

**Etablierung von Methoden zur Studie von molekularen
Wechselwirkungen in *S. cerevisiae* basierend auf dem
erweiterten genetischen Code**

**Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik
der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung**

**Vorgelegt von
Michael Berg
geboren in Duschanbe/Tadschikistan**

Hauptberichter:	PD Dr. S. Rupp
Mitberichter:	PD Dr. H. Rudolph
Tag der mündlichen Prüfung:	29. 07. 2013

**Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie
der Universität Stuttgart**

2013

Meinen Eltern
Olga und Viktor Berg

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	- 3 -
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 7 -
ZUSAMMENFASSUNG	- 10 -
SUMMARY	- 12 -
EINLEITUNG	- 14 -
1. Molekulare Wechselwirkungen.....	- 14 -
1.1 Protein-Protein-Wechselwirkungen.....	- 14 -
1.2 Protein-DNA-Wechselwirkungen.....	- 16 -
1.2.1 Transkription und die Rolle der Transkriptionsfaktoren	- 16 -
1.2.2 Methoden zur Bestimmung von Protein-DNA-Wechselwirkungen	- 17 -
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 19 -
3. Der erweiterte genetische Code	- 21 -
3.1 Der genetische Code (Grundlagen)	- 21 -
3.2 Methoden zum Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine.....	- 22 -
3.3 Der erweiterte genetische Code in <i>S. cerevisiae</i>	- 25 -
3.4 Nicht-kanonische Aminosäuren und ihre Anwendung.....	- 27 -
4. Die in dieser Studie verwendeten Modellproteine Aha1 und Gal4	- 30 -
4.1 Das Co-Chaperon Aha1	- 30 -
4.2 Der Transkriptionsfaktor Gal4.....	- 34 -
5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	- 36 -
MATERIAL UND METHODEN	- 37 -
1. Material	- 37 -
1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	- 37 -
1.2 Antibiotika und Antimykotika	- 37 -
1.3 Reaktions-Kitsysteme	- 38 -
1.4 Pufferlösungen	- 38 -
1.5 Kulturmedien.....	- 39 -
1.6 Antikörper und Streptavidin.....	- 40 -

INHALTSVERZEICHNIS

1.7	Enzyme.....	- 40 -
1.8	Plasmide.....	- 41 -
1.9	Oligonukleotide und Epitopsequenzen	- 43 -
1.10	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	- 45 -
1.11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	- 45 -
2.	Methoden.....	- 48 -
2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> und Anlegen von Dauerkulturen	- 48 -
2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	- 48 -
2.3	Methoden für die Analyse von DNA.....	- 49 -
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	- 49 -
2.3.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	- 49 -
2.3.3	Präparation genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	- 50 -
2.3.4	Transfektion von <i>S. cerevisiae</i>	- 51 -
2.3.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	- 52 -
2.3.6	Klonierung.....	- 54 -
2.3.7	PCR-basierte, positionsspezifische Mutagenese von Plasmiden nach dem <i>QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis</i> Protokoll	- 55 -
2.3.8	PCR-basierte, positionsspezifische Mutagenese von Plasmiden nach dem <i>Phusion Site-Directed Mutagenesis</i> Protokoll.....	- 56 -
2.3.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	- 59 -
2.3.10	DNA-Gelelektrophorese	- 61 -
2.3.11	Veränderung des Epitops im pYES2/CT	- 62 -
2.4	Methoden für die Analyse von Proteinen	- 63 -
2.4.1	Induktion der Quervernetzung	- 63 -
2.4.2	<i>S. cerevisiae</i> Proteinaufschluss	- 64 -
2.4.3	Proteinfällung nach Wessel und Flügge	- 65 -
2.4.4	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry	- 66 -
2.4.5	Immunpräzipitation.....	- 66 -
2.4.6	Chromatin-Immunpräzipitation.....	- 68 -
2.4.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	- 69 -
2.4.8	Detektion von Proteinen im SDS-Gel.....	- 71 -

2.4.9	2D-Gelelektrophorese.....	- 72 -
2.4.10	Nachweis spezifischer Proteine mit Western Blot-Analyse.....	- 74 -
2.4.11	Nachweis von an die DNA gebundenen Gal4 mittels Slot-Blot.....	- 76 -
2.4.12	Azid-Alkin-Cycloaddition.....	- 77 -
2.4.13	Staudingerligation	- 78 -
2.5	Datenbanken und Datenverarbeitung	- 79 -
ERGEBNISSE.....		- 80 -
1.	Etablierung einer Methode zur Studie und Charakterisierung von Protein-Protein- Wechselwirkungen in <i>S. cerevisiae</i>	- 80 -
1.1	<i>AHA1</i> -Mutagenese.....	- 82 -
1.2	Expression des Aha1-Fusionsproteins in Abhängigkeit von pAzpa.....	- 84 -
1.3	Nachweis der Azidogruppe im Aha1-Fusionprotein	- 85 -
1.3.1	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition	- 85 -
1.3.2	Staudingerligation	- 87 -
1.4	Native Co-Immunpräzipitation und Nachweis von Hsp90	- 88 -
1.5	Induktion der Quervernetzung	- 90 -
1.5.1	Quervernetzung in Abhängigkeit von der nicht-kanonischen Aminosäure pBzpa	- 93 -
1.6	Identifizierung des entstandenen Dimers.....	- 94 -
1.6.1	Charakterisierung des quervernetzten Dimers mittels 2D-Gelelektrophorese.....	- 96 -
1.6.2	Massenspektrometrische Analyse des Monomers und des quervernetzten Dimers.....	- 97 -
1.7	Immunologischer Nachweis eines Homodimers.....	- 102 -
1.8	Einfluss des 6 x His-Tags auf die Ausbildung des Dimers	- 106 -
1.9	Experimente zur Charakterisierung der Methode zur Studie von Protein-Protein- Wechselwirkungen.....	- 108 -
1.9.1	Einfluss des orthogonalen Pärchens und der nicht-kanonischen Aminosäure auf das Wachstumsverhalten von <i>S. cerevisiae</i>	- 108 -
1.9.2	Quervernetzung in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer.....	- 111 -
1.9.3	Quervernetzung in Abhängigkeit von dem Belichtungszeitpunkt nach Induktion der Expression.....	- 112 -
1.9.4	Quervernetzung in Abhängigkeit von der Konzentration der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa	- 113 -

INHALTSVERZEICHNIS

2.	Etablierung einer Methode zur Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen.....	- 115 -
2.1	<i>GAL4</i> -Mutagenese	- 117 -
2.2	Expression des Gal4-Fusionsproteins.....	- 118 -
2.3	Auswertung der Quervernetzungsexperimente.....	- 118 -
DISKUSSION		- 124 -
1.	Wie orthogonal ist der erweiterte genetische Code in <i>S. cerevisiae</i> ?.....	- 125 -
1.1	Der Einfluss der nicht-kanonischen Aminosäure.....	- 126 -
1.2	<i>E. coli</i> Tyrosin-tRNA _{CUA}	- 128 -
1.3	Das Amber Stopp-Codon.....	- 129 -
1.4	Alternativen zu dem in dieser Arbeit verwendeten erweiterten genetischen Code.....	- 131 -
2.	Anwendung des erweiterten genetischen Codes zur Studie von Protein-Protein- Wechselwirkungen.....	- 133 -
3.	Bildet Aha1 <i>in vivo</i> Homodimere aus?	- 137 -
4.	Nächste Schritte zur Etablierung einer Methode zur Studie von Protein-DNA- Wechselwirkungen.....	- 138 -
5.	Ausblick: Weitere Anwendungsbereiche für die nicht-kanonische Aminosäure <i>p</i> - Azidophenylalanin.....	- 140 -
LITERATURVERZEICHNIS		- 142 -
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		- 155 -
TABELLENVERZEICHNIS		- 157 -
ANHANG		- 159 -
PUBLIKATIONEN		- 167 -
DANKSAGUNG		- 168 -
LEBENS LAUF		- 169 -
ERKLÄRUNG		- 170 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström
°C	Grad Celsius
μ	mikro
<i>AHA1</i>	Activator of Heat shock protein 90 ATPase
Aha1 R59X	Aha1 mit der nicht-kanonischen Aminosäure an der Position 59. Ursprüngliche Aminosäure an dieser Position Arginin (R).
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
b (bp)	Basen (Basenpaare)
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Boc	tert-Butyloxycarbonyl
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endkonz.	Endkonzentration
EtOH	Ethanol
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>GAL4</i>	Aktivator der Gene des Galaktosemetabolismus (GALactose metabolism)
Gal4 L19X	Gal4 mit der nicht-kanonischen Aminosäure an der Position 19. Ursprüngliche Aminosäure an dieser Position Leucin (L). Sämtliche Gal4-Proteine im Ergebnissteil sind an ein V5-Epitop und 6 x His-Tag fusioniert.
<i>GAL7</i>	Galactose-1-phosphaturidytransferase (GALactose metabolism)
h	Stunde
H ₂ O _{mol.biol.}	molekular biologisches Wasser
<i>HCH1</i>	a high-copy number suppressor of a HSP90 loss-of-function mutation
<i>HSP90</i>	Heat Shock Protein 90 kDa
HRP	Horseradish peroxidase (Meeretiichperoxidase)
kb	Kilobasen (10 ³ Basenpaare)
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LB	Luria Bertani (Medium)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

M	Molare Konzentration [mol/l]
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolare Konzentration [mmol/l]
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MS	Massenspektrometrie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
pAzpa	<i>para</i> -Azidophenylalanin
pBzpa	<i>para</i> -Benzoylphenylalanin
PDB	Protein Data Bank
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyethylenglykol
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid
PP	Polypropylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SC	Synthetic complete (Medium)
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	Tandem Affinity Purification
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	Unit, Enzymeinheit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	volume per volume
WT	Wildtyp
w/v	weight per volume
YPD	Yeast extract – peptone – dextrose (Medium)

Ein- und Dreibuchstabencodes für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Iso	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

ZUSAMMENFASSUNG

Zahlreiche Methoden zur Studie von Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen wurden bereits etabliert. Jedoch fehlt es an Methoden, welche die Wechselwirkungen hoch aufgelöst und zugleich im natürlichen Kontext beschreiben. Eine neue Möglichkeit für die Entwicklung neuer Ansätze bietet der erweiterte genetische Code. Hierbei werden nicht-kanonische Aminosäuren mit neuen physikalisch-chemischen Eigenschaften an definierte Positionen in Proteine *in vivo* eingebaut.

In dieser Arbeit wurden unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes und den photoreaktiven nicht-kanonischen Aminosäuren *p*-Azidophenylalanin sowie *p*-Benzoylphenylalanin Ansätze für die Erforschung von Protein-DNA- und Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* entwickelt. Hierbei wurden beide nicht-kanonischen Aminosäuren positionsspezifisch mithilfe einer orthogonalen tRNA sowie der entsprechenden orthogonalen Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus *E. coli* in die Modellproteine eingebaut. Zugleich wurde auch die Wirkung der orthogonalen Komponenten des erweiterten genetischen Codes auf den hier verwendeten Modellorganismus *S. cerevisiae* analysiert.

