCMVUL123, HCMVUL122 (IE1, IE2), HCMVUL36-38, HCMVUL115-119, TRS1/IRS1 und US3 codiert sind, ist unabhängig von vorangehender Synthese viraler Proteine und initiiert das virale Programm der Genexpression. Es ist bekannt, daß die IE-Proteine untereinander interagieren und in der Lage sind, durch transaktivierende Aktivität die Expression anderer viraler und zellulärer Proteine zu steuern (CHEE et al. 1990, COLBERG-POLEY, 1996, STENBERG, 1996). Nur eines dieser

Proteine, pUL117, wurde in der vorliegenden Arbeit als Fusionsprotein mit der Gal4p-DNA-BD gefunden, was angesichts der mehrfach dokumentierten Aktivität der relativ zahlreichen IE-Proteine zur Aktivierung viraler und zellulärer Promotoren für die Qualität der im voraus beschriebenden Vorselektion zur Eliminierung transaktivierender Klone spricht. Das Protein pUL117 ist eines der wenigen IE-Proteine, für welches die Fähigkeit zur Transaktivierung in der Literatur noch nicht beschrieben ist (COLBERG-POLEY, 1996). In dieser Arbeit wurde festgestellt, daß nach Plasmidisolierung und geeigneter Retransformation das an die Gal4p-DNA-BD fusionierte Fragment von HCMVUL117 auch ohne einen an die Gal4p-AD fusionierten Interaktionspartner eine Transkription des *lacZ*-Reporters hervorrufen konnte. Interessanterweise wurden mit den Proteinen pUL47 und pUL93 als ‚Partner‘ von pUL117 zwei Proteine gefunden, welche in dieser Arbeit ebenfalls transaktivierende Aktivität aufwiesen. Dem Protein pUL47 gebührt besondere Beachtung, da es dabei um ein Protein handelt, dessen Sequenz mit konservierten Capsid-Protein-Sequenzen des Epstein-Barr-Virus (EBV), des Varizella-Zoster-Virus (VZV) und des Herpes-simplex-1 Virus (HSV-1) übereinstimmt (CHEE et al. 1990). Trotz der in dieser Arbeit gefundenen Fähigkeit von pUL47 zur Transaktivierung des *lacZ*-Reportergens trat dieses Protein mit anderen Proteinen auf, die einerseits aufgrund der beschriebenen Proteinfunktionen bzw. -lokalisierung durchaus als echte Interaktionspartner in Frage kämen und andererseits in einem Fall als solche bereits in der Literatur beschrieben sind. Bei letzterem handelt es sich um die Interaktion zwischen pUL48 und pUL47, die als HMWP (high molecular-weight protein, pUL48) und hmwp-BP (HMWP-binding protein, pUL47) einen Komplex bilden und als solcher aus Viruspartikeln oder Lysaten HCMV-infizierter Zellen immunopräzipitiert werden können (GIBSON, 1996). Dieser auch als Bestandteil des kleinsten Capsid-Proteins (smallest capsid protein) bezeichneter Komplex ist zusammen mit dem großen und dem kleinen Capsid-Protein sowie einigen anderen Proteinen maßgeblich an der strukturellen Formation der Viruspartikel beteiligt. Im diesem Zusammenhang scheint auch eine Interaktion zwischen pUL47 und pUL83, welches auch als ‚unteres‘ Matrixprotein pp65 bezeichnet wird und als Strukturprotein im Tegument der Viruspartikel lokalisiert ist (BALDICK & SCHENK, 1996), plausibel zu sein. Ebenso verhält es sich mit pUL25, welches ebenfalls ein im Tegumentprotein ist und pUL35, das zur pUL25-Familie gehört, als ‚Partner‘ von pUL47. Weiterhin bemerkenswert scheint die Tatsache, daß pUL28, welches in dieser Arbeit als Interaktionspartner des großen Capsid-Proteins identifiziert wurde (vgl. Tab. 12), ebenfalls zusammen mit pUL47 gefunden wurde. Diese war in mehreren unabhängigen Untersuchungen und mit zwei direkt benachbarten pUL28-Fragmenten detektierbar. Da über die Proteine pUL27 und pUL93 in der Literatur keine detaillierten Aussagen bezüglich deren genauer Funktion und Lokalisation gefunden werden konnten, sind Betrachtungen hinsichtlich der mit ihnen gefundenen Proteine nicht möglich.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die mit dem Zweihybridssystem gefundenen Ergebnisse bezüglich der Proteine pUL117, pUL93, pUL47 und pUL27 weiterer Untersuchungen mit Hilfe anderer Methoden zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen bedürfen. Die Resultate sind aber schon allein aus dem Grund beachtenswert, daß sie transaktivierende Fähigkeiten für Proteine beschreiben, für welche in der Literatur bisher eine solche Aktivität nicht bekannt ist.

#### 4.5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit bietet mehrere Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen. Bezüglich des  $\alpha$ -Agglutininrezeptor-Systems wäre es lohnenswert, eine Methode zu etablieren, welche die Isolierung von Zellen mit einer Protein-Protein-Interaktion durch Kopplung magnetischer Beads erlaubt. Weiterhin wäre es von Vorteil, das auf dem Plasmid pKF9 codierte Aga2p unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors ebenfalls in das Genom zu integrieren. Dadurch müßten bei nachfolgender Verwendung des Systems für Untersuchungen im Zweihybrid-System nur zwei Plasmide von der Zelle aufgenommen und repliziert werden. Als Zielort für diese Gendisruption würde sich z.B. das *LEU2*-Gen anbieten.

