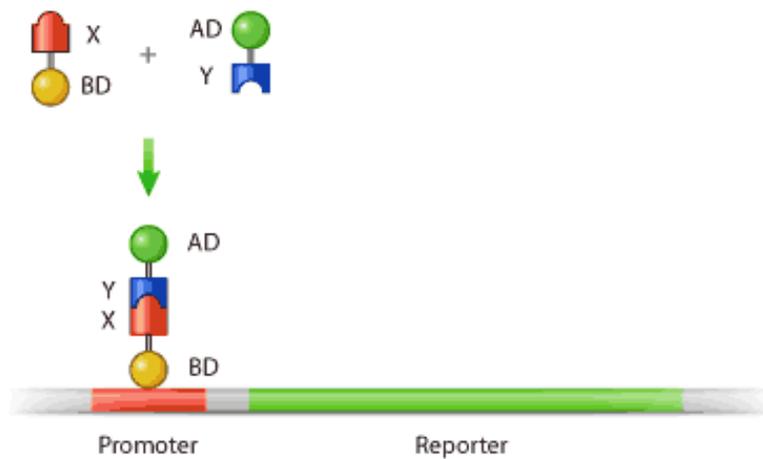


Detektion von Protein/Protein-Interaktionen mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid Systems*



1. Prinzip des *Yeast Two-Hybrid* Systems

Das *Yeast Two-Hybrid* System ist eine relativ einfach zu handhabende Methode für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in Hefen [Fields & Song (1989)].

Eine wesentliche Voraussetzung für dieses System ist, dass Transkriptionsfaktoren (TF) aus zwei getrennten Domänen bestehen: der DNA-Bindungsdomäne (BD) und der Aktivierungsdomäne (AD). Werden diese beiden Domänen voneinander getrennt, kann nur bei enger räumlicher Assoziation ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor resultieren [Hope *et al.* (1986), Keegan *et al.* (1986)]. Hierbei erkennt der TF definierte UAS (*upstream activating sequences*) und bindet an den Promotor, so dass die Transkription der nachgeschalteten Gene initiiert werden kann (Abb. 1).



Abb. 1: Hefe-Transkriptionsfaktor und seine Bindung an den Promotor

Bei dem in diesem Versuch verwendeten MATCHMAKER GAL4 *Yeast Two-Hybrid* System der Firma CLONTECH handelt es sich um den Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4.

Zur Untersuchung von Protein/Protein-Interaktionen mittels *Yeast Two-Hybrid* System werden zwei Plasmide (Vektoren der Firma CLONTECH, Abb. 2) verwendet: das Plasmid pGAD GH codiert für das Fusionsprotein aus dem zu untersuchendem Protein A und der AD von GAL4, das Plasmid pGBT9 codiert für das Fusionsprotein aus Protein B (potentieller Interaktionspartner von A) und der BD von GAL4.

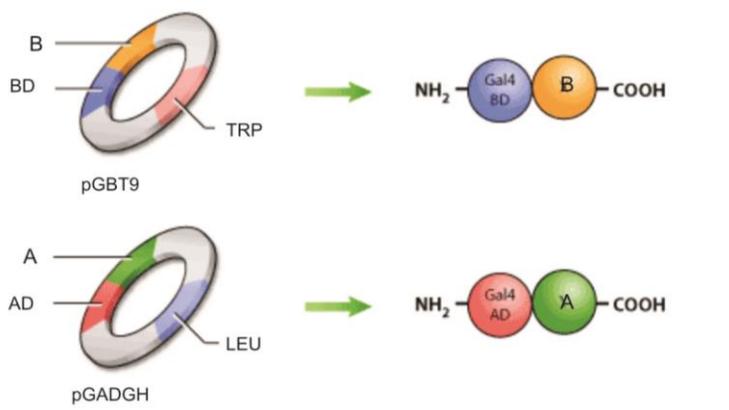


Abb. 2: Vektoren (MATCHMAKER GAL4 *Yeast Two-Hybrid* System der Firma CLONTECH)

Die jeweiligen Plasmide werden in Hefezellen transformiert (siehe Durchführung).