Für die Etablierung einer Methode zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde das Co-Chaperon Aha1 als Modellprotein verwendet. Dabei wurde eine zuvor in der Literatur beschriebene Bindedomäne zu Hsp90 untersucht. An acht unterschiedliche Positionen in der Bindedomäne wurde *p*-Azidophenylalanin eingebaut und eine Interaktion dieser mutagenisierten Aha1-Proteine zu Hsp90 mittels einer nativen Co-Immunpräzipitation bestätigt. Anders als ursprünglich erwartet, wurde durch die Belichtung mit UV-Licht jedoch kein Heterodimer bestehend aus Hsp90 und Aha1, sondern ein Homodimer bestehend aus zwei Aha1-Monomeren quervernetzt und massenspektrometrisch identifiziert. Die Ausbildung des quervernetzten Homodimers war nur in Abhängigkeit von UV-Licht, von der genauen Einbauposition der nicht-kanonischen Aminosäure im Protein und der Zugabe der nicht-kanonischen Aminosäure möglich. Dieses Homodimer konnte auch mit einer weiteren photoreaktiven nicht-kanonischen Aminosäure *p*-Benzoylphenylalanin bestätigt werden. Mit der in dieser Arbeit etablierten Methode konnte eine zuvor *in vitro* beschriebene Bindedomäne von Aha1 zu Hsp90 nicht bestätigt werden. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass diese

Bindedomäne bei der Ausbildung von Homodimeren *in vivo* eine Rolle spielt.

Für die Etablierung einer Methode zur Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen wurde der Transkriptionsfaktor Gal4 als Modellprotein verwendet. Gal4 konnte in Abhängigkeit von *p*-Azidophenylalanin mit der spezifischen *GAL7*-Promotersequenz quervernetzt und dieser Protein-DNA-Komplex deutlich angereichert werden. Allerdings hat sich Gal4 im Laufe der Experimente als ungeeignet für die Etablierung eines globalen Ansatzes zur Charakterisierung aller Gal4-DNA-Bindestellen herausgestellt, da es bei Überexpression eine toxische Wirkung auf die Zellen zeigte.

Zusammengefasst zeigt sich, dass der erweiterte genetische Code einen vielversprechenden Ansatz bietet, um Protein-Protein aber auch Protein-DNA-Wechselwirkungen *in vivo* zu studieren.

SUMMARY

SUMMARY

Numerous methods for the study of protein-DNA and protein-protein interactions have already been established. However, there is a lack of methods describing the interactions in detail and at the same time in the natural context. The expanded genetic code represents a novel opportunity for the development of new approaches. In this context, non-canonical amino acids with novel physical-chemical properties are incorporated in proteins at defined positions *in vivo*.

In this work, using the expanded genetic code and the photoreactive non-canonical amino acids such as *p*-azido-L-phenylalanine or *p*-benzoyl-L-phenylalanine novel approaches for the study of protein-DNA and protein-protein interactions *in vivo* were developed. Both photoreactive amino acids were incorporated position-specific into the model proteins using an orthogonal tRNA as well as the corresponding orthogonal aminoacyl tRNA synthetase from *E. coli*. At the same time, the effect of the orthogonal components on the behaviour of the model organism *S. cerevisiae* was also examined.

Using the co-chaperone Aha1 as a model protein a method for the study of protein-protein interactions was established. Here, the previously described binding domain of Aha1 to Hsp90 was examined. Within the binding domain *p*-azido-L-phenylalanine was specifically incorporated at eight different positions. First of all, the interaction of the Aha1 mutants to Hsp90 was confirmed using native co-immunoprecipitation. In contrast to what was originally expected instead of a heterodimer consisting of Hsp90 and Aha1 a homodimer consisting of two covalently cross-linked Aha1 monomers were identified by mass spectrometry after the exposition to UV light. The formation of the cross-linked homodimer was depending on irradiation with UV light, the exact position of the non-canonical amino acid in the protein sequence as well as on the addition of the non-canonical amino acid to the growth media. This homodimer was confirmed by another photoreactive non-canonical amino acid *p*-benzoyl-L-phenylalanine. With the method established in this work, a previously described *in vitro* binding domain of Aha1 to Hsp90 could not be confirmed. Instead it could be shown that this binding domain plays a role in the formation of an Aha1 homodimer *in vivo*.

To establish a new method for the study of protein DNA interactions the transcription factor Gal4 was used as a model protein. Gal4 could be covalently cross-linked to a specific GAL7 promoter sequence depending on *p*-azido-L-phenylalanine and this

sequence was markedly enriched. However, since the overexpression of Gal4 revealed a toxic effect in the course of the experiments Gal4 was found to be unsuitable for the establishment of a global approach for the characterization of all the Gal4 DNA binding sites.

Taken together the expanded genetic code proved to be a promising approach for protein-protein as well as protein-DNA interaction *in vivo*.

EINLEITUNG

1. Molekulare Wechselwirkungen

1.1 Protein-Protein-Wechselwirkungen

Mit der Parallel-Sequenzierung ist es sehr einfach geworden, sich einen Überblick über das gesamte Transkriptom und somit über die exprimierten Proteine zu einem definierten Zeitpunkt zu verschaffen. Neben der Expressionsrate ist jedoch die Kenntnis über die biologische Funktion eines bestimmten Proteins unerlässlich, um Schlussfolgerungen auf den Zustand und die Aktivität von untersuchten Zellen treffen zu können. Die Bestimmung der biologischen Funktion eines Zielproteins und in welchen biologischen Prozessen es involviert ist, ist ohne die Studie seiner Wechselwirkung mit anderen Proteinen undenkbar. Mit globalen Methoden wie Yeast Two-Hybrid, Co-Immunpräzipitation und Affinitäts-Chromatographie ist es möglich, für ein bestimmtes Zielprotein ein proteomweites Proteininteraktionsnetzwerk aufzustellen. Im Folgenden sollen diese Methoden näher beschrieben werden.

Yeast Two-Hybrid Methode

Die Yeast Two-Hybrid Methode in *S. cerevisiae* wurde zum ersten Mal 1989 von Fields und Song beschrieben und war die erste Methode, mit welcher die Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* möglich war [1]. Sie wurde von der wissenschaftlichen „Community“ sehr schnell akzeptiert und sowohl in ihrer Sensitivität als auch Spezifität verbessert. Zudem wurde sie auf weitere Mikroorganismen, aber auch höhere Eukaryoten übertragen und zu einer automatisierten Hochdurchsatzmethode zur Erstellung von proteomweiten Proteininteraktionskarten weiterentwickelt [2]. Das Prinzip dieser Methode, erklärt am Beispiel von *S. cerevisiae*, ist sehr einfach. Es werden in *S. cerevisiae* zwei Fusionsproteine gleichzeitig exprimiert. Das eine ist fusioniert an die Gal4-DNA-Bindedomäne (wird als „Bait“ bezeichnet), das andere an die Gal4-Aktivierungsdomäne (wird als „Prey“ bezeichnet). Das Bait-Protein bindet an die Gal4-DNA-Konsensussequenz im Promotor eines Reportergens. Wenn nun das Prey-Protein mit dem Bait-Protein interagiert, wird über die Aktivierungsdomäne die Transkription des Reportergens induziert und zeigt somit die Interaktion der beiden

Proteine an. Die Limitation der Yeast Two-Hybrid Methode ist zum einen die Tatsache, dass viele natürliche Protein-Protein-Wechselwirkungen mit ihr nicht detektiert werden können und zum anderen das Auftreten von falsch-positiven Wechselwirkungen. So werden Proteine zusammengebracht, welche in der Natur nicht im selben Zellkompartiment auftreten oder die Faltung der Proteine wird durch das Milieu im Zellkern negativ beeinflusst, wodurch natürliche Wechselwirkungen verloren oder artifizielle erst entstehen können. Daher muss sie immer mit einer komplementären Methode zur Verifizierung kombiniert werden [3,4].

Co-Immunpräzipitation und Affinitäts-Chromatographie

Die Co-Immunpräzipitation ist aufgrund ihrer Einfachheit die wohl am häufigsten angewandte Methode, um Interaktionspartner eines Zielproteins zu identifizieren. Im ersten Schritt werden Zelllysate hergestellt und mit spezifischen Antikörpern gegen das Zielprotein versetzt. Der Antikörper kann dabei gegen das Zielprotein selbst oder gegen ein an das Zielprotein fusioniertes Epitop gerichtet sein. Die Zielprotein-Antikörper-Komplexe und alle an das Zielprotein gebundenen Proteine werden im zweiten Schritt durch die Zugabe von mit Protein A oder Protein G beschichteten Beads spezifisch angereichert. Hierbei macht man sich zunutze, dass Protein A aber auch Protein G, beides bakterielle Oberflächenproteine, die Fc-Region der meisten Antikörpertypen erkennen und binden [5,6]. Die unspezifisch an die Beads gebundenen Proteine werden mit einer Serie von Waschschritten entfernt. Zum Schluss werden die angereicherten Proteinkomplexe eluiert und massenspektrometrisch oder im Western Blot analysiert [7,8].

Die Affinitäts-Chromatographie unterscheidet sich von der Co-Immunpräzipitation darin, dass keine Antikörper gebraucht werden. Stattdessen wird das Zielprotein an einen Affinitäts-Tag wie 6 x His-, Strep- oder TAP-Tag fusioniert [9]. Dabei ist der TAP-Tag aufgrund seiner Anwendung in mehreren proteomweiten Protein-Protein-Wechselwirkungsstudien als Affinitäts-Tag hervorzuheben [10,11]. Er wird meistens C-terminal an das Zielprotein fusioniert und hat eine Größe von etwa 21 kDa. Aufgebaut ist er aus einem Calmodulin-Bindepeptid, gefolgt von einer Schnittstelle für die Tabak-Etch-Virus-Protease (TEV-Protease) und dem Protein A. Die erste Affinitäts-Chromatographie erfolgt über das Protein A, dabei binden die Proteinkomplexe an immobilisierte IgG-Antikörper. Anschließend erfolgt eine spezifische Elution mit der

EINLEITUNG

TEV-Protease. Direkt im Anschluss wird eine zweite Affinitäts-Chromatographie mit Calmodulin-beschichteten Beads durchgeführt. Der Vorteil von diesem Tag liegt darin, dass durch eine zweifache Affinitätschromatographie die unspezifisch gebundenen Proteine signifikant abgereichert werden [12,13]. Wie schon bei der Yeast Two-Hybrid Methode können auch bei der Co-Immunpräzipitation und der Affinitäts-Chromatographie durch das Zusammenbringen von Proteinen aus unterschiedlichen Zellkompartimenten artifizielle Interaktionen entstehen. Zudem gehen schwach affine Wechselwirkungen aufgrund der vielen Waschschrte verloren und transiente Wechselwirkungen können erst gar nicht studiert werden.

1.2 Protein-DNA-Wechselwirkungen

1.2.1 Transkription und die Rolle der Transkriptionsfaktoren

Viele zentrale biologische Prozesse wie z. B. Transkription, genetische Rekombination, DNA-Reparatur, -Replikation und -Verpackung werden durch Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA reguliert.