Weiterhin könnte die Methodik der Hauptselektion und der nachfolgenden Identifizierung der HCMV-DNA-Fragmente hinsichtlich eines automatisierten Ablaufes optimiert werden. Für die Verwendung der GFP-Reporterstämme würde der Einsatz anderer Filter im FACS möglicherweise eine noch deutlichere Trennung der GFP-Fluoreszenz von der Autofluoreszenz erlauben. Solche optimierten Filter werden derzeit in unserer Arbeitsgruppe getestet.

In Hinsicht auf die in dieser Arbeit detektierten Protein-Protein-Interaktionen des HCMV wäre es notwendig, ausgewählte Interaktionen mit Hilfe anderer Methoden zur Detektion von Protein-Wechselwirkungen, wie z.B. einem *in vitro*-Interaktionsnachweis mit GST-Fusionsproteinen, weitergehend zu untersuchen. Besonders interessant dafür scheinen die Interaktion des viralen Oncogens pUL111A mit pUL69 und die Interaktionen von pUL84 zu sein.

Im Zusammenhang mit der Ähnlichkeit der Funktion von pUL69 mit der des Tumorsuppressorproteins p53 wäre es interessant, die HCMV-Genbank in Hinsicht auf Interaktionen mit p53 zu untersuchen. Außer den bekannten Wechselwirkungen von p53 mit pUL111A (DONIGER et al., 1999) und mit IE84 (SPEIR et al., 1994) gibt es evtl. noch weitere Interaktionspartner, die zu eine Aufklärung oncogenen Potentials von HCMV beitragen könnten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten neuartige, fluoreszenzbasierte Reportersysteme entwickelt werden, welche den Einsatz des Zweihybrid-Systems in der funktionellen Proteomanalyse erleichtern und dessen Effizienz deutlich steigern können. Die Analyse multipler Protein-Protein-Interaktionen in *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus erfolgt dabei mit Hilfe fluoreszenzaktivierter Zellsortierung – einer Technik, die für Hochdurchsatz-Anwendungen geeignet ist und eine Automatisierung zuläßt.

In diesem Zusammenhang wurden zunächst die haploiden Hefestämme KFY3 (MAT $\alpha$ ) und KFY4 (MAT $\alpha$ ) konstruiert, in welchen das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) als funktionelles, zusätzliches Reporter gen stabil in das Genom integriert wurde. Beide Stämme sind Adenin-prototroph, was eine grundlegende Voraussetzung für fluoreszenzbasierte Anwendungen darstellt. In der vorliegenden Arbeit konnte dies in kommerziell erhältlichen *S. cerevisiae*-Stämmen, welche die für auf dem Transkriptionsfaktor Gal4p beruhende Zweihybrid-System geeignet sind, mittels Austausch des mutierten *ADE2* durch das entsprechende intakte Gen bewerkstelligt werden. Anhand einer Untersuchung der Interaktionen des SV40 large T-Antigens mit murinem und humanem p53 konnte in Übereinstimmung mit dem klassischen *lacZ*-Reporter gezeigt werden, daß je nach Art der Protein-Wechselwirkungen das GFP-Reportersystem verschieden stark aktiviert wird und demzufolge die Zellen mit unterschiedlicher Intensität fluoreszieren.

Parallel dazu wurde ein neuartiges Reportersystem entwickelt, bei dem eine positive Protein-Protein-Interaktion erstmals in der Exposition eines Rezeptors an der Oberfläche der Hefezellen resultiert. In den dafür konstruierten, Adenin-prototrophen Hefestämmen KFY6 und KFY7 ist die Expression des  $\alpha$ -Agglutininrezeptors von der Rekonstitution des funktionstüchtigen Transkriptionsfaktors Gal4p und damit von dem Auftreten einer Protein-Wechselwirkung abhängig. Dies eröffnet eine völlig neue Möglichkeit der Detektion und Isolierung positiver Zellen im Zweihybrid-System, da die Markierung des Rezeptors über Bindung eines sekundären, Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers erfolgt. Unter dem variablen Einsatz verschiedener synthetischer Farbstoffe kann den Zellen auf diese Weise eine Fluoreszenz jenseits des biologischen Hintergrundes verliehen werden.

Die Strategie der proteomweiten Analyse von Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wurde mit Hilfe der GFP-tragenden Reporterstämme am Beispiel der Erstellung einer ersten, partiellen Protein-Interaktionskarte des Humanen Cytomegalovirus evaluiert. Dazu wurden zwei HCMV-Genbanken mit zufällig hergestellten HCMV-DNA-Fragmenten in für das Zweihybrid-System geeigneten Vektoren

konstruiert und untereinander hinsichtlich vielfältiger Protein-Wechselwirkungen untersucht. Durch Kombination der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung und der sogenannte Kreuzungsstrategie, bei der die Genbanken zunächst getrennt in die haploiden Reporterstämme transformiert wurden, konnten im Vorfeld der eigentlichen Zweihybrid-Analyse transaktivierende Klone aus der an die Gal4p-DNA-BD fusionierten Genbank weitgehend eliminiert werden.

