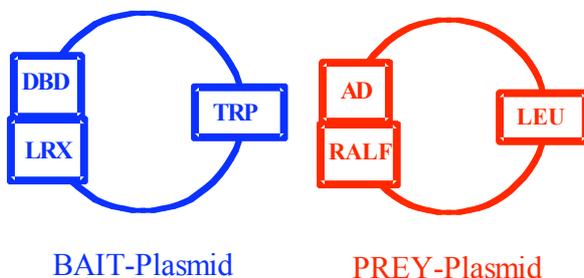

Verfasserinnen: Claudia Bühlmann
Simone Diemand
Sarah Steiner
Susanne Auf der Maur

Betreuerin: Ruth Leiber

Einleitung:

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sollen Interaktionen zwischen zwei Proteinen nachgewiesen werden. Dazu verwenden wir das Yeast-2-Hybrid-System. Es basiert auf der Tatsache, dass Transkriptionsfaktoren aus zwei Domänen bestehen, der Aktivierungsdomäne (AD) und der DNA-Bindungsdomäne (DBD). Diese zwei Domänen müssen mit einander in Kontakt sein, damit der Transkriptionsfaktor funktionsfähig ist und das entsprechende Gen transkribiert wird. Konkret soll nachgewiesen werden, dass das LRX-Protein mit dem RALF-Protein interagiert. Zu diesem Zweck wurde das LRX-Protein an die DBD-Domäne gekoppelt, während das RALF-Protein mit der AD-Domäne verbunden ist. Die codierenden Gene für das LRX-Protein, die DBD-Domäne und den Faktor TRP, der in der Tryptophan-Synthese wichtig ist und es einem Hefeorganismus erlaubt, auf einem Medium ohne TRP zu wachsen, wurden auf ein so genanntes bait-Plasmid gebracht. Die Gene für RALF, AD und ein LEU-Faktor (analog TRP) befinden sich auf einem prey-Plasmid. Wenn RALF und LRX interagieren, bringen sie dadurch AD und DBD zusammen, wobei ein intakter Transkriptionsfaktor entsteht und die Reporter-Gene (HIS und β -Galactosidase) exprimiert werden.



Vorgehen:

- Transformations-Effizienz

Durch Hitzeschock werden die Wände der Hefen durchlässig und können so das einzuführende Plasmid überhaupt erst aufnehmen. Es wird getestet, wie sich die unterschiedliche Dauer des Hitzeschocks auf die Transformations-Effizienz auswirkt. In 3 Eppendorf-Röhrchen werden Zellen mit bait-Plasmiden pipettiert. Dazu gibt man die prey-Plasmide sowie Lithium-Acetat (1 M) und Polyethylenglycol (50%) sowie DNA-Carrier (2 mg/ml). Man setzt je ein Röhrchen 10, 20 und 30 Minuten einem Hitzeschock von 42° C aus. Nach dem Entfernen der Transformationslösung und Wiederaufnahme der Zellen in Wasser, werden je ein Mikroliter der Zellsuspensionen in unverdünntem Zustand und im Verhältnis 1:10 verdünnt (Doppelbestimmung) ausplattiert auf einem Medium, dem TRP und LEU fehlt. Die Platten werden bei 30° C 3-4 Tage inkubiert.

- Protein-Protein-Interaktion

Um zu testen, ob LRX mit RALF interagiert, werden folgende Hefen und Plasmide zusammengeführt und inkubiert (siehe oben, „Transformations-Effizienz“):

Nr	Hefestamm	Plasmid	Produzierte Proteine
1	LRX / DBD	RALF / AD	- LRX / DBD - RALF / AD
2	LRX / DBD	Leeres prey (nur AD, ohne RALF)	- LRX / DBD - AD
3	RALF / AD	Leeres bait (nur DBD, ohne LRX)	- DBD - RALF / AD

Die transformierten Hefen werden auf einem Medium ausplattiert dem TRP und LEU fehlen. Anschließend werden transformierte Zellen auf Platten ausgestrichen denen zusätzlich HIS fehlt. Zugefügt wird die Lösung für den Galactosidase-Test, sowie X-Gal und β -Mercaptoethanol. Das Ganze wird bei 30°C über Nacht inkubiert.

Ergebnisse:

- Transformations-Effizienz

	10 min. Hitzeschock	20 min. Hitzeschock	30 min. Hitzeschock
Verdünnt	400 Kolonien/ml	1600 Kolonien/ml	4000 Kolonien/ml
Unverdünnt	200 Kolonien/ml	1800 Kolonien/ml	3200 Kolonien/ml
Durchschnitt der Doppelbestimmung	300 Kolonien/ml	1700 Kolonien/ml	3600 Kolonien/ml
Transformationeffizienz	$3 * 10^2$	$1,7 * 10^3$	$3,6 * 10^3$

- Protein-Protein-Interaktion

Nur Nummer 1 ist auf dem HIS-freien Medium gewachsen und zeigt die charakteristische Blaufärbung des β -Galactosidase-Tests.

Diskussion

- Transformations-Effizienz:

Wachsen und sich vermehren konnten nur Hefen, die beide Plasmide integriert hatten (TRP und LEU). Unsere Platten enthalten also ausschliesslich transformierte Hefen.

Je länger der Hitzeschock dauert, desto grösser wird die Transformationseffizienz. Um festzustellen, wo diese am grössten ist, hätte man wohl noch länger erhitzen müssen.

- Protein-Protein-Interaktion

Offensichtlich interagieren die Proteine LRX und RALF wie vorausgesagt. Die Test-Nummern 2 und 3 zeigen, dass es diesen Hefen nicht möglich war, die Reportergene zu exprimieren. Die Interaktion muss also wirklich zwischen LRX und RALF stattfinden.

Das Experiment scheint sehr sensibel zu sein. Wir mussten für die Analyse am zweiten Kurstag zum Teil auf „Ersatz“-Platten zurückgreifen, da unsere eigenen Platten vom ersten Kurstag keinerlei Wachstum zeigten.