Die Transkription ist ein wesentlicher Teilprozess der Genexpression. Hierbei wird die DNA-kodierte Information in RNA umgeschrieben. Katalysiert wird dieser enzymatische Prozess von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen. Drei RNA-Polymerasen sind in eukaryontischen Zellen charakterisiert, die aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegen α -Amanitin, einem Mykotoxin, in drei Gruppen eingeteilt werden. RNA-Polymerase I transkribiert die prä-rRNA (ribosomale RNA) und ist unempfindlich gegenüber α -Amanitin [14]. Die RNA Polymerase II transkribiert alle für Proteine kodierenden Gene in die prä-mRNA und ist gegenüber α -Amanitin sehr sensitiv [15,16]. Die RNA Polymerase III zeigt eine mäßige Sensitivität gegenüber α -Amanitin und ist für die Synthese von transfer RNA (tRNA), small nuclear RNA (snRNA) und 5 S rRNA verantwortlich [17]. Im Falle der RNA-Polymerase II handelt es sich um einen Multiprotein-Komplex bestehend aus 12 Proteinen in Hefen [18]. Die richtige Positionierung der RNA-Polymerase II im Promotorbereich eines Gens wird durch die Ausbildung eines Transkriptionsinitiations-Komplexes gesteuert. An diesem Komplex sind die sogenannten „allgemeinen“ Transkriptionsfaktoren (TFIIA-TFIIF) beteiligt. Zusammen mit der RNA-Polymerase II bilden sie den Prä-Initiationskomplex aus. Der

Zusammenbau, aber auch der Start der Transkription wird zudem noch von weiter stromaufwärts oder stromabwärts gebundenen speziellen Transkriptionsfaktoren, welche als Aktivatoren, Verstärker oder Repressoren wirken können, reguliert [19,20]. So kontrollieren die Transkriptionsfaktoren sowohl die konstitutive wie auch die induzierbare Genexpression und steuern Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse, indem sie ein koordiniertes Raum-Zeit-Muster der Genexpression arrangieren [21]. Neben der Unterscheidung in spezielle und allgemeine Transkriptionsfaktoren, kann auch eine Unterscheidung in DNA-bindende und nicht DNA-bindende Transkriptionsfaktoren getroffen werden. Die DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren können basierend auf ihrer DNA-Bindedomäne in drei Klassen eingeteilt werden: die Zn²⁺-stabilisierte-, die Helix-Turn-Helix- und die Zipper-Typ-Klasse. Die Helix-Turn-Helix Transkriptionsfaktoren sind verwandt mit den Proteinen, die über eine Homeodomäne verfügen und bilden sowohl Hetero- wie auch Homodimere aus. Die DNA-Bindedomänen, welche zur Zipper-Typ-Klasse gezählt werden, bestehen aus einem Dimerisierungsmotiv und einer basischen Region. Darunter werden die Transkriptionsfaktoren mit einer Leucin-Zipper und basischen Helix-Loop-Helix DNA-Bindedomäne gezählt. Diese Transkriptionsfaktoren binden in der Regel als Heterodimere an die DNA-Konsensussequenz. Zn²⁺-stabilisierte DNA-Bindedomäne kommt in allen Organismen vor und kann in C2H2-, C6- und C4-Zinkfinger unterteilt werden. Bei dem C6-Zinkfinger werden zwei Zn²⁺-Ionen von 6 Cysteinen komplexiert und diese DNA-Bindedomäne kommt nur in Hefen vor (siehe **Abbildung 7**). Die meisten C6-Transkriptionsfaktoren binden als Homodimere an eine DNA-Konsensussequenz, welche von CGG-Triplets flankiert wird. Die DNA-Sequenzlänge zwischen den CGG-Triplets und die Orientierung des Triplets sind dabei die primären Determinanten für die Diskriminierung zwischen den C6-Transkriptionsfaktoren [22,23]. Einer der bekanntesten Vertreter der C6-Transkriptionsfaktoren ist Gal4, welcher den Galaktose-Metabolismus in Hefen aktiviert [24].

1.2.2 Methoden zur Bestimmung von Protein-DNA-Wechselwirkungen

Die Erforschung der Protein-DNA-Wechselwirkungen ist wichtig, um zelluläre Vorgänge zu verstehen, aber auch um Organismen besser biotechnologisch nutzen zu können. Unterschiedliche molekularbiologische Methoden wurden bereits entwickelt, um die

EINLEITUNG

Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA zu studieren. Die meisten dieser Methoden sind reine *in vitro* Methoden, darunter EMSA (Electrophoretic mobility shift assay), DNase I footprinting, Scanning probe microscopy (SPM) und die “*Surface Plasmon Resonance Technology*” (SPR) [25]. Daneben gibt es noch die *in vivo*-like Methoden wie das Yeast One-Hybrid System [26] und die *in vivo* Methoden wie die DamID-Methode (DNA adenine methyltransferase identification) [27] oder die auf Chromatin-Immunpräzipitation basierenden Methoden [28]. Im Folgenden werden die *in vivo* Methoden, mit denen die genomweite Kartierung von DNA-Bindestellen möglich ist, näher beschrieben.

Auf Chromatin-Immunpräzipitation basierende Methoden

Die Chromatin-Immunpräzipitation ist die verbreitetste Methode, um herauszufinden, ob und wo ein DNA-bindendes Protein zu einem bestimmten Zeitpunkt an die DNA bindet. Durch die Zugabe von Formaldehyd zu den lebenden Zellen werden im ersten Schritt alle Proteine, welche sich in räumlicher Nähe zur DNA befinden, reversibel quervernetzt. Anschließend wird die DNA isoliert und mit Ultraschall oder DNasen fragmentiert. Protein-DNA-Komplexe werden mit Antikörpern gegen das Zielprotein präzipitiert und anschließend die Quervernetzung zwischen dem Zielprotein und der DNA-Sequenz revertiert [28,29]. Bis zu diesem Punkt sind alle auf die Chromatin-Immunpräzipitation basierende Methoden im Ablauf ähnlich. Der Unterschied entsteht dadurch, auf welche Art die präzipitierten DNA-Sequenzen anschließend analysiert werden. Die Detektion von einzelnen oder mehreren bekannten DNA-Sequenzen kann mit PCR erfolgen [30]. Für die genomweite Auswertung der DNA-Sequenzen kommt die ChIP-on-chip Methode in Frage. Hierbei wird die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit der Microarray-Technologie (chip) kombiniert. Die präzipitierten DNA-Sequenzen werden dabei mit einem Tiling Array ausgewertet, welcher mit DNA-Oligomeren, abgeleitet von Promotorregionen, bedruckt ist [31]. Die Limitationen dieser Methode sind unter anderem, dass das Genom des zu untersuchenden Organismus sequenziert sein muss und es können nur die auf dem Array bedruckten DNA-Sequenzen detektiert werden. Die ChIP-on-chip Technologie wird bedingt durch sinkende Preise für Sequenzierungen von der ChIP-sequencing Methode abgelöst. Mit ihr ist es möglich alle präzipitierten DNA-Sequenzen gleichzeitig und ohne eine vorherige Kenntnis der Genomsequenz zu detektieren. Weitere Vorteile gegenüber der ChIP-on-chip Technik

sind die geringere Probenausgangsmenge, robuste Quantifizierung und schwächere Hintergrundsignale. Im ersten Schritt nach der Immunpräzipitation werden an die DNA-Sequenzen definierte Adaptersequenzen ligiert, über welche die DNA-Sequenzen vervielfältigt werden. Anschließend können alle Sequenzen mit der „Next Generation“-Parallel-Sequenzierung in einem Lauf sequenziert werden [32,33].

DamID-Methode

Einen anderen Ansatz zur Kartierung von DNA-Bindestellen eines Zielproteins in Eukaryonten stellt die DamID-Methode (DNA adenine methyltransferase identification) dar. Hier wird an das Zielprotein C-terminal eine DNA-Adeninmethylase (DAM) fusioniert und im Zielorganismus exprimiert. Eine Bindung des Zielproteins an die DNA-Bindesequenz führt zu einer Methylierung von räumlich nah gelegenen Adeninen in der DAM-Erkennungssequenz GA^mTC. Anschließend wird die DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym DpnI, welcher die methylierte GA^mTC-Sequenz schneidet, verdaut. Die GATC-Sequenzen kommen im Genom in Abständen von 0,2 - 2,5 kb vor. Fragmente dieser Größe werden angereichert und können mit Tiling-Arrays oder der Parallel-Sequenzierung ausgewertet werden.

Während die auf die Chromatin-Immunpräzipitation basierenden Methoden anzeigen, wo sich ein bestimmtes Protein zu einem definierten Zeitpunkt auf der DNA aufhält, zeigt die DamID-Methode, wo es überall gewesen ist. Ihr Vorteil liegt darin, dass keine gegen das Zielprotein gerichteten Antikörper notwendig sind. Das ist auch gleichzeitig ihre Limitation, denn dadurch können Bindestellen von posttranslational modifizierten Proteinen nicht studiert werden [34,35].

2. *Saccharomyces cerevisiae*

Häufig werden globale Methoden in Modellorganismen etabliert. Ein zentraler eukaryotischer Modellorganismus ist *Saccharomyces cerevisiae*. Der Hefepilz *S. cerevisiae*, oft auch als Back- oder Bierhefe bezeichnet, ist ein einzelliger Eukaryot und gehört zum Stamm der Schlauchpilze (Ascomycota). In der Molekularbiologie hat sich *S. cerevisiae* durch seine besonderen Eigenschaften gegenüber anderen einzelligen Pilzen zu einem der wichtigsten Modellorganismen entwickelt. Zu nennende Vorteile

EINLEITUNG

von *S. cerevisiae* sind seine geringe genetische Komplexität, das vollständig sequenzierte, annotierte und öffentlich verfügbare Genom [36], das schnelle Wachstum, die unkomplizierten Kulturbedingungen, die Nicht-Pathogenität, die Möglichkeit zur Transfektion mit Plasmid-DNA [37] und die einfache genetische Manipulation durch DNA-Kassetten [38,39]. Zudem kommt als ein weiterer und wichtiger Vorteil für die Etablierung von Methoden zur Studie von Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen hinzu, dass für *S. cerevisiae* 1144 Protein-Protein- und 40 Protein-DNA-Kristallstrukturen verfügbar sind (Protein Data Bank). Das erleichtert einem die Wahl des geeigneten Zielproteins.

Das haploiden Genom von *S. cerevisiae* hat eine Größe von 12 Megabasen und ist auf einem Satz von 16 Chromosomen verteilt. Die einzelnen Chromosomen variieren in der Größe von 200 – 2.200 kb. Darauf sind über 6.000 ORFs (open reading frame) kodiert. Nur 3,8 % der ORFs verfügen über Introns, somit ist das Hefegenom sehr kompakt aufgebaut. Die Chromosomen machen 85 %, die mitochondriale DNA 10 % und die 2 μ Plasmid-DNA 5 % der doppelsträngigen DNA von *S. cerevisiae* aus. Ausgehend von den 2 μ Plasmiden, die wie die Chromosomen im Zellkern lokalisiert sind, ist eine Vielzahl von Plasmiden zur Expression von Zielproteinen in *S. cerevisiae* abgeleitet worden [40]. *S. cerevisiae* kann stabil entweder als heterothallischer oder homothallischer Stamm vorkommen. Bei homothallischen Stämmen ist nur ein stabiler diploider Zustand möglich, während sich heterothallische Stämme sowohl als haploide wie auch diploide Zellen kultivieren lassen. Als haploide Zellen weisen sie den Mating-Typ (Paarungstyp) a oder α auf. Die Besonderheit von homothallischen Stämmen ist, dass sie als haploide Zellen ihren Mating-Typ wechseln können. Infolgedessen ist es nicht möglich, diese Stämme als haploide Zellen zu kultivieren [41]. Die **Abbildung 1** beschreibt den Lebenszyklus von *S. cerevisiae*.