Im Zweihybrid-Assay wurden die diploiden Zellen, die aus der Paarung der haploiden Hefen hervorgegangen waren und in denen eine Protein-Protein-Interaktion stattfand, hinsichtlich der Aktivierung aller drei in den Hefestämmen enthaltenen Reporter getestet: 1. durch Sortierung der fluoreszierenden Zellen im FACS, 2. durch Test auf Aktivierung des *HIS3*-Reporters und 3. durch Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (lacZ-Assay).

Die Untersuchung des Proteoms von HCMV führte zur Identifizierung von 31 verschiedenen Protein-Protein-Interaktionen, an denen 35 unterschiedliche Proteine beteiligt sind. Mehrere dieser Interaktionen haben eine Beziehung zur Pathogenität des Virus, wie z.B. die Wechselwirkung des viralen Oncogens pUL111A mit pUL69, welches den Zellzyklus arretiert. Ebenso interessant sind die Interaktionen von pUL84, das an der Initiation der DNA-Synthese beteiligt ist und dessen vollständige Funktion noch nicht aufgeklärt ist. Diese und andere gefundene Interaktionen im Zusammenhang mit der DNA-Replikation, sowie ebenfalls detektierte Wechselwirkungen von Strukturproteinen, können einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Natur dieses humanpathogenen Virus leisten und gegebenenfalls neue Ansatzpunkte für die Entwicklung alternativer Therapieansätze liefern.

## 6. LITERATUR

- Ahn, J. H., C. J. Chiou and G. S. Hayward. 1998. Evaluation and mapping of the DNA binding and oligomerization domains of the IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus using yeast one and two hybrid interaction assays. *Gene* **210**: 25-36.
- Amberg, D. C., E. Basart and D. Botstein. 1995. Defining protein interactions with yeast actin *in vivo*. *Nat. Struct. Biol.* **2**: 28-35.
- Anders, D. G. and L. A. McCue. 1996. The human cytomegalovirus genes and proteins required for DNA synthesis. *Intervirology* **39**: 378-388.
- Baldick, C. J., JR. and T. Shenk. 1996. Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles. *J. Virol.* **70**: 6097-6105.
- Bankier, A. T., S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, M. S. Chee, C. A. Hutchinson, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, E. Preddie, S. C. Satchwell, P. Tomlinson, K. M. Weston and B. G. Borell. 1991. The DNA sequence of the human cytomegalovirus genome. *J. DNA Sequencing and Mapping.* **2**: 1-12.
- Bartel, P. L., J. A. Roecklein, D. SenGupta and S. Fields. 1996. A protein linkage map of *Escherichia coli* bacteriophage T7. *Nature Genetics* **12**: 72-77.
- Battista, M. C., G. Bergamini, M. C. Boccuni, F. Campanini, A. Ripalti and M. P. Landini. 1999. Expression and characterisation of a novel structural protein of human cytomegalovirus, pUL25. *J. Virol.* **73**: 3800-3809.
- Baudin, A., O. Ozier-Kalogeropoulos, A. Denouel, F. Lacroute and C. Cullin. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3329-3330.
- Bendixen, C., S. Gangloff and R. Rothstein. 1994. A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **22**: 1778-1779.
- Billinton, N. and A. W. Knight. 2001. Distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Analytical Biochemistry* **291**: 175-197.
- Birnboim, H. C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **Nov 24, 7(6)**: 1513-23.
- Boder, E. T. and K. D. Wittrup. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology* **15**: 553-557.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459.
- Breeden, L. and K. Nasmyth. 1985. Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**: 643-650.
- Breeden, L. and K. Nasmyth. 1987. Cell cycle control of the yeast HO gene: *cis*- and *trans*-acting regulators. *Cell* **48**: 389-397.
- Bruschi, C. V. and P. J. Chuba. 1988. Nonselective enrichment for yeast adenin mutants by flow cytometry. *Cytometry* **9**: 60-67.
- Cappellaro, C., C. Baldermann, R. Rachel and W. Tanner. 1994. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of  $\alpha$ - and  $\alpha$ -agglutinin. *EMBO J.* **13**: 4737-4744.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. Prasher. 1994. Green fluorescent protein as a marker for Gene Expression. *Science* **263**: 802-805.