Der verwendete Hefestamm YRG2 ist eine Mangelmutante, die auxotroph für Leucin, Tryptophan und Histidin ist. Um zu gewährleisten, dass ein Hefeklon tatsächlich beide Plasmide aufgenommen hat, besitzen die Vektoren Selektionsmarker (in diesem Fall sind dies Gene, welche für die Synthese von Leucin bzw. Tryptophan essentiell sind; LEU bzw. TRP). Wenn die Hefen auf Medium ohne Tryptophan und Leucin kultiviert werden, können somit nur doppelt transformierte Hefeklone überleben (Abb. 3).

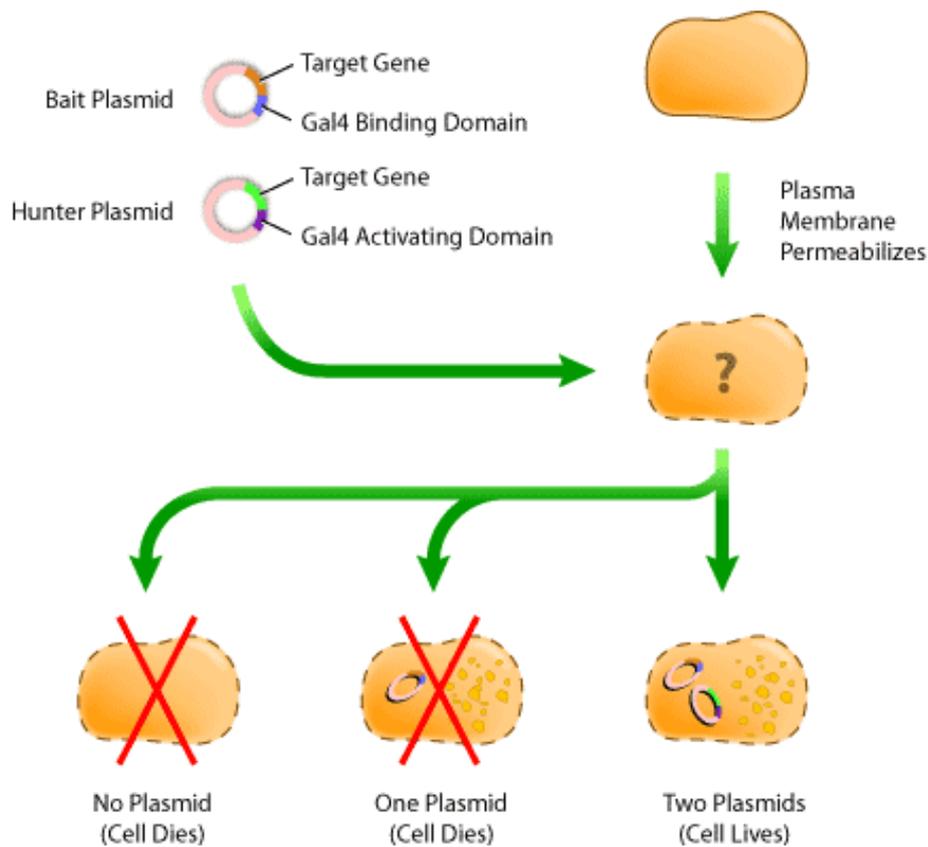


Abb. 3: Hefe-Transformation (schematisch)

Das Genom der hier verwendeten Hefe enthält zwei Gene, die hinter jeweils einen GAL4-abhängigen Promotor geschaltet sind: das lacZ-Gen, welches für die β -Galactosidase codiert, und das HIS3-Gen, welches für die Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase codiert. Interagieren die beiden Fusionsproteine miteinander, so entsteht ein rekonstituierter GAL4-TF und entsprechende Reportergene (β -Galactosidase und Imidazolglycerinphosphat-Dehydratase) werden transkribiert (Abb. 4). Die Reporter-Gen-Aktivität kann zum einen

durch Kontrolle des Wachstums bei Kultivierung ohne Histidin im Medium (HIS3-Gen) oder durch einen Test auf β -Galactosidase-Aktivität (X-gal Assay) geprüft werden.