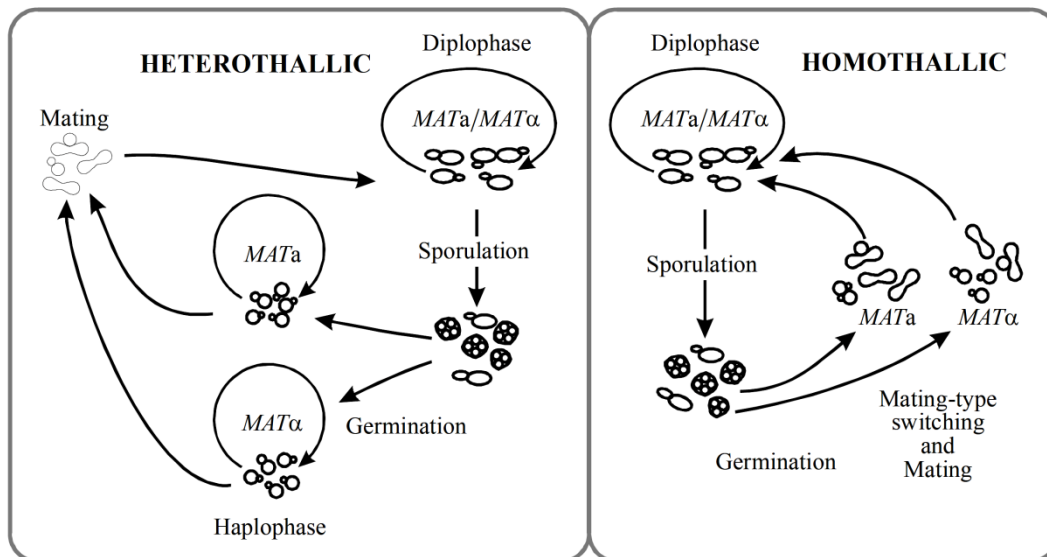


Abbildung 1: Lebenszyklus von heterothallischen und homothallischen *S. cerevisiae*-Stämmen

Heterothallische Stämme lassen sich sowohl als diploide wie auch als haploide Zellen kultivieren. Bei Stress wie z.B. Stickstoffmangel, sporulieren die diploiden Zellen und es können stabile haploide Populationen gebildet werden. Homothallische Stämme lassen sich stabil nur in der diploiden Phase halten, da sie in der haploiden Phase ihren Mating-Typ wechseln und somit zurück in die diploide Phase übergehen können. Abbildung nach [41].

Vorsicht ist bei der Auswahl der Stämme für geplante Experimente geboten. Die etablierten, in genetischen Studien verwendeten wildtypischen Laborstämme unterscheiden sich durch Mutationen von den echten wildtypischen *S. cerevisiae*-Stämmen. Zum einen stammen sie bereits von mutagenisierten Stämmen ab, zum anderen wurden genetische Marker in das Genom eingebaut. So eignet sich der weit verbreitete Stamm S288C aufgrund des Fehlens des *HAP1*-Gens nicht für mitochondriale Studien [40]. Wildtyp und Deletionsstämme können von EUROSCARF bezogen werden.

3. Der erweiterte genetische Code

3.1 Der genetische Code (Grundlagen)

Der genetische Code repräsentiert die Anleitung wie Nukleotidsequenzen der mRNA in die entsprechenden Aminosäuresequenzen der resultierenden Proteine übersetzt werden. Heinrich Matthaei, ein deutscher Biochemiker, entschlüsselte 1961 das erste Codon UUU für die Aminosäure Phenylalanin [42]. Ein paar Jahre später wurde der genetische Code, so wie wir ihn heute kennen, als universell und degeneriert

EINLEITUNG

beschrieben [43]. Die DNA ist aufgebaut aus der Abfolge von vier Nukleotiden (Adenin, Cytosin, Thymin, Guanin). Daraus resultieren 64 mögliche Basentriplets (Codons). Abzüglich der drei Stopp-Codons kodieren 61 Codons in der Regel für 20 kanonische Aminosäuren. Das führt dazu, dass für manche Aminosäuren mehrere Codons kodieren. Um eine Aminosäure in die Proteinsequenz während der Translation einzubauen, ist auch eine zum Codon passende tRNA und eine spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase, welche die tRNA mit der Aminosäure belädt, notwendig. Je nach Organismus werden aber 41 und nicht 61 tRNAs exprimiert. Diese Tatsache führt dazu, dass der genetische Code als degeneriert verstanden wird und lässt sich mit der Wobble-Hypothese erklären. Demnach können einige tRNAs unterschiedliche Codons binden. Das wird ermöglicht durch die dritte Base, auch als Wobble-Position bezeichnet. Zum einen kann sie zu unübliche Basenpaarungen im Ribosom führen, zum anderen ist der Einbau der Base Inosin an die Wobble-Position in der tRNA möglich. Inosin ist in der Lage zu Adenin, Cytosin und Uracil eine Basenpaarung auszubilden.

Der genetische Code ist universell, denn bis auf wenige Ausnahmen verwenden alle Organismen dieselbe genetische Kodierung. Ein bestimmtes Codon kodiert beispielsweise in *E. coli* für dieselbe Aminosäure wie in *S. cerevisiae*. Zu nennende Ausnahmen sind [44]:

- Einige Archae kodieren die nicht-kanonische Aminosäure Pyrrolysin.
- Die zweideutige Nutzung des Codons UGA in allen drei Domänen des Lebens, so kann es für das Stopp-Codon, aber auch für die nicht-kanonische Aminosäure Selenocystein kodieren.
- Das Codon CUG in *Candida albicans* kann sowohl für Serin wie auch Leucin kodieren.

3.2 Methoden zum Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine

Die Zusammensetzung aus 20 kanonischen Aminosäuren und ihre Abfolge innerhalb der Proteinsequenz sind alleine oft nicht ausreichend für die Ausbildung der räumlichen Struktur und die Entfaltung der spezifischen Proteinfunktion. So können weitere posttranslationale Modifizierungen notwendig sein. Diese können enzymkatalysiert durch die kovalente Addition chemischer Verbindungen an die Gruppen der kanonischen Aminosäuren erfolgen. Durch die posttranslationale Proteinmodifikation

kann sich die Komplexität des Proteoms, gegenüber dem kodierenden Genom, um den Faktor zwei bis drei erhöhen. So sind mehr als 200 kovalente Proteinmodifikationen an 15 der 20 kanonischen Aminosäuren bekannt. Weitverbreitete posttranslationale Proteinmodifikationen sind N- und O-Glykosylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen und die N-Acylierung mit Acetyl-, Biotinyl-, Lipoyl- und Ubiquityl-Gruppen [45]. Eine ausführliche Zusammenstellung der möglichen Modifikationen an den kanonischen Aminosäuren ist in **Abbildung 45** im Anhang dargestellt.

Neben diesen kanonischen Aminosäuren sind weit mehr als 250 nicht-kanonische Aminosäuren bekannt und chemisch synthetisierbar. Der selektive Einbau dieser Aminosäuren in Proteine würde diesen neue und einzigartige physikalisch-chemische Eigenschaften verleihen. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass Anstrengungen unternommen werden, nicht-kanonischen Aminosäuren zu nutzen und positionsspezifisch in Proteine einzubauen. So wurden bereits unterschiedliche Methoden wie die Merrifield-Festphasen-Peptidsynthese, für die 1984 der Nobelpreis für Chemie verliehen wurde [46], der Einbau von strukturanalogen kanonischen Aminosäuren *in vivo* [47] oder die zellfreie Proteinsynthese [48] etabliert.

Bei der Merrifield-Festphasen-Peptidsynthese läuft die Reaktion in gequollenen Gelsystemen ab. Als feste Matrix wird Polystyrol, aber auch Polyacrylamid verwendet. Die Matrix ist funktionalisiert mit Chlormethylgruppen, an welche die erste Aminosäure über die Carboxylgruppe kovalent gekoppelt wird. Währenddessen ist die Aminogruppe über eine tert-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc-Gruppe) geschützt. Im nächsten Schritt wird die Aminogruppe deblockiert und die nächste mit Boc geschützte Aminosäure kann über die Carboxylgruppe an die Aminogruppe gekoppelt werden. Das zum Schluss entstandene Peptid lässt sich mit Fluorwasserstoffsäure von der Matrix eluieren. Mit dieser Methode ist es möglich Peptide mit einer Größe von 50 - 100 Aminosäuren herzustellen[46]. Die geringe Größe der synthetisierten Peptide ist gleichzeitig die Limitation dieser Methode. Einzeln hergestellte Peptide lassen sich zwar ligieren, dafür sind aber viele Schutzgruppen notwendig. Auch die richtige Proteinfaltung des synthetisierten Proteins stellt bei dieser Methode eine Herausforderung dar.

Unter der zellfreien Proteinsynthese versteht man die Translation exogener RNA und damit die Expression von Zielproteinen in zellfreien Systemen. Diese basieren auf den Extrakten von *E. coli*, Weizenkeimen oder Retikulozyten von Kaninchen. Diese Extrakte sind Überstände einer 30.000 x g Zentrifugation und enthalten Bestandteile der Protein-translationsmaschinerie wie Ribosomen, Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-

EINLEITUNG

Synthetasen und tRNAs. Supplementiert werden die Extrakte mit der zu translatierenden RNA und zur Steigerung der Effizienz mit Enzymen für die Energieregeneration. Um mit diesem System nicht-kanonische Aminosäuren in Proteine einzubauen, eignet sich ein abgeleitetes System namens *PURE* (protein synthesis using recombinant elements). Hier wird nicht mit unzureichend definierten Extrakten gearbeitet, sondern die Bestandteile der Proteinbiosynthese werden einzeln isoliert oder zuvor in *E. coli* rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Anschließend können die einzelnen Bestandteile definiert zusammengemischt werden. Das erlaubt zum einen ein hohes Maß an Kontrolle über die Reaktion durch Schaffung von definierten Bedingungen, zum anderen können Aminosäure kodierende Codons verwendet werden, um mehrere nicht-kanonische Aminosäuren in ein einziges Protein einzubauen [48]. Mit dieser Methode können zytotoxische Proteine exprimiert werden und es ist der Einbau von mehreren nicht-kanonischen Aminosäuren in ein Protein möglich. Großer Nachteil dieser Technik ist die geringe und/oder unzuverlässige Syntheseleistung für viele Proteine gegenüber einer *in vivo* Expression. Eine Herausforderung ist auch hier die richtige Faltung des Zielproteins und die posttranslationale Proteinmodifikation, wodurch nicht jedes Protein für die zellfreie Proteinsynthese geeignet ist.