- Chambers, J., A. Angulo, D. Amaratunga, H. Guo, Y. Jiang, J. S. Wan, A. Bittner, K. Frueh, M. R. Jackson, P. A. Peterson, M. G. Erlanger and P. Ghazal.** 1999. DNA Microarrays of the complex human cytomegalovirus genom: profiling kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J. Virol.* **73**: 5757-5766.
- Chaudhuri, B., S. Ingavale and A. K. Bachhawat.** 1996. *apd1<sup>+</sup>*, a gene required for red pigment formation in *ade6* mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump. *Genetics* **145**: 75-83.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. Hutchinson, T. Kouzarides, J. A. Martignetti, E. Preddie, S. C. Satchwell, P. Tomlinson, K. M. Weston and B. G. Barrell.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current Topics in Microbiology and immunology* **154**: 125-169.
- Cho, R. J., M. Fromont-Racine, L. Wodicka, B. Feierbach, T. Stearns, P. Legrain, D. J. Lockhart and R. W. Davis.** 1998. Parallel analysis of genetic selections using whole genome oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3752-3757.
- Colberg-Poley, A. M.** 1996. Functional roles of immediate early proteins encoded by the human cytomegalovirus UL36-38, UL115-119, TRS1/IRS1 and US3 loci. *Intervirolgy* **39**: 350-360.
- Cormack, B. P., G. Bertram, M. Egerton, N. A. R. Gow, S. Falkow and A. J. P. Brown.** 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**: 303-311.
- Cormack, R. S., K. Hahlbrock and I. E. Somssich.** 1998. Isolation of putative plant transcriptional coactivators using a modified two-hybrid system incorporating a GFP reporter gene. *Plant J.* **14**: 685-692.
- Cormack, B. P., R. H. Valdivia and S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38.
- Cuconati, A., W. Xiang, F. Lahser, T. Pfister and E. Wimmer.** 1998. A protein linkage map of the P2 nonstructural proteins of Poliovirus. *J. Virol.* **72**: 1297-1307.
- Doniger, J., S. Muralidhar and L. J. Rosenthal.** 1999. Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 367-382.
- Durfee, T., O. Draper, J. Zupan, D. S. Conklin and P. C. Zambryski.** 1999. New tools for protein linkage mapping and general two-hybrid screening. *Yeast* **15**: 1761-1768.
- Enright, A. J., I. Iliopoulos, N. C. Kyrpides and C. A. Ouzounis.** 1999. Protein interaction maps for complete genomes based on gene fusion events. *Nature* **402**: 86-90.
- Estojak, J., R. Brent and E. Golemis.** 1995. Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. *Mol. Cell Biol.* **15**: 5820-5829.
- Evangelista, C., D. Lockshon and S. Fields.** 1996. The yeast two-hybrid system: prospects for protein linkage maps. *Trends in Cell Biology* **6**: 196-199.
- Ewing, B. and P. Green.** 2000. Analysis of expressed sequence tags indicates 35.000 human genes. *Nat. Genet.* **25**: 232-234.
- Fields, S. and O.-K. Song.** 1989. A novel genetic system to detect protein/protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Fields, S.** 1999. The future is function. *Nature Genetics* **15**: 325-327.

- Fields, S. and R. Sternglanz.** 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein-interactions. *Trends in Genet.* **10**:286-292.
- Fischer, J. A., E. Giniger, T. Maniatis, M. Ptashne.** 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* **332**: 853-856.
- Fleckenstein, B., I. Müller and J. Collins.** 1982. Cloning of the complete human cytomegalovirus genome in cosmids. *Gene* **18**: 39-46.
- Gibson, W.** 1996. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* **39**: 389-400.
- Gietz, R.D., R. H. Schiestl, A. Willems and R. A. Woods.** 1995. Studies of the mechanism of high efficiency transformation of intact yeast cell. *Yeast* **11**: 355-360.
- Gramatikoff, K., O. Georgiev and W. Schaffner.** 1994. Direct interaction rescue, a novel filamentous phage technique to study protein-protein interactions. *Nucl. Acid Res.* **22**: 5761-5762.
- Güldener, U., S. Heck, T. Fiedler, J. Beinhauer and J. H. Hegemann.** 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2519-2524.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov and R. Brent.** 1993. Cdi, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**: 791-803.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **Jun 5**, **166**: 557-580.
- Hannon, G. J., D. Demetrick and D. Beach.** 1993. Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins. *Genes Dev.* **7**: 2378-2391.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wie, K. Keyomarsi and S. J. Elledge.** 1993. The p21 Ddk-interacting protein Cip is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**: 805-816.
- Hayashi, M. L., C. Blankenship and T. Shenk.** 2000. Human cytomegalovirus UL69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the G1 phase of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2692-2696.
- Hofmann, H., S. Flöss and T. Stamminger.** 2000. Covalent modification of the transactivator protein IE2-p86 of human cytomegalovirus by conjugation of the Ubiquitin-homologous proteins SUMO-1 and hSMT3b. *J. Virol.* **74**: 2510-2524.
- Huang, C.-F., Y.-C. Wang, D.-A. Tsao, S.-F. Tung, Y.-S. Lin and C.-W. Wu.** 2000. Antagonism between members of the CNC-bZIP family and the immediate-early protein IE2 of human cytomegalovirus. *J. Biol. Chem.* **275**: 12313-12320.
- International Human Genome Sequencing Consortium.** 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.
- Ito, T., K. Tashiro, S. Muta, R. Ozawa, T. Chiba, M. Nishizawa, K. Yamamoto, S. Kuhara and Y. Sakaki.** 2000. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**: 1143-1147.
- Jimenez, A. and J. Davies.** 1980. Expression of transposable antibiotic resistance elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **287**: 869-871.
- Kägi, J. H. R. and Y. Kojima.** 1997. Chemistry and biochemistry of metallothionein. pp 25-61. *In*: Kägi, J. H. R. and Y. Kojima (Eds), *Metallothionein II*. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Kakidani, H. and M. Ptashne.** 1988. GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell* **52**: 161-167.