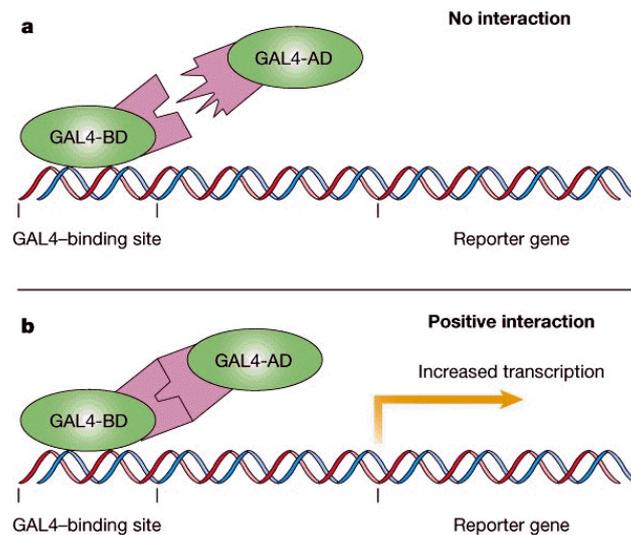


Abb. 4: Prinzip des *Yeast Two-Hybrid* Systems

In diesem Versuch soll die Interaktionsregion der PTP-BL und ihres Interaktionspartners SNX9 (*sorting nexin 9*) näher untersucht werden.

Das Protein PTP-BL (murines Homolog; weitere Synonyme, die für das humane Homolog des Proteins verwendet werden, sind: PTPN13, PTPL1, hPTP1e, PTP-Bas, FAP-1) ist eine Proteintyrosinphosphatase. Sie besteht aus einer N-terminalen KIND (*Kinase non catalytic C-lobe*)-Domäne, einer FERM (*Four-point-one/Ezrin/Radixin/Moesin*)-Domäne, fünf PDZ (PSD95/Dlg1/ZO-1)-Domänen und einer C-terminalen Tyrosinphosphatase-Domäne [Erdmann *et al.* (2000, 2003, 2007)]. Die modulare Struktur der PTP-BL (Abb. 5) lässt darauf schließen, dass es sich um ein *scaffolding protein* handelt.

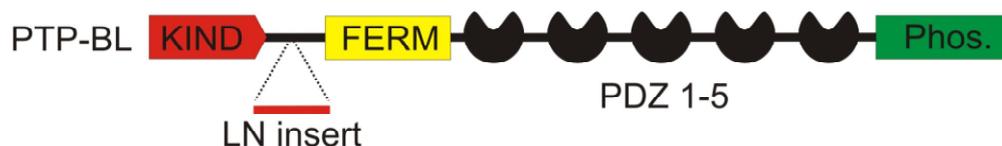


Abb. 5: PTP-BL (schematisch)

Es existieren zwei Spleißvarianten der PTP-BL: die Variante LN (*Long-N-Terminus*) ist um 182 Aminosäuren länger als die SN-Variante (*Short-N-Terminus*), wobei diese 182 Aminosäuren große Region als LN *insert* bezeichnet wird [Herrmann *et al.* (2003)].

Mit Hilfe des *Yeast Two-Hybrid Systems* und *pulldown* Experimenten wurde das Protein *sorting nexin 9* (SNX9; Abb. 6) als neuer, spezifischer Interaktionspartner der PTP-BL identifiziert [Fetzer *et al.* (unveröffentlicht)].



Abb. 6: SNX9 (schematisch)

Es ist bekannt, dass der lange N-Terminus der PTP-BL (LN) die Interaktion mit C-terminalen Teil des SNX9 vermittelt; der kurze N-Terminus der PTP-BL (SN) dagegen interagiert nicht mit SNX9.

2. Durchführung

S1-Arbeiten!

Um unerwünschte Kontaminationen auf Platten oder in Medien zu verhindern, müssen einige allgemeine Hinweise beachtet werden:

- Arbeitsplatz mit dem Desinfektionsmittel für Flächendesinfektion gemäß den Vorgaben im ausgehängten Hygieneplan desinfizieren!
- Öffnen Sie Gefäße und Platten nur in der Nähe der Bunsenbrennerflamme!
- S1-Abfälle gehören in den entsprechend gekennzeichneten S1-Abfall bzw. in die dafür vorgesehenen Tischabfallbehälter! Anderer Müll (z.B. Plastiktüten, Papiertücher etc), der nicht mit gentechnisch veränderten Organismen in Berührung gekommen ist, kann in den „normalen“ Müll entsorgt werden!

1.1. Ansetzen der Lösungen für das *Yeast Two-Hybrid System*

Alle Lösungen werden in 15 ml Reaktionsgefäßen angesetzt!