Außerdem zu erwähnen wäre die „Selective Pressure Incorporation“-Methode. Sie erlaubt den Einbau nicht-kanonischer Aminosäuren durch Selektionsdruck *in vivo*. Für eine bestimmte Aminosäure auxotrophe Wirtsstämme, in der Regel Prokaryonten, werden bis zu einer gewünschten optischen Dichte in Vollmedium hochgezogen. Anschließend wird die Expression des Zielproteins in Minimalmedium induziert. Dabei wird die Auxotrophie für die kanonische Aminosäure durch ein Aminosäurederivat, welches zum Medium dazugegeben wird, supplementiert. Wodurch diese nicht-kanonische Aminosäure anstatt der kanonischen Aminosäure in das Zielprotein eingebaut wird. Ermöglicht wird diese Vorgehensweise aufgrund der geringen Substratspezifität der individuellen Aminoacyl-tRNA-Synthetase bzw. ihrer Toleranz gegenüber bestimmten Aminosäurederivaten [47,49]. Mit dieser Methode konnten nicht-kanonische Aminosäuren bereits in zahlreichen Studien eingebaut und angewendet werden. Beispielsweise wurde Telluromethionin in einer Studie für Methionin in unterschiedliche Zielproteine eingebaut. Die schweren Atome in der Proteinsequenz ermöglichten eine vereinfachte kristallographische Strukturbestimmung bei der isomorphen Kristallisation des Proteins gegenüber dem nativen Protein [50]. In einer anderen Studie konnte die Peroxygenase-Aktivität von Cytochrom P450 durch den

Austausch von 13 Methioninen zu Norleucin um den Faktor zwei gesteigert werden [51]. Schwäche der „Selective Pressure Incorporation“-Methode ist der globale und nicht positionsspezifische Einbau der nicht-kanonischen Aminosäuren. Zudem ist kein kontinuierliches Zellwachstum möglich und es können nur sehr ähnliche Derivate abgeleitet von den kanonischen Aminosäuren eingebaut werden.

3.3 Der erweiterte genetische Code in *S. cerevisiae*

Einen weiteren Ansatz zum Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine *in vivo*, stellt die von Peter Schultz und seiner Gruppe entwickelte Methode des „Erweiterten Genetischen Codes“ dar. Die Idee dahinter ist ein Organismus, welcher die nicht-kanonische Aminosäuren mit derselben Genauigkeit und Effizienz parallel zu den kanonischen Aminosäuren positionsspezifisch in Proteine einbaut. Um das zu realisieren wurden die Gesetzmäßigkeiten der Proteinbiosynthese angewandt. Der genetische Code eines Organismus wurde um eine tRNA und eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase für eine bestimmte nicht-kanonische Aminosäure erweitert. Bei der Etablierung dieser Methode wurden mehrere Voraussetzungen an das System gestellt. Erstens, die nicht-kanonische Aminosäure muss metabolisch stabil sein, in das Zytoplasma der Zelle gelangen, darf kein Substrat für endogene Aminoacyl-tRNA-Synthetasen sein und sie muss sowohl vom Elongationsfaktor wie auch vom Ribosom toleriert werden. Zweitens, das für die Suppression verwendete Codon muss einzigartig sein und darf nur von der neuen und nicht von den endogenen tRNAs erkannt werden. Da alle Codons bereits für kanonische Aminosäuren kodieren, wird für diesen Zweck das Stopp-Codon TAG verwendet. Drittens, das Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Pärchen muss spezifisch für die nicht-kanonische Aminosäure und orthogonal gegenüber endogenen Pärchen sein (siehe **Abbildung 2**).

EINLEITUNG

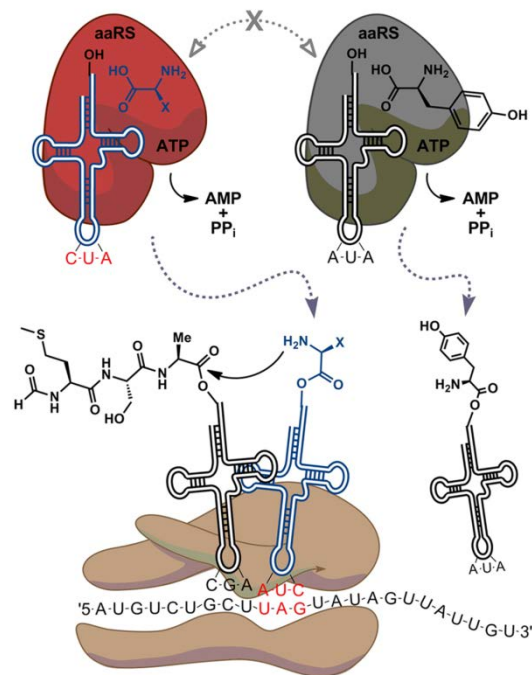


Abbildung 2: Orthogonalität des Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA_{CUA}-Paares während der Translation

Die orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase (rot) aminoacyliert nur die orthogonale tRNA_{CUA} (blau) mit einer bestimmten nicht-kanonischen Aminosäure. Die aminoacylierte tRNA gelangt zum Ribosom (braun) und supprimiert das Stopp-Codon (UAG). Somit wird an diese Stelle eine nicht-kanonische Aminosäure in die wachsende Proteinsequenz eingebaut. Die Orthogonalität ist dadurch gegeben, dass das orthogonale Pärchen die natürlichen Systeme, hier das Tyrosyl-tRNA-Synthetase/tRNA_{AUA}-Paar (grau) nicht beeinflusst und umgekehrt. Abbildung nach [52].

Die Orthogonalität des Pärchens war bei der Etablierung des erweiterten genetischen Codes die größte Herausforderung. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Pärchen aus anderen Domänen des Lebens als der Zielorganismus selbst gewählt und heterolog exprimiert [52,53]. Für die Etablierung des erweiterten genetischen Codes in *S. cerevisiae* wurde das Tyrosyl-tRNA-Synthetase/tRNA-Pärchen aus *E. coli* verwendet [54,55]. Das dabei verfolgte Selektionsschema ist im Anhang in der **Abbildung 44** gezeigt.

Neben *S. cerevisiae* wurde der erweiterte genetische Code auch in *Escherichia coli* [56], *Mycobacterium tuberculosis* [57], *Pichia pastoris* [58], *Candida albicans* (Daten noch nicht veröffentlicht) und Säugerzelllinien wie CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) [59-63] etabliert und beschrieben.

Der wesentliche Vorteil dieses Systems ist der positionsspezifische Einbau von mittlerweile über 70 nicht-kanonischen Aminosäuren in Proteine *in vivo*. Damit ist man

in der Lage gezielt neue, definierte und unter physiologischen Bedingungen in Biomolekülen nicht vorhandene chemische Gruppen in eine Proteinsequenz einzubauen. Diese Gruppen können dann genutzt werden, um konkrete Fragestellungen im natürlichen Kontext zu beantworten. Als Nachteil ist die Umprogrammierung des Amber Stopp-Codons TAG zum Aminosäure kodierenden Codon zu nennen. Das führt dazu, dass auch natürlich vorkommende TAG-Codons überlesen und dadurch artifizielle Proteine exprimiert werden.

3.4 Nicht-kanonische Aminosäuren und ihre Anwendung

Inzwischen ist es möglich mit Hilfe des erweiterten genetischen Codes mehr als 70 nicht-kanonische Aminosäuren mit definierten biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften gezielt in die Proteine verschiedener Organismen *in vivo* einzubauen [53,64]. Aufgrund der hohen Anzahl der chemisch synthetisierbaren nicht-kanonischen Aminosäuren ist es absehbar, dass weitere dazukommen werden.

Neben der reinen Erweiterung des genetischen Codes, um neue nicht-kanonische Aminosäuren, wurden auch zahlreiche Studien zur biochemischen Anwendung dieser veröffentlicht. Darunter befinden sich beispielsweise Aminosäuren mit chemisch reaktiven, photoreaktiven, redoxaktiven, fluoreszierenden und Metallionen komplexierenden Gruppen [64]. Durch den gezielten Einbau von beispielsweise 2-Nitrophenylalanin an eine definierte Position im Protein, kann das Protein sowohl positions- wie zeitspezifisch photochemisch induziert gespalten werden [65]. Mit dem Einbau von 4,5-Dimethoxy-2-Nitrobenzyl-L-Serin wurde die Phosphorylierung eines bestimmten Serins zeitlich gesteuert. Das Serinderivat hat eine funktionelle Gruppe, welche mit einem Laserpuls (465 nm) *in vivo* abgespalten werden kann. Zurück bleibt die phosphorylierbare kanonische Aminosäure Serin [66]. Hervorzuheben ist, dass ein medizinisch relevantes Hormon, welches zur Behandlung von Kleinwuchs eingesetzt wird, erfolgreich die erste klinische Studie beendet hat. Dabei wurde *p*-Acetylphenylalanin an die Position 35 im Protein eingebaut und anschließend an diese Aminosäure Polyethylenglykol konjugiert. Diese Modifizierung führte zu deutlich verbesserten pharmakodynamischen Eigenschaften des Hormons [67].

EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit soll die Verwendung der zwei nicht-kanonischen Aminosäuren *p*-Azidophenylalanin (pAzpa) und *p*-Benzoylphenylalanin (pBzpa) zur Studie von Protein-DNA und Proteine-Protein-Wechselwirkungen untersucht werden (**Abbildung 3**). Beide Aminosäuren verfügen über eine photoreaktive Gruppe, welche in Abhängigkeit von UV-Licht zur Ausbildung von kovalenten Bindungen zu benachbarten Gruppen verwendet werden kann.

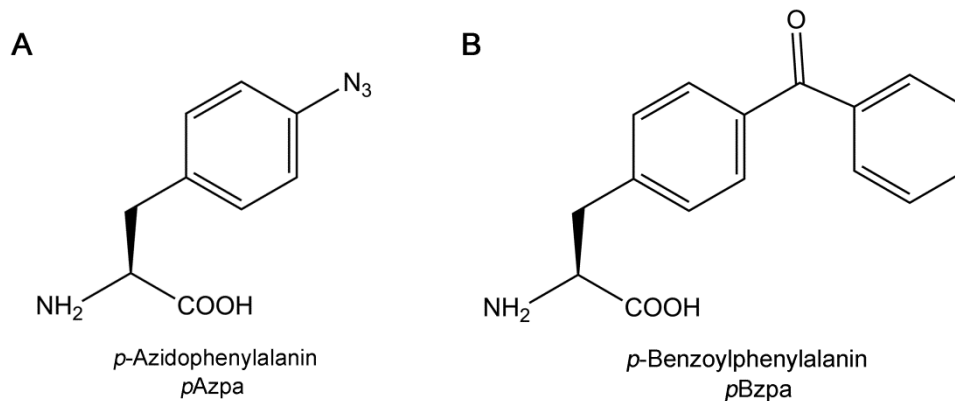


Abbildung 3: *p*-Azidophenylalanin und *p*-Benzoylphenylalanin

Gezeigt sind hier die zwei in dieser Arbeit verwendeten nicht-kanonischen Aminosäuren *p*-Azidophenylalanin (A) und *p*-Benzoylphenylalanin (B). Die **Abbildung 46** und **47** im Anhang zeigt, wie die jeweilige reaktive Gruppe der einzelnen Aminosäure abreagiert. Die Strukturformeln wurden mit dem Programm ChemDraw erstellt.