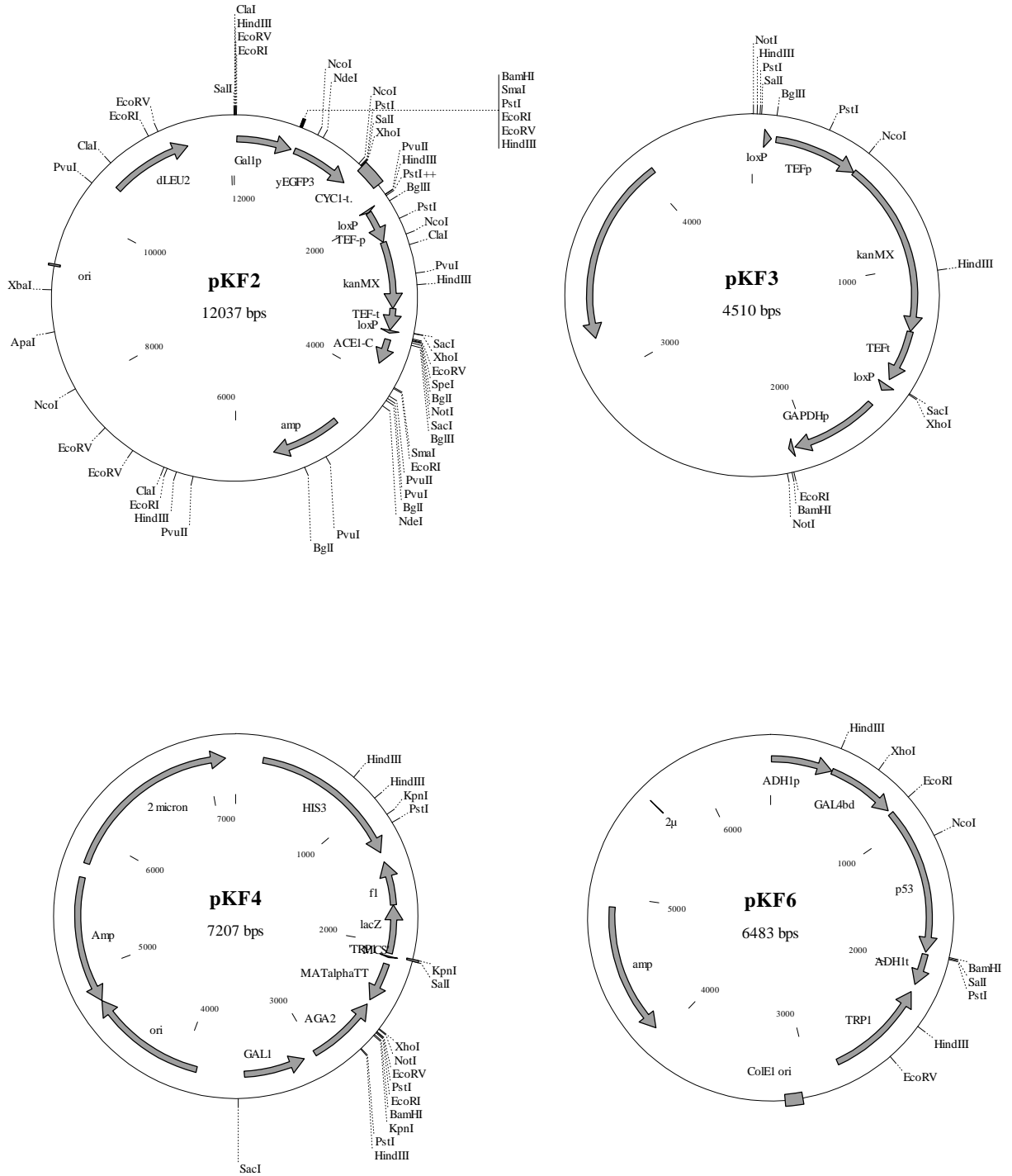
- Keegan, L., G. Gill and M. Ptashne.** 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**: 699-704.
- Klebanow, E. R. and P. A. Weil.** 1999. A rapid technique for the determination of unknown plasmid library insert DNA sequence directly from intact yeast cells. *Yeast* **15**: 527-531.
- Klebe, J. K., J. V. Harris, D. Sharp and M. G. Douglas.** 1983. A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333-341.
- Lamarre, C., N. Deslauriers and Y. Bourbonnais.** 2000. Expression cloning of the *Candida albicans* CSA1 gene encoding a mycelial surface antigen by sorting of *Saccharomyces cerevisiae* transformants with monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Mol. Microbiol.* **35**: 444-453.
- Le Douarin, B., B. Pierrat, E. vom Baur, P. Chambon and R. Losson.** 1995. A new version of the two-hybrid assay for detection of protein-protein interactions. *Nucl. Acid Res.* **23**: 876-878.
- Legrain, P., J. Wojcik and J.-M. Gauthier.** 2001. Protein-Protein interaction maps: a lead towards cellular functions. *Trends in Genetics* **17**: 346-352.
- Li, B. and S. Fields.** 1993. Identification of mutations in p53 that effects its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**: 957-963.
- Lu, C.-F., R. C. Montijn, J. L. Brown, F. Klies, J. Kurjan, Bussey, H. et al.** 1995. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* **128**: 333-340.
- Luo, Y., A. Batalao, H. Zhou and L. Zhu.** 1997. Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *BioTechniques* **22**: 350-352.
- Ma, J., E. Przibilla, J. Hu, L. Bogorad and M. Ptashne.** 1988. Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature* **334**: 631-633.
- Marcotte, E. M., M. Pellegrini, H.-L. Ng, D. W. Rice, T. O. Yeates and D. Eisenberg.** 1999. Detecting protein function and protein-protein-interactions from genome sequences. *Science* **285**: 751-753.
- Marcotte, E. M., M. Pellegrini, M. J. Thompson, T. O. Yeates and D. Eisenberg.** 1999. A combined algorithm for genom-wide prediction of protein function. *Nature* **402**: 83-86.
- Margulies, B. J., H. Brown and W. Gibson.** 1996. Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles. *Virology* **225**: 111-125.
- Mayer, M. and P. Hieter.** 2000. Protein networks-built by association. *Nature Biotechnology* **18**: 1242-1243.
- Mayer, G., H. Launhardt and T. Munder.** 1999. Application of the green fluorescent protein as a reporter for Ace1-based, two-hybrid studies. *BioTechniques* **27**: 86-94.
- McCraith, S., T. Holtzman, B. Moss and S. Fields.** 2000. Genome-wide analysis of vaccinia virus protein-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 4879-4884.
- Mocarski Jr., E. S.** 1994. Cytomegaloviruses. *In: Webster, R. G. and A. Granoff (Eds.), Encyclopedia of virology, Volume 1.* Academic Press London.
- Mocarski Jr., E. S., G. B. Abenes, W. C. Manning, L. C. Sambucetti and J. M. Cherrington.** 1990. Molecular genetic analysis of cytomegalovirus gene regulation in growth, persistence and latency. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **154**: 47-75.
- Munder T. and P. Fürst.** 1992. The *Saccharomyces cerevisiae* CDC25 gene product binds specifically to catalytically inactive Ras protein *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2091-2099.