- 5 ml 1x LiAc/1x TE (0,5 ml 10x LiAc + 0,5 ml 10x TE + 4 ml aqua dest.)
- 5 ml 1x LiAc / 1x TE / PEG (0,5 ml 10x LiAc + 0,5 ml 10x TE + 4 ml 50% PEG)
- 5 ml 1x TE (0,5 ml 10x TE + 4,5 ml aqua dest.)
- Z-Puffer/Xgal-Lösung: 70 µl Xgal-Stammlösung in 5 ml Z-Puffer

carrier-DNA: 2mg/ml Kalbsthymus-DNA in H₂O

→ Denaturierung: 10 min auf 95°C erhitzen, dann sofort auf Eis abkühlen, um einzelsträngige DNA zu erhalten

1.2. Ansetzen einer Übernachtskultur für die Hefetransformation

Eine Kolonie des Hefestamms YRG2 wird von einer YPD-Agarplatte in 10 ml YPD-Medium überführt (50 ml Reaktionsgefäß) und über Nacht bei 30°C und 220 rpm geschüttelt.

1.3. Verdünnung der Übernachtskultur

Die Übernachtskultur wird 1:10 in YPD-Medium verdünnt (Gesamtvolumen 100 ml). Der Ansatz wird in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben 4 Stunden bei 200 rpm und 30°C geschüttelt.

1.4. Hefe-Transformationen

Es werden fünf Transformationen durchgeführt:

1. SN (PTP-BL) pGADGH + SNX9 (C-Terminus) pGBT9
2. LN (PTP-BL) pGADGH + SNX9 (C-Terminus) pGBT9
3. DEL1 (PTP-BL) pGADGH + SNX9 (C-Terminus) pGBT9
4. DEL2 (PTP-BL) pGADGH + SNX9 (C-Terminus) pGBT9
5. Insert (PTP-BL) pGADGH + SNX9 (C-Terminus) pGBT9

Die verwendeten Deletionskonstrukte der PTP-BL (N-Terminus) sind in Abb. 7 schematisch dargestellt:

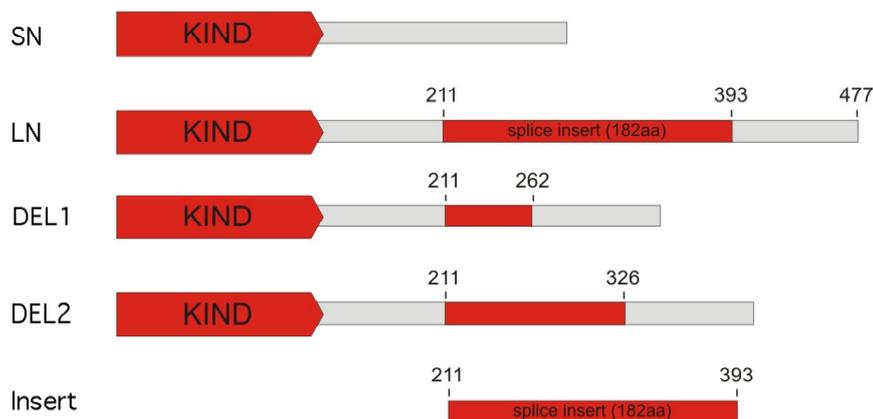


Abb. 7: schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte

Pro Transformationsansatz werden 1,5 µg je Plasmid (1,5 µg SNX9-pGBT9 und 1,5 µg Deletionskonstrukt in pGAD GH) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und mit 10 µl denaturierter carrier-DNA vermischt (5 Transformationsansätze = 5 Eppendorfgefäße!).

Die Hefezellen (Übernachtskultur) werden auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei RT und 3000xg 4 Minuten zentrifugiert. (Es wird pro Kleingruppe mit jeweils einem 50 ml Reaktionsgefäß weitergearbeitet.) Das Sediment wird vorsichtig in 20 ml H₂O resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Hefezellen werden in 0,5 ml 1x LiAc/1xTE aufgenommen und 10 Minuten bei RT inkubiert (kompetente