Die Aminosäure pAzpa (**Abbildung 3A**) ist ein L-Phenylalanin-Derivat mit einer Azidogruppe an der para-Position des Benzolrings. Diese Azidogruppe verleiht der Aminosäuren ihre besonderen Eigenschaften. Azide sind chemisch inert, unter physiologischen Bedingungen stabil, kommen selten in biologischen Systemen vor [68] und können unter definierten Bedingungen chemisch sowohl über die Staudingerligation [69], als auch Azido-Alkin-Huisgen-Cycloaddition (Click-Chemie) abreagieren [70-73]. Auch ist eine Photolyse mit UV-Licht (280 - 365 nm) möglich, wodurch eine hochreaktive Nitrengruppe entsteht. Diese Nitrengruppe reagiert mit benachbarten Gruppen wie Amino-, Hydroxy- und C-H-Gruppen ab. Dabei entsteht eine kovalente Bindung zwischen den Molekülen (siehe **Abbildung 46** im Anhang) [74,75]. Die selektive Eigenschaften der Azidogruppe in natürlichen Systemen und die Tatsache, dass sie in Verbindung mit dem erweiterten genetischen Code in sehr vielen Organismen genutzt werden kann, lässt das Potential dieser Aminosäure erkennen [54,57,58,76-79]. Die bisherigen Arbeiten zu pAzpa sind sehr vielfältig. Mit Hilfe der Click-Chemie, aber

auch der Staudingerligation konnten kleine Moleküle wie Fluoreszenzfarbstoffe und Biotin, aber auch größere Moleküle wie Polyethylenglykol spezifisch an ein Protein gekoppelt werden [80-82]. Auch wurden bereits Kreuzvernetzungsexperimente in *E. coli* [76] und einer Säugerzelllinie [79,83] beschrieben. Weitere Studien zeigen die erfolgreiche Immobilisierung eines Proteins über die Azidogruppe [84]. Neben Kopplungs- und Quervernetzungsexperimenten konnte mit Hilfe der spezifische Schwingungssignatur der Azidogruppe strukturelle Veränderungen eines Rezeptors während seiner Aktivierung studiert werden [85].

Die Aminosäure pBzpa (**Abbildung 3B**) ist ebenfalls ein L-Phenylalanin-Derivat mit einer Benzoylgruppe an der para-Position des Benzolrings. Die reaktive Gruppe von pBzpa ist die Ketogruppe innerhalb der Benzophenongruppe. Mit UV-Licht (312 – 365 nm) wird die Photolyse der Ketogruppe induziert. Es entsteht ein Radikal, welches mit C-H-Gruppen innerhalb eines Radius von 3,1 Å zu einer kovalenten Bindung abreagieren kann (**Abbildung 47**). Gegenüber der Azidogruppe hat diese Gruppe die Eigenschaften, dass sie stabil in den meisten protischen Lösungsmitteln ist, sie nur mit einer definierten Gruppe abreagiert und bei Nicht-abreagieren regenerieren kann [75,86,87]. Als Nachteil wäre zu nennen, dass pBzpa bevorzugt mit Methioninen abreagiert und deswegen in Quervernetzungsexperimenten nicht zwingend mit der angrenzenden Aminosäure in der Proteinstruktur eine kovalente Bindung ausbildet [88]. Aufgrund seiner Eigenschaften wird pBzpa, eingebaut in Peptid-Liganden, schon sehr lange zur Charakterisierung von Bindestellen bestimmter Rezeptoren und Drug-Targets verwendet [75,89]. Die *in vivo* Expression von Proteinen mit pBzpa an einer definierten Position in der Proteinsequenz ist in *E. coli* und unterschiedlichen Eukaryonten möglich [54,58,62,78,90-92]. Die ersten Quervernetzungsexperimente von Protein-Protein-Interaktionen unter Verwendung von pBzpa wurden bereits in *E. coli* [90,93,94], Säugerzellen [61] und *S. cerevisiae* [95] durchgeführt.

4. Die in dieser Studie verwendeten Modellproteine Aha1 und Gal4

4.1 Das Co-Chaperon Aha1

Für die Etablierung einer Methode zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde bewusst eine bekannte Interaktion gewählt, welche neben der klassischen Methoden wie Yeast Two-Hybrid auch mit einer Kristallstruktur beschrieben wurde. Mit dieser Herangehensweise wurde für den „Proof of Principle“ die Interaktion zwischen dem Modellprotein Aha1 und Hsp90 gewählt. Die Interaktion wurde 2004 zum ersten Mal anhand einer Kristallstruktur beschrieben und 2010 durch eine andere Gruppe näher charakterisiert [96,97]. Im Folgenden sollen die beiden Proteine näher vorgestellt werden.

Hsp90

Das 90 kDa große Hitzeschockprotein Hsp90 ist ein hoch konserviertes Protein in allen Eukaryoten. Es wird konstitutiv exprimiert und ist eines der abundantesten Proteine in der Zelle. Innerhalb des Hsp90-Monomers können drei funktionelle Domänen unterschieden werden (siehe **Abbildung 4**). Auch wurde bereits die vollständige dreidimensionale Struktur aufgeklärt [98].

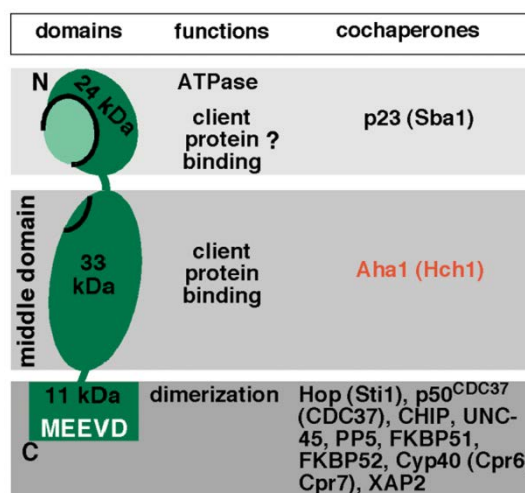


Abbildung 4: Hsp90-Domänen, ihre Funktionen und die interagierenden Co-Chaperone

Zu sehen ist eine schematische Darstellung des Hsp90-Proteins. Es kann in drei Domänen unterteilt werden. Die C-terminale Domäne ist zum einen verantwortlich für die Dimerisierung zweier Hsp90-Monomere und zum anderen besitzt diese Domäne ein MEEVD-Motiv, über das die Co-Chaperone mit Hsp90 wechselwirken. In der mittleren Domäne binden die Substratproteine, die dann in ihre funktionelle

Proteinkonformation gefaltet werden. Hier bindet auch das Aha1-Protein, welches die ATPase-Aktivität des Hsp90 in der N-terminalen Domäne positiv beeinflusst. Abbildung aus [99].

Zur Ausübung seiner Funktion ist eine Dimerisierung zweier Hsp90-Monomere, ATP und eine Vielzahl von Co-Chaperonen notwendig, darunter auch Aha1 [100]. Die von Hsp90 aktivierten Substratproteine spielen in der Zelle eine zentrale Rolle in Signaltransduktion, zellulärem Transport, Chromatin-Remodeling, Zellwachstum und Differenzierung. Im Cytosol von *S. cerevisiae* werden zwei Isoformen des Hsp90-Proteins exprimiert, die unter den Namen Hsp82 und Hsc82 geführt werden [101]. Beide sind in ihrer Funktion redundant und zeigen in der Aminosäuresequenz eine 96%ige Übereinstimmung (siehe Anhang **Abbildung 42**). Die Übereinstimmung von *S. cerevisiae* Hsp90 im Vergleich zum humanen Hsp90 (alpha und beta) liegt bei etwa 60 %.

Aha1

Eine Homologiesuche mit der Sequenz des *S. cerevisiae* *HCH1*, eines 153 Aminosäuren großen Proteins, gegen die *S. cerevisiae* Datenbank wurde *AHA1* als ein Homolog von *HCH1* identifiziert. Die Proteinsequenz von Aha1 (350 Aminosäuren) zeigt im N-Terminus eine 36,5%ige Sequenzübereinstimmung zu Hch1 [102,103]. Der Bezug von Aha1 zu Hsp90 wurde zum einen durch Hch1 hergestellt, welches als Suppressor einer *HSP90*-Funktionsverlustmutation charakterisiert wurde [104] und zum anderen durch globale Expressionsstudien in *S. cerevisiae*. Hier wurden bei unterschiedlichen Stressbedingungen signifikant ähnliche Expressionsprofile für *AHA1* wie für *HSP90* und seine bis dato bekannten Co-Chaperone beobachtet [105].

Unter normalen Wachstumsbedingungen verhalten sich *AHA1*-Deletionsstämme wildtypisch [102,106,107]. Auf Platten mit der nicht fermentierbaren C-Quelle Glycerin und bei steigenden Temperaturen bis 39 °C können die Deletionsstämme ab 36 °C nicht mehr wachsen [102]. Mit der Überexpression von Aha1 unter dem *GAL1*-Promotor [106] auf einem 2 µ Plasmid konnte kein negativer Effekt auf das Zellwachstum bzw. die Interaktion von Aha1 mit Hsp90 beobachtet werden [108]. Auch das C-terminale Fusionieren von immunologisch detektierbaren Tags wie FLAG- [108] oder dreifachen MYC-Tag an das Aha1-Protein beeinflusste nicht seine wildtypische Funktion [109].

Im Jahre 2004 konnte die Interaktion von Hsp90 mit Aha1 durch eine Kristallstruktur aufgeklärt werden [96]. Bei der Kristallisation wurde die N-terminale Domäne von Aha1

EINLEITUNG

(N-Aha1, 1 - 153) und die mittlere Domäne von Hsp90 (M-Hsp90, 273 - 530) kristallisiert (siehe **Abbildung 5**). Die Interaktion kommt durch die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren Leu 315, Ile 388 und Val 391 des Hsp90-Proteins mit den Seitenketten der Aminosäuren Ile 64, Leu 66 und Phe 100 des Aha1-Proteins zustande. Stabilisiert wird diese Interaktion durch polare Interaktionen weiterer Aminosäuren. Auch konnte mit dieser Kristallstruktur die Funktion des basischen Motivs 59-RKGK-62, welches über alle Aha1-Homologe konserviert ist (siehe Anhang **Abbildung 43**), aufgeklärt werden. Die Seitenketten der Aminosäuren in diesem Motiv sind zum Hsp90 orientiert und bilden Ionenpaar-Wechselwirkungen zu Glu 372 und Asp 373 an der Basis der katalytischen Schleife von Hsp90 aus und stabilisieren diese. Der Austausch dieser Aminosäuren durch andere Aminosäuren führt zur Verringerung der ATPase-Aktivität [96].