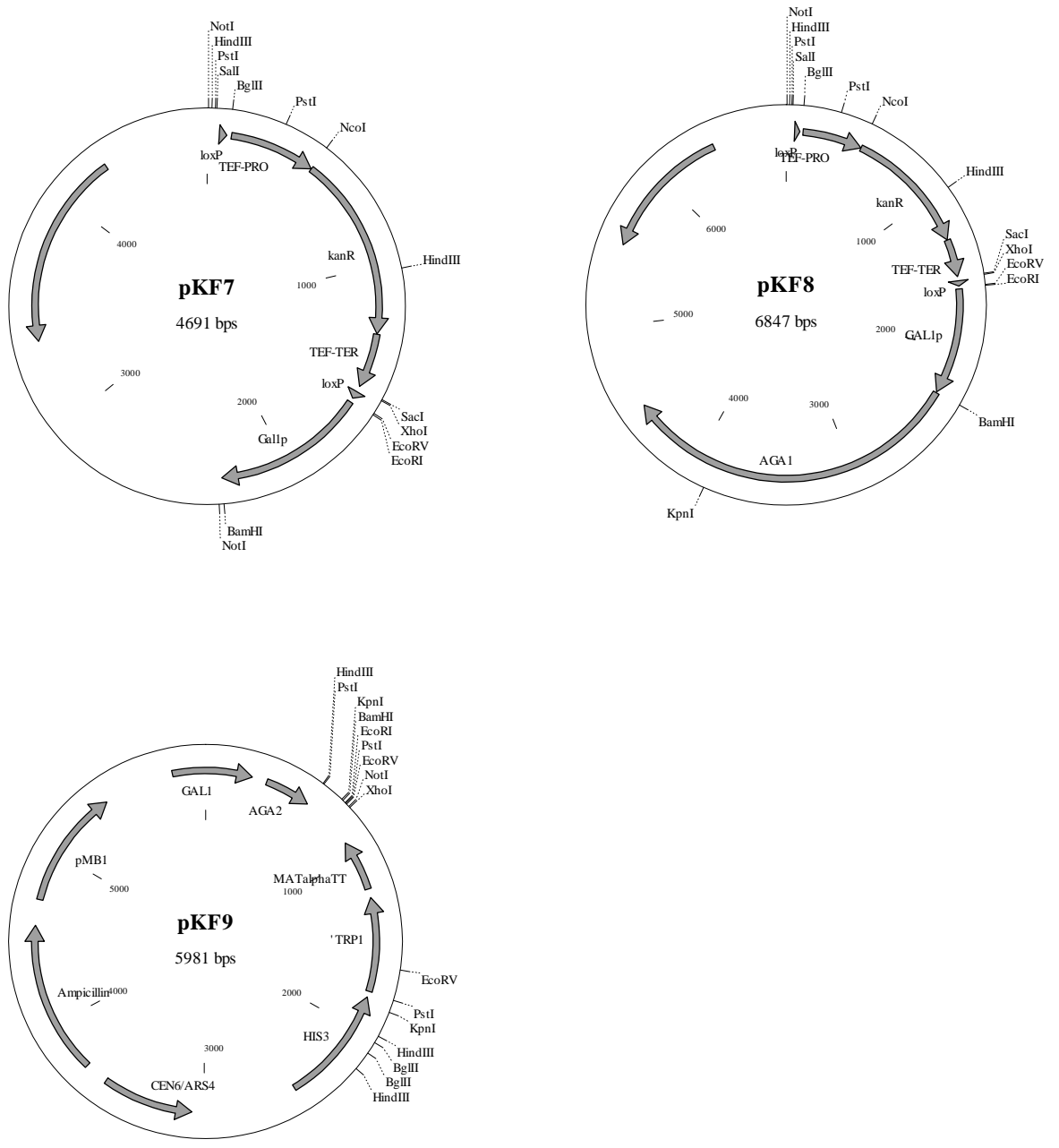
- Munder, T., M. Ninkovic and B. Rudakoff.** 1997. The two-hybrid system in yeast: applications in biotechnology and basic research. pp 31-58. *In: M. R. El-Gewely (Ed.), Biotechnology Annual Review, Volume 3.* Elsevier Science B. V.
- Orlean, P., H. Ammer, M. Watzelle and W. Tanner.** 1986. Synthesis of an O-glycosylated cell surface protein induced in yeast by  $\alpha$  factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 6263-6266.
- Pellegrini, M. E. M. Marcotte, M. J. Thompson, D. Eisenberg and T. O. Yeates.** 1999. Assigning protein function by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 4285-4288.
- Phizicki, E. M. and S. Fields.** 1995. Protein-protein-interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* **59**: 94-123.
- Ptashne, M.** 1988. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* **335**: 683-689.
- Rain, J.-C., L. Selig, H. De Reuse, V. Battaglia, C. Reverdy, S. Simon, G. Lenzen, F. Petel, J. Wojcik, V. Schächter, Y. Chemama, A. Labigne and P. Legrain.** 2001. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**: 211-215.
- Roizmann, B.** 1996. *Herpesviridae*. pp 2221-2230. *In: B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley (Ed.), Virology.* Lippincott-raven, Philadelphia, Pa.
- Roy, A., C. F. Lu, D. L. Marykwas, P. N. Lipke and J. Kurjan.** 1991. The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 4196-4206.
- Ryan, K. M., A. C. Phillips and K. H. Vousden.** 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology* **13**: 332-337.
- Sadowski, I., J. Ma, S. Triezenberg and M. Ptashne.** 1988. GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**: 563-564.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratories. Cold Spring Harbor, NY.
- Sarisky, R. T. and G. S. Hayward.** 1996. Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLyt-dependent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays. *J. Virol.* **70**: 7398-7413.
- Schenk, J. A., S. Heymann, L. E. Peters and B. Micheel.** 1996. Screening for recombinant plasmids in yeast colonies of the Two-Hybrid System using PCR. *BioTechniques* **20**: 812-816.
- Schreier, A. A. and J. Gruber.** 1990. Viral T antigen interactions with cellular proto-oncogene and anti-oncogene products. *J. Natl. Cancer. Inst.* **582**: 354-360.
- Shioda, T., S. Andriole, T. Yahata and K. J. Isselbacher.** 2000. A green fluorescent protein-reporter mammalian two-hybrid system with extrachromosomal maintenance of a prey expression plasmid: application to interaction screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5220-5224.
- Snoeck, R., J. Neyts, et al.** 1993. Strategies for the treatment of cytomegalovirus infections. pp. 269-278. *In: S. Michelson, S. and S. A. Plotkin (Eds.), Multidisciplinary Approach to Understanding Cytomegalovirus Disease.* Elsevier Science, Amsterdam.
- Southern, J. A., D. F. Young, F. Heaney, W. Baumgartner and R. E. Randall.** 1991. Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J. of Gen. Virol.* **72**: 1551-1557.
- Spector, D. J. and M. J. Tevethia.** 1994. Protein-protein interactions between human cytomegalovirus IE2-580aa and pUL84 in lytically infected cells. *J. Virol.* **68**: 7549-7553.