Hefezellen). Im Anschluss an die Inkubationszeit werden je 100 µl der kompetenten Hefezellen zu den Transformationsansätzen gegeben. Danach werden 600 µl 1x LiAc/1x TE/PEG zu den Ansätzen pipettiert und kurz durchmischt. Es folgt eine Inkubation für 30 Minuten bei 30°C auf dem Schüttler, währenddessen die Ansätze jede 7 Minuten invertiert werden. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben mit 70 µl DMSO versetzt, erneut durchmischt und für 7 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach Inkubation von 3 Minuten auf Eis wird unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die sedimentierten Hefen werden in 200 µl 1x TE aufgenommen und anschließend wird die Suspension auf -Trp/-Leu- Platten ausplattiert (simultane Transformation von Hefen mit zwei Plasmiden). Um ein Austrocknen der Platten zu vermeiden, werden die Platten mit Parafilm abgedichtet und anschließend in den Brutschrank gestellt (Deckel nach unten). Die Inkubation erfolgt für 2 Tage bei 30°C.

1.5. Protein-Interaktionstests der transformierten Hefen

Nachdem die Hefen simultan mit einem pGBT9-Plasmid und einem pGAD GH-Plasmid transformiert worden sind, werden die entsprechenden Fusionsproteine auf zwei verschiedene Weisen auf Interaktion getestet:

a. Histidin-Assay

In 15 1,5ml Eppendorfgefäß werden je 100 µl 1x PBS vorgelegt. Von den fünf Transformationsplatten werden jeweils drei Kolonien abgenommen und im jeweils vorgelegten 1x PBS resuspendiert (1 Kolonie pro Eppendorfgefäß). Nach folgendem Schema (Abb. 8) werden je 5 µl der 15 Suspensionen auf eine -Leu/-Trp- Platte, eine -Leu/-Trp/-His- Platte sowie eine -Leu/-Trp/-His/+3-Aminotriazol- Platte punktförmig aufgetragen.

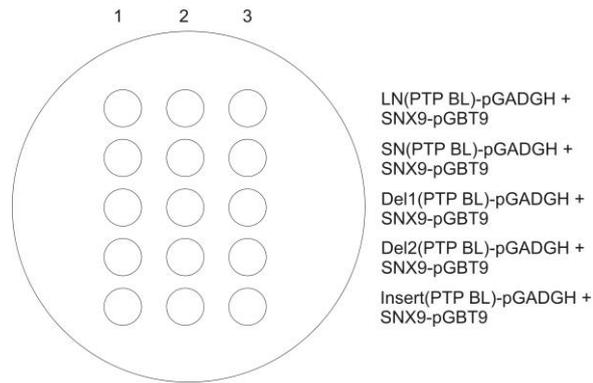


Abb. 8: Auftragungsschema zum Histidin-Assay

Die Platten werden mit Parafilm abgedichtet, bei 30°C inkubiert (Deckel nach unten) und nach 2 Tagen auf Wachstum der Klone kontrolliert.

b. β -Galactosidase-Lift-Assay

Für diesen Test wird die -Leu/-Trp- Platte (aus 1.5.a.) verwendet.

Zunächst wird ein Whatman3M Papier in einer Petrischale (entsprechend der Größe der Hefe-Platte) mit 5 ml einer Z-Puffer/X-gal-Lösung getränkt. Um die Hefezellen aufzuschließen, wird für 1 min eine Nitrocellulose-Membran (Ausrichtung markieren!) auf die Hefe-Platte gelegt, anschließend mit den daran haftenden Kolonien mit einer Pinzette vorsichtig abgelöst und mit der Kolonien-Seite nach oben für 30 sec in flüssigen Stickstoff getaucht. Dann wird die Membran kurz bei Raumtemperatur aufgetaut (auf der Handinnenfläche) und danach mit der Kolonien-Seite nach oben (!!) auf das Z-Puffer/X-gal-getränkte Whatman3M Papier gelegt. Abschließend wird die Petrischale mit Parafilm verschlossen und je nach gewünschter Blaufärbung 20 Minuten bis 4 Stunden bei 30°C inkubiert.

