

Ausgeführt durch: Alexandra Wegmann, Carmen Hitz, Natalia Aeple, Dominik Schiessel, Laurenz Reiser

EXPERIMENT 26 : UNTERSUCHUNG DER PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTION IN HEFE MIT DEM 2-HYBRID-SYSTEM

Einleitung: Theoretische Erklärung

Das 2-Hybrid-System ist eine genetische Methode um Interaktionen zwischen Proteinen in vivo in der für uns Menschen wichtigen Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aufzudecken. Dieses System nutzt die Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren aus zwei Domänen aufgebaut sind: einer DNA-bindenden (DBD) und einer DNA-aktivierenden Domäne (AD). Durch an den Domänen angehängte Proteine, welche miteinander agieren, treten die Domänen in Kontakt – zusammen wirken sie als Transkriptionsfaktor für gewisse Zielgene. Diese wären beim Vorhandensein von nur einer Domäne (und eines der beiden Proteine) nicht exprimiert worden. Die Proteine interagieren nach einem Köder und Ziel Prinzip. In unserem Versuch arbeiteten wir mit zwei Plasmiden mit je einer Domäne plus seinem Protein. Nach einer erfolgreichen Transformation, nach der sich schlussendlich beide Plasmide in einer Zelle befinden, wird das Zielgen aktiviert. Um diesen Vorgang ersichtlich zu machen, werden sogenannte Reportergene eingesetzt. In unserem Fall das lacZ-Gen, welches für die Beta-Galactosidase kodiert. Dieses Enzym kann das Substrat Gal X in den blauen Indigofarbstoff umwandeln. Die Farbintensität lässt auf die Genaktivität schliessen.

Teil 1: Zeitabhängige Effizienz der Transformation

Durchführung:

Unsere kompetenten Hefezellen enthalten das Köderprotein LRX und die DNA-bindende Domäne (DBD) und werden mit Plasmiden versetzt, die das Zielprotein RALF und die Aktivierungsdomäne (AD) enthalten. Zusätzlich werden weitere Substanzen zugegeben, um die Membranen poröser zu machen und so die Transformation zu erleichtern. Die Zellen werden nun unterschiedlich lange (10, 20 und 30 Minuten) unter Hitzeschock (42 Grad) inkubiert. Anschliessend werden sie je unverdünnt und 1:10 verdünnt ausplattiert und für 3 bis 4 Tagen inkubiert. Die Selektion der transformierten Hefekulturen erfolgt durch das Fehlen von bestimmten Komponenten (Aminosäuren) im Nährmedium, welche nur von den erfolgreich transformierten Hefezellen selber hergestellt werden können.

Auswertung und Diskussion:

Gewachsene Hefekolonien nach Transformation mit unterschiedlicher Hitzeschock Dauer:

	10 min.	20 min.	30 min.
Unverdünnt	190	2120	4000
Verdünnt	400	1500	4200
<i>Durchschnitt</i>	<i>300</i>	<i>1800</i>	<i>4000</i>

Unser Versuch ist nicht gut gelungen. Wir haben wenig Hefekolonien, dafür aber einen orangenen Schimmelpilz erhalten. Wir haben andere Platten ausgezählt und diese Werte übernommen. Es gibt mehrere Faktoren, welche man beim Versuch der Transformationseffizienz-Steigerung variieren kann, z.B. die zugegebenen Substanzen zur besseren Aufnahme von Plasmiden, oder Hitzeschock Temperatur. Wir haben experimentell bestimmt, dass die Transformationseffizienz sich mit zunehmender Inkubationsdauer verbessert.

Teil 2: Nachweis der Interaktion

Ziel:

Nachweis der Interaktion mittels Selektivagar und anschließendem Test auf β -Galaktosidase

Methode:

Wir führen 2 Plasmide in unsere Hefekultur ein: eines trägt eine DNA binding domain (DBD) gekoppelt an ein prey-Protein. Das andere trägt eine activation domain (AD) gekoppelt an ein bait-Protein. Wenn sich nun beide Plasmide in einer intakten Zelle befinden und die Proteine interagieren, aktiviert die AD die DBD und diese wiederum eine Sequenz auf der genomischen DNA der Hefezelle. Mit Hilfe der Produkte, für welche diese DNA-Sequenz codiert, können wir arbeiten.

Vorgehen:

Wir bereiten 3 Stämme vor:

- 1) Hefestamm mit LRX-Protein auf dem bait-Plasmid + prey-Plasmid mit RALF-Protein
 - 2) Hefestamm mit LRX-Protein auf dem bait-Plasmid + prey-Plasmid ohne Protein
 - 3) Hefestamm mit RALF-Protein auf dem prey-Plasmid + bait-Plasmid ohne Protein
- Die Platten werden auf Agar ohne TRP und LEU inkubiert.

Zur Vorbereitung des β -Galaktosidase Nachweises werden unsere 3 Stämme auf einem Agar ohne TRP, LEU kultiviert.

Einige darauf gewachsenen Stämme werden auf eine Platte ohne TRP, LEU und HIS aber mit einer X-gal Lösung weitergezüchtet.

Ergebnisse:

Nur der Stamm, der beide Proteine in sich trägt, überlebt die Kultivierung auf der Platte ohne TRP, LEU und HIS.

Dieser Stamm zeigt auf der X-gal Platte eine intensive blaue Färbung.

Schlussfolgerungen:

Offenbar interagiert das LRX-Protein mit dem RALF-Protein. Folglich wird die DNA binding domain aktiviert und somit die zugehörige Region auf der genomischen DNA transkribiert. Dabei entsteht HIS, was das exklusive Überleben dieses Stammes auf der Platte erklärt und β -Galaktosidase, die das farblos x-gal ins tiefblaue 5-Brom-4-Chlor-indigo umwandelt.