- Speir, E., R. Modali, E.-S. Huang, M. B. Leon, F. Shawl, T. Finkel and S. E. Epstein.** 1994. Potential role of human cytomegalovirus an p53 interaction in coronary restenosis. *Science* **265**: 391-394.
- Stagno, S., R. F. Pass, M. E. Dworsky, R. E. Henderson, E. G. Moore, P. D. Walton and C. A. Alford.** 1982. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. *N. Engl. J. Med.* **306**: 945-959.
- Stenberg, R. M.** 1996. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirolgy*, **39**: 343-349.
- Sullivan, V., K. K. Biron, C. Talarico, S. C. Stanat, M. Davis, L. M. Pozzi, D. M. Coen.** 1993. A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**: 19-25.
- Toda, T., S. Cameron, P. Sass, M. Zoller, J. D. Scott, B. McMullen, M Hurwitz, E. G. Krebs and M. Wigler.** 1987. Cloning and Charakterisation of BCY, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1371-1377.
- Thompson, J., J. Doniger and L. J. Rosenthal.** 1994. A 79 amino acid oncogene is responsible for human cytomegalovirus mtrII induced malignant transformation. *Arch. Virol.* **136**: 161-172.
- Tzamarias, D. and K. Struhl.** 1994. Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature* **369**: 758-761.
- Uetz, P., L. Giot, G. Cagney, T. A. Mansfield, R. S. Judson, J. R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamodar, M. Yang, M. Johnson, S. Fields and J. M. Rothberg.** 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **403**: 623-627.
- Vidal, M. and P. Legrain.** 1999. Yeast forward and reverse ,n'-hybrid systems. *Nucl. Acid Res.* **27**: 919-929.
- Wach, A.** 1996. PCR-Synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**: 259-265.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pöhlmann and P. Philippsen.** 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Walhout, A. J., R. Sordella, X. Lu, J. L. Hartley, G. F. Temple, M. A. Brasch, N. Thierry-Mieg and M. Vidal.** 2000. Protein interaction mapping in *C. elegans* using proteins involved in vulval development. *Science* **287**: 116-122.
- Walhout, A. J. and M. Vidal.** 2001. High throughput yeast Two-Hybrid Assays for large-scale protein interaction mapping. *Methods* **24**: 297-306.
- Ward, W. W., C. W. Cody, R. C. Hart and M. J. Cormier.** 1980. Spectrophotometric identity of the energy-transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green fluorescent proteins. *Photochem. Photobiol.* **31**: 611-615.
- Wertmann, K. F., A. R. Wyman and D. Botstein.** 1986. Host/vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene* **49**: 253-262.
- Winnacker, E. L.** 1990. Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie. 3. Auflage. VHC Verlagsgesellschaft mbH Weinheim.
- Zenke, F. T., R. Engels, V. Vollenbroich, J. Meyer, C. P. Hollenberg and K. D. Breunig.** 1996. Activation of Gal4p by Galaktose-dependent interaction of galactokinase and Gal80p. *Science* **272**: 1662-1665.