3. Anmerkungen zum Protokoll (Einzelprotokoll)

a. äußere Form des Protokolls:

- **Format:** Arial oder Times New Roman (Schriftgröße 11 bzw. 12), 1,5-facher Zeilenabstand, Blocksatz, Seitenzahlen
- **Deckblatt:** Name, Gruppennummer, Titel des Versuchs, Versuchstag, Datum der 1. bzw. 2. Abgabe, E-Mail Adresse
- **Einleitung** mit theoretischem Hintergrund des *Yeast Two-Hybrid* Systems
- **Durchführung** – nur falls Abweichungen zum Skript bestehen!
- **Ergebnisse:** Auswertung der Transformationen, Abbildungen der drei Platten vom Histidin Assay und des β -Galaktosidase Assay mit eindeutiger Beschriftung innerhalb der Abbildung; Abbildungsunterschriften sowie Erläuterungen der Abbildungen im Text nicht vergessen!
- In der **Diskussion** sollten die Ergebnisse hinsichtlich der Erwartungen analysiert werden (zusammenhängender Text) !!!

b. Folgende Fragen sollten im Protokoll bearbeitet werden:

- Welche Vor- und Nachteile hat das *Yeast Two-Hybrid* System zur Ermittlung von Interaktionen zwischen Proteinen?
- Erläutern Sie das Prinzip und den Ablauf eines *Yeast Two-Hybrid Screens*!
- Erklären Sie die Ursache der rötlichen Färbung des verwendeten Hefestammes!
- Was ist die molekulare Wirkung des 3-Aminotriazols?
- Beschreiben Sie mindestens zwei weitere Methoden zur Ermittlung und/oder Verifizierung von Protein/Protein-Interaktionen.

Die Protokolle müssen bis spätestens eine Woche nach Versuchsende (bei Korrekturen eine Woche nach Rückgabe) bei den Betreuern abgegeben werden. Der Korrektur sollte immer auch die erste Version beigelegt werden.

ANHANG

Hefestamm (*Yeast Two-Hybrid System*) **YRG2** (Clontech)

Genotyp: MATa, ura3-52, his3-200, ade2-10, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2
LYS2: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3
URA3: GAL4_{17-mers(3x)}-CYC1_{TATA}-lacZ
System: GAL4-2H Reporter: HIS3, lacZ
Transformationsmarker: trp1, leu2, cyh^r2

Vektoren

pGAD GH, 7,9kb (Clontech)

Merkmale für die Expression in Hefen: ADH1-Promotor, GAL4 AD-Gen, LEU2-Gen

pGBT9, 5,5kb (Clontech)

Merkmale für die Expression in Hefen: ADH1-Promotor, GAL4 BD-Gen, TRP1-Gen

Lösungen und Medien (bereitgestellt)

1x PBS

50 %: PEG: 50 % (w/v) PEG 3500 in H₂O (sterilfiltriert)

10x LiAc: 1 M Lithiumacetatlösung in H₂O, pH 7,5 (sterilfiltriert)

10x TE: 10 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, in H₂O, pH 7,5

YPD-Medium/-Agar: 20 g Select Pepton (*Gibco*), 10 g Hefeextrakt (*Gibco*) sowie 20 g Bactoagar (nur für Agar-Platten) auf 950 ml mit VE-Wasser auffüllen, autoklavieren, auf 50°C temperieren; anschließend 50 ml 40% Glucose-Lösung (in H₂O) hinzufügen

-Trp/-Leu- und -Trp/-Leu/-His –Medium bzw. -Platten: Fertigmedien (Clontech)

Z-Puffer:

16,1 g/l Na₂HPO₄*7H₂O

5,5 g/l NaH₂PO₄*H₂O

0,75 g/l KCl

0,246 g/l MgSO₄*7H₂O

in H₂O, pH 7,0, autoklavieren

X-gal-Stammlösung: 40 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid in DMSO

Literatur

Erdmann, K.S., Kuhlmann, J., Lessmann, V., Herrmann, L., Eulenburg, V., Muller, O., Heumann, R. (2000) The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain, *Oncogene* 34(19): 3894-901

Erdmann KS. (2003) The protein tyrosine phosphatase PTP-Basophil/Basophil-like. Interacting proteins and molecular functions, *Eur J Biochem.* 2003 270(24): 4789-98

Fields, S. & Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature* 340: 245

Herrmann, L., Dittmar, T., Erdmann, K.S. (2003) The Protein Tyrosine Phosphatase PTP-BL Associates with the Midbody and Is Involved in the Regulation of Cytokinesis, *Mol Biol Cell.* 14(1): 230–240

Hope I.A., Struhl K. (1986) Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast, *Cell* **46**: 885-894.

Keegan L., Gill G., Ptashne M. (1986) Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein, *Science* **231**: 699-704.

Yeast Protocols Handbook (PT3024-1)

<http://www.clontech.com/clontech/techinfo/manuals/PDF/PT3024-1.pdf>