**ANHANG**

**Karten ausgewählter, im Rahmen der Arbeit konstruierter Plasmide**





## Sequenzen der multiplen Klonierungsstellen in pGAD424 MCS1-3

### pGAD424-MCS1

GAA TTC | GCG GCC GC|A GAT CT|G GAT CC|A CGC GT|C CAT GG|C CC|G  
*EcoRI*                      *NotI*                      *BglII*                      *BamHI*                      *MluI*                      *NcoI*

GTA CC|G GGC C|GT CGA C|CT GCA G  
*KpnI*                                      *SalI*                                      *PstI*

### pGAD424-MCS2

GAA TTC | A|GC GGC CGC | AGA TCT | GGA TCC | ACG CGT | CCA TGG | CCC  
*EcoRI*                      *NotI*                                      *BglII*                      *BamHI*                                      *MluI*                                      *NcoI*

G|GG | TAC C|GG GCC | GTC GAC | CTG CAG  
*SmaI+KpnI*                                      *SalI*                                      *PstI*

### pGAD424-MCS3

GAA TTC | AA|G CGG CCG C|AG ATC T|GG ATC C|AC GCG T|CC ATG G|CC  
*EcoRI*                                      *NotI*                                      *BglII*                                      *BamHI*                                      *MluI*                                      *NcoI*

CGG G|TA CC|G GCC | GTC GAC | CTG CAG  
*SmaI+KpnI*                                      *SalI*                                      *PstI*

## **DANKSAGUNG**

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01.01.1999 bis 31.12.2001 am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V. in der Abteilung Zell-und Molekularbiologie angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Saluz für die Überlassung des interessanten Themas, seine Unterstützung und seine stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Dr. Thomas Munder für seine uneingeschränkte Unterstützung und Ermutigung. Seine methodischen Anregungen, die vielen wissenschaftlichen Diskussionen mit ihm und das kritische Lesen des Manuskripts haben maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Grit Mrotzek bedanken, die mir bei der Amplifikation der HCMV-DNA-Fragmente und deren anschließender Sequenzierung eine unschätzbare Hilfe war.

Außerdem danke ich Herrn Matthias Nestler, welcher mich stets bei der Bewältigung auftretender Probleme mit dem FACS-Gerät unterstützte.

Steffi Herold, Katja Lehmann, Javeed Iqbal, Zhihao Wu und Gino Limmon danke ich sehr herzlich für ihre Freundschaft und Unterstützung. Außerdem möchte ich mich bei allen nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern der Abteilung Zell-und Molekularbiologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Meinem Freund und meiner Familie danke ich sehr herzlich für ihre Geduld, die uneingeschränkte Unterstützung und die Ermutigung in Zeiten der Frustration.

## **SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Weiterhin versichere ich, daß ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Jena, 5. Dezember 2001

Kristina Fahr



## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name Kristina Fahr  
Geburtsdatum 25. September 1973 in Sömmerda  
Wohnort Johann-Friedrich-Str. 35  
07745 Jena  
Familienstand ledig

### Schul Ausbildung

09/80 - 06/90 Zehnklassige allgemeinbildende Oberschule, Sömmerda  
09/90 - 06/92 Gymnasium Sömmerda  
09/92 - 08/93 Praktikum beim Magistrat der Stadt Erfurt, Garten- und Friedhofsamt

### Studium

09/93 - 08/97 Diplomstudium der Biologie (Spezialisierungsrichtung Mikrobiologie) an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
09/97 - 08/98 Diplomarbeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie  
Thema: „Abbau und Mineralisierung von Chlorphenolen durch Braunfäulepilze der Gattung *Gloeophyllum*“

### Promotion

01/99 – 12/01 Doktorandin am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V., Abt. Zell- und Molekularbiologie in Jena  
Thema: „Entwicklung modifizierter Zweihybrid-Systeme zur effizienten Untersuchung multipler Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung fluoreszenzaktivierter Zellsortierung am Beispiel des Humanen Cytomegalovirus“