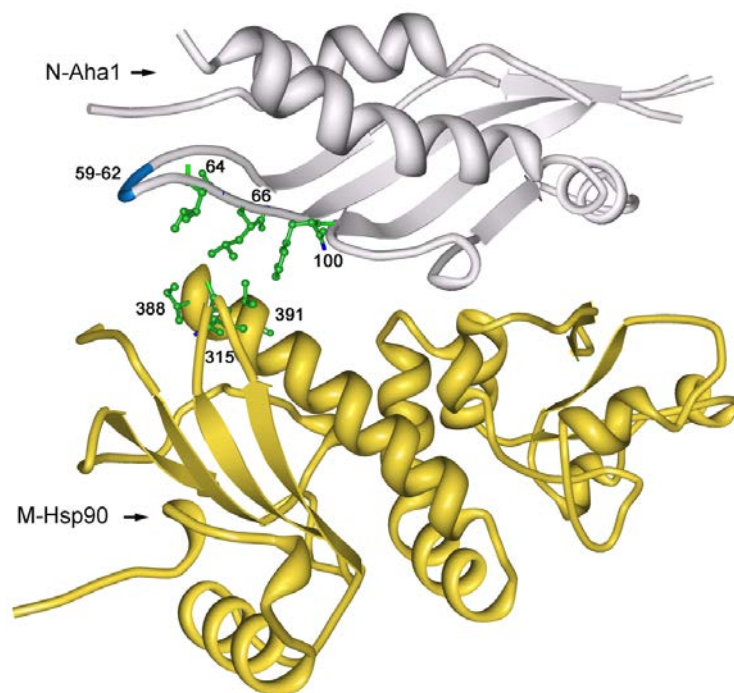


Abbildung 5: 3D-Kristallstruktur des Komplexes zwischen Hsp90 und Aha1

Zu sehen ist die Kristallstruktur von *S. cerevisiae* N-Aha1 (Aminosäuren 1 - 153) und *S. cerevisiae* M-Hsp90 (Aminosäuren 273 - 530). Die zentrale Interaktion zwischen den beiden Proteinen findet über die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren Leu 315, Ile 388 und Val 391 von Hsp90 mit den Seitenketten der Aminosäuren Ile 64, Leu 66 und Phe 100 von Aha1 statt. Diese Interaktion wird durch die Interaktion weiterer Aminosäuren stabilisiert. Das basische Motiv 59-RKGK-62, welches sich in der flexiblen Spitze des Loops befindet und über alle Aha1-Homologe konserviert ist (siehe Anhang **Abbildung 43**), wurde blau dargestellt [96]. Die Kristallstruktur wird auf PDB unter dem Namen 1USU geführt.

Die Kristallstruktur von Meyer *et al.* konnte 2010 von Retzlaff *et al.* bestätigt und weiter charakterisiert werden [97]. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass ein Aha1-Molekül ausreichend ist, um die ATPase-Aktivität beider Hsp90-Monomere im Homodimer zu aktivieren. Der Aktivierungsmechanismus des Hsp90 Homodimers durch ein Aha1-Protein ist in der **Abbildung 6** zu sehen.

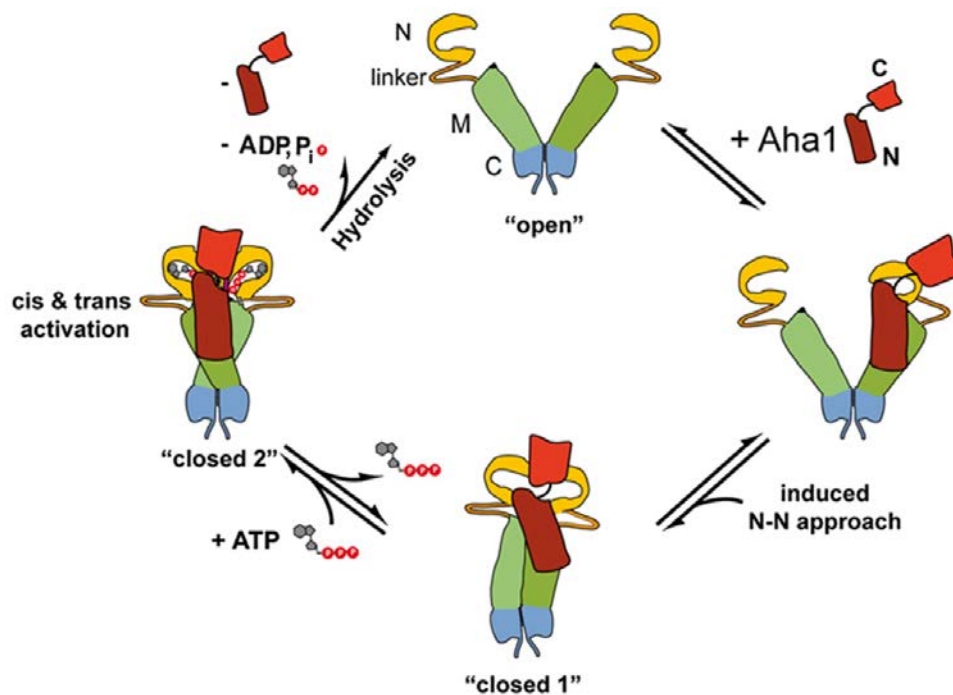


Abbildung 6: Schematische Übersicht des Aktivierungsmechanismus des Hsp90 Homodimers durch ein Aha1-Protein

Hsp90 liegt als Homodimer, dimerisiert über die C-terminale Domäne, in einer offenen Konformation („open“) vor. Ein Aha1-Molekül bindet über seine N-terminale Domäne an das Dimer und initiiert die Annäherung der beiden N-terminalen Nukleotid-bindenden Hsp90-Domänen („closed 1“). Die Bindung von ATP initiiert die zweite geschlossene Konformation („closed 2“). Jetzt kann die C-terminale Aha1-Domäne in die neu entstandene Furche zwischen zwei N-terminalen Hsp90-Domänen binden, wodurch sie Kontakt zu beiden N-terminalen Hsp90-Domänen bekommt. So kann ein Aha1-Molekül die ATPase-Aktivität von beiden Hsp90-Molekülen aktivieren. Nach der Hydrolyse von ATP zu ADP kehrt das Hsp90-Dimer in seine offene Konformation zurück. Abbildung aus [97].

Ergänzend ist zu erwähnen, dass die Interaktion von Aha1 mit Hsp90 auch über das Yeast Two-Hybrid System [102,103,110,111], die Co-Immunpräzipitation [102,112], FRET-Analysen [97,113] und die Aktivierung von v-Src gezeigt wurde [102,103].

4.2 Der Transkriptionsfaktor Gal4

Der Transkriptionsfaktor Gal4 in *S. cerevisiae* ist ein sehr detailliert beschriebener und charakterisierter Transkriptionsfaktor. Basierend auf Gal4 sind bereits mehrere molekularbiologische Methoden entstanden wie die Enhancer-Trap-Technik für die Erforschung von Genexpressionsmustern in *Drosophila melanogaster* [114], das Yeast Two-Hybrid System zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen in *S. cerevisiae* [115] oder das Yeast One-Hybrid System zur Charakterisierung von Protein-DNA-Wechselwirkungen [26].

Lokalisation und Struktur

GAL4 ist auf dem Chromosom XVI lokalisiert [116,117]. Der Open Reading Frame ist 2.646 bp lang. Das resultierende Protein setzt sich aus 881 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von ca. 99 kDa [118,119]. Für den Gal4-Transkriptionsfaktor konnten bereits unterschiedliche funktionelle Domänen beschrieben werden, darunter die DNA-Bindedomäne, zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen, zum einen für die Ausbildung eines Homodimers und zum anderen für die Interaktion mit Gal80, sowie drei Domänen für die transkriptionelle Aktivierung [120] (siehe Anhang **Abbildung 40**). Die DNA-Bindedomäne, ein C6-Zinkfinger, konnte bereits im Komplex mit der DNA-Konsensussequenz kristallisiert werden [121]. Sie besteht aus zwei α -Helices, welche durch sechs Cysteine und zwei Zn^{2+} -Ionen koordiniert werden (**Abbildung 7**). Die Interaktion zur DNA-Konsensussequenz geht dabei von der ersten α -Helix aus [22]. Die 17 bp lange DNA-Konsensussequenz ist aufgebaut aus zwei CGG-Triplets, welche eine 11 bp lange Spacer-Sequenz flankieren [122]. Die DNA-Konsensussequenz von Gal4, an die es als Homodimer bindet, wird auch als UAS_{GAL} (upstream activating sequence) bezeichnet.

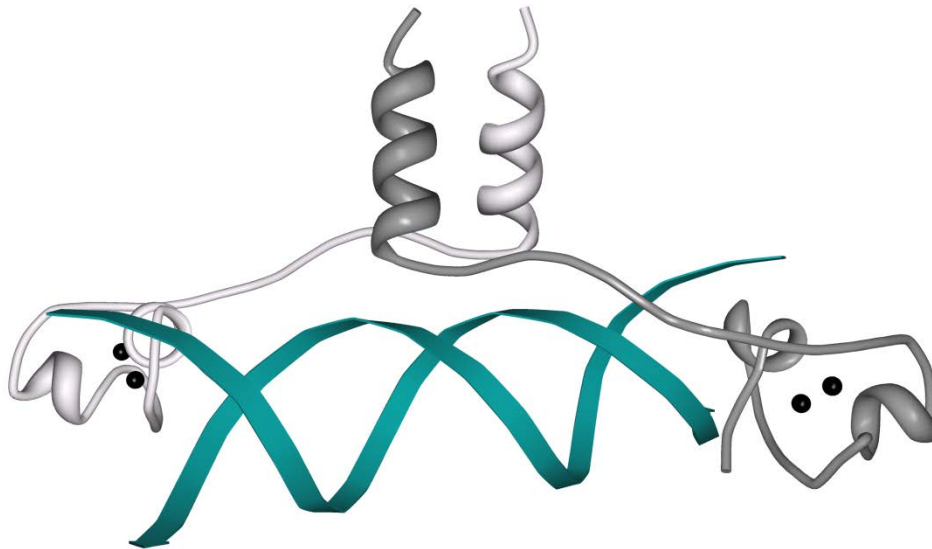


Abbildung 7: Kristallstruktur des Gal4/DNA-Komplexes

Gezeigt ist die Kristallstruktur der Gal4-DNA-Bindedomäne (8 - 64) als Homodimer (ein Monomer dunkelgrau das andere hellgrau) mit der DNA-Konsensussequenz. Die DNA-Bindedomäne von Gal4 hat ein Zink-Finger-Motiv. Zu seiner Ausbildung werden zwei Zinkionen komplexiert [121]. Die Kristallstruktur wird auf PDB unter dem Namen 1D66 geführt.

Die Dimerisierungsdomäne für die Ausbildung eines Homodimers ist zwischen den Aminosäuren 50 - 96 lokalisiert [123] und wurde bereits auch als Kristallstruktur beschrieben [124]. Durch die Ausbildung eines Homodimers wird die Bindung an die DNA erleichtert und die Thermostabilität erhöht [125].

Funktion

Der Gal4-Transkriptionsfaktor reguliert die Expression der Gene der *GAL*-Familie. Die Vertreter dieser Familie (u.a. Gal1, Gal2, Gal7, Gal80, Gal10) sind wichtig für den Metabolismus von Galaktose und Melibiose. In einem Medium mit Glukose ist Gal4 am Promotor der *GAL*-Gene als Homodimer an die DNA-Konsensussequenz gebunden. Die Zahl der Konsensussequenzen unterscheidet sich von Gen zu Gen und ist ein Maß für die Expressionsstärke des Gens (siehe Anhang **Abbildung 41**) [24]. Die Expression der Gene wird reprimiert durch die Bindung von jeweils einem Gal80 an die C-terminale Aktivierungsdomänen des Gal4-Homodimers [23,126-128]. Wenn Glukose durch Galaktose im Medium ersetzt wird bindet Gal3 an Gal80. Dadurch dissoziiert Gal80 von Gal4 und die Transkription der *GAL*-Gene wird aktiviert [23,129].

5. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer globalen *in vivo* Methode zur Studie von Protein-DNA- sowie von Protein-Protein-Wechselwirkungen auf der Grundlage des erweiterten genetischen Codes in *Saccharomyces cerevisiae*. Zu diesem Zweck sollten die zwei photoreaktiven nicht-kanonischen Aminosäuren *p*-Azidophenylalanin sowie *p*-Benzoylphenylalanin positionsspezifisch in Modellproteine eingebaut werden. Nach einer Belichtung mit UV-Licht zu einem definierten Zeitpunkt sollte eine kovalente Quervernetzung zur DNA-Sequenz bzw. einem interagierenden Protein ausgebildet werden. Die entstandenen Komplexe sollten anschließend mit einer geeigneten Methode angereichert, identifiziert und charakterisiert werden. Für die Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen wurde der Transkriptionsfaktor Gal4 und für die Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen das Co-Chaperon Aha1 ausgewählt. Zur Auswahl definierter Positionen für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäuren in der Proteinsequenz sollten die bereits in der Literatur beschriebenen Kristallstrukturen im Komplex mit der DNA-Konsensussequenz bzw. Hsp90 Verwendung finden. Neben der Methodenentwicklung sollte auch die Wirkung der einzelnen Komponenten des erweiterten genetischen Codes auf *S. cerevisiae*, sowie die Möglichkeit einer chemoselektiven Nutzung der nicht-kanonischen Aminosäure *p*-Azidophenylalanin untersucht werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden - wenn nicht anders vermerkt - von folgenden Firmen bezogen: Bio-Rad Laboratories GmbH, München; Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf; BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching; Carl Roth, Karlsruhe; Fermentas GmbH, St. Leon-Rot (jetzt Thermo Scientific); GE Healthcare (Freiburg); Life Technologies GmbH, Darmstadt; Millipore, Schwalbach; Qiagen GmbH, Hilden; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen; Th. Geyer GmbH & Co KG, Renningen; VWR International GmbH (Merck, Fluka), Darmstadt.

Bei Verbrauchsmaterialien oder Chemikalien, die für einen bestimmten Versuch wichtig waren, ist die genaue Bezugsquelle beim entsprechenden Protokoll angegeben. Für die Herstellung von Pufferlösungen und Kulturmedien wurde zweifach deionisiertes Wasser verwendet, das mittels einer Ionentauscher-Anlage der Firma Millipore, Schwalbach hergestellt wurde.

1.2 Antibiotika und Antimykotika

Tabelle 1: Antibiotika und Antimykotika

Substanz	Arbeitskonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nourseothricin	100 µg/ml	Werner Bioagents, Jena
Geneticin (G418)	200 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	300 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe

Quelle für die Nourseothricin-, Geneticin- und Hygromycin B-Konzentration: [38]

1.3 Reaktions-Kitsysteme

Tabelle 2: Reaktions-Kitsysteme

Kit-System	Bezugsquelle
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Dc Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Amsterdam
Focus-FAST Silver Stain	VWR International GmbH, Darmstadt
V5 tagged Protein PURIFICATION KIT	MBL international, Vertrieb durch: BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching
Click-iT® Protein Reaction Buffer Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt

1.4 Pufferlösungen

Die Herstellung von Puffer- und Stammlösungen für allgemeine Methoden erfolgte nach Standardprotokollen [130,131]. Zur Herstellung von Lösungen wurde zweifach-deionisiertes Wasser verwendet. Spezielle, für einen bestimmten Versuch benötigte Pufferlösungen sind unter den entsprechenden Methoden zu finden.

Tabelle 3: Pufferlösungen

Puffer	Bestandteile	Konzentration
PBS-Puffer, pH 7,4	NaCl	140 mM
	KCl	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
PBST-Puffer	PBS-Puffer, pH 7,4	
	Tween 20	0,05 %
TAE-Puffer (50 x)	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	50 mM

1.5 Kulturmedien

Tabelle 4: Kulturmedien für Bakterien und Hefen

Medium	Bestandteile	Konzentration
LB, pH 7,4 (Vollmedium für Bakterien)	Hefeextrakt	5 g/l
	Bacto Trypton	10 g/l
	NaCl	5 g/l
YPD (Vollmedium für Hefen)	Hefeextrakt	10 g/l
	Bacto Pepton (Difco)	20 g/l
	Glukose	20 g/l
SC ^{-TRP/URA} -Glukosemedium	Yeast Nitrogen Base (w/o amino acid and w/o ammonium sulfate)	1,7 g/l
	Ammoniumsulfat	5 g/l
	Glukose	20 g/l
	Ade, Arg, Cys, Leu, Lys, Thr	jeweils 0,1 g/l
	Asp, His, Iso, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val	jeweils 0,05 g/l
SC ^{-TRP/URA} -Galaktosemedium	Yeast Nitrogen Base (w/o amino acid and w/o ammonium sulfate)	1,7 g/l
	Ammoniumsulfat	5 g/l
	Galaktose	20 g/l
	Ade, Arg, Cys, Leu, Lys, Thr	jeweils 0,1 g/l
	Asp, His, Iso, Met, Phe, Pro, Ser, Tyr, Val	jeweils 0,05 g/l

Tabelle 5: Zusätze zu den Medien

Medium	Zusatz	Konzentration
LB Amp, pH 7,4	Ampicillin	100 mg/l
YPD Nou	Nourseothricin	100 mg/l
YPD Gen	Geneticin (G418)	200 mg/l
YPD Hyg B	Hygromycin B	300 mg/l
SC ^{-TRP/URA} -Glukosemedium (plus Gen)	Geneticin (G418)	200 mg/l
SC ^{-TRP/URA} -Galaktosemedium (plus pAzpa)	<i>p</i> -Azidophenylalanin (kann 1 M in 1 M NaOH-Lösung gelöst werden)	0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM und 1 mM
SC ^{-TRP/URA} -Galaktosemedium (plus pAzpa und Gen)	<i>p</i> -Azidophenylalanin Geneticin (G418)	1 mM 200 mg/l
SC ^{-TRP/URA} -Galaktosemedium (plus pBzpa)	<i>p</i> -Benzoylphenylalanin (kann 200 mM in 1 M NaOH-Lösung gelöst werden)	1 mM

1.6 Antikörper und Streptavidin

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

	Name	Verdünnung	Bezugsquelle
primärer	monoklonaler Maus-anti-V5, Klon SV5-PK1 (Best.-Nr. SM1691)	1:5000	Acris, Herford
	monoklonaler Maus-anti-Hsp90, Klon Hyb- K41220A (Best.-Nr. AM03150PU-N)	1:1000	Acris, Herford
	polyklonaler Kaninchen-anti-HA, (Best.-Nr. AP09230PU-N)	1:2000	Acris, Herford
	monoklonaler Maus-anti-Aktin, Klon mAbGEa (Best.-Nr. NB100-74340)	1:1000	Acris, Herford
	monoklonaler Maus-anti-FLAG® M2, Klon M2 (Best.-Nr. F1804)	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis
sekundärer	polyklonaler Schaf-anti-Maus-IgG-HRP (Best.-Nr. NXA931)	1:5000	GE Healthcare, Freiburg
	polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen-IgG-HRP	1:5000	GE Healthcare, Freiburg
	Streptavidin-HRP	1:2000	Invitrogen, Karlsruhe

1.7 Enzyme

Tabelle 7: Verwendete Enzyme

Enzym	Referenz, Bezugsquelle
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Proteinase K	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> DNA Polymerase (isoliert nach Pluthero <i>et al.</i> [132])	L. Schalwyk, ICRF, London

1.8 Plasmide

Beschreibung der Ausgangsplasmide

1.) pYES2/CT

Replikationsursprung: pUC origin und 2 μ origin

Selektion: AmpR und *URA3*

Beschreibung: Zielproteine können entweder unterm *GAL1*-Promotor oder T7-Promotor exprimiert werden. Das Zielprotein wird C-terminal an einen V5-Epitop/6 x His-Tag fusioniert (Anhang Abbildung 48).

Referenz bzw. Bezugsquelle: Invitrogen, Karlsruhe

2.) pYES2/CT(V5); pYES2/CT(HA); pYES2/CT(FLAG);

Beschreibung: Das Ausgangsplasmid ist pYES2/CT. Der Unterschied besteht darin, welches Epitop C-terminal an das Zielprotein fusioniert wird. Das Epitop ist in der Plasmid-Bezeichnung innerhalb der Klammer aufgeführt.

Referenz bzw. Bezugsquelle: diese Arbeit

3.) pAR3-PGK1+3SUP4-tRNA; pBR2-PGK1+3SUP4-tRNA

Replikationsursprung: pUC origin und 2 μ origin

Selektion: AmpR und *TRP1*

Beschreibung: Kodieren beide für jeweils drei Kopien tRNA_{CUA} und die jeweilige Aminoacyl-tRNA-Synthetase für die Beladung der nicht-kanonischen Aminosäure.

pAR3/tRNA_{CUA}: p-Azidophenylalanyl-tRNA-Synthetase (Variante 3)

pBR2/tRNA_{CUA}: p-Benzoylphenylalanyl-tRNA-Synthetase (Variante 2)

Referenz bzw. Bezugsquelle: von Peter G. Schultz zur Verfügung gestellt [54]

Auflistung der hergestellten und verwendeten Plasmide

Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete Plasmide

Plasmid	Abkürzung in der Stammbezeichnung	Referenz, Bezugsquelle
pYES2/CT	A0	Invitrogen
pYES2/CT-GAL4	A1	diese Arbeit
pYES2/CT-GAL4(E8TAG)	A1,8	diese Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

pYES2/CT-GAL4(L19TAG)	A1,19	diese Arbeit
pYES2/CT-GAL4(C21TAG)	A1,21	diese Arbeit
pYES2/CT-GAL4(T50TAG)	A1,50	diese Arbeit
pYES2/CT-GAL4(R51TAG)	A1,51	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1	A6	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1(R59TAG)	A6,59	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1(K60TAG)	A6,60	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1(G61TAG)	A6,61	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1(K62TAG)	A6,62	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1(V63TAG)	A6,63	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1(I64TAG)	A6,64	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1(S65TAG)	A6,65	diese Arbeit
pYES2/CT-AHA1(L66TAG)	A6,66	diese Arbeit
pYES2/CT(V5)	A20	diese Arbeit
pYES2/CT(V5)-AHA1	A21	diese Arbeit
pYES2/CT(V5)-AHA1(R59TAG)	A21,59	diese Arbeit
pYES2/CT(V5)-AHA1(V63TAG)	A21,63	diese Arbeit
pYES2/CT(V5)-AHA1(I64TAG)	A21,64	diese Arbeit
pYES2/CT(HA)	A30	diese Arbeit
pYES2/CT(HA)-AHA1	A31	diese Arbeit
pYES2/CT(HA)-AHA1(R59TAG)	A31,59	diese Arbeit
pYES2/CT(HA)-AHA1(V63TAG)	A31,63	diese Arbeit
pYES2/CT(HA)-AHA1(I64TAG)	A31,64	diese Arbeit
pYES2/CT(FLAG)	A40	diese Arbeit
pYES2/CT(FLAG)-AHA1	A41	diese Arbeit
pYES2/CT(FLAG)-AHA1(R59TAG)	A41,59	diese Arbeit
pYES2/CT(FLAG)-AHA1(V63TAG)	A41,63	diese Arbeit
pYES2/CT(FLAG)-AHA1(I64TAG)	A41,64	diese Arbeit
pAR3-PGK1+3SUP4-tRNA	C1	[54]
pBR2-PGK1+3SUP4-tRNA	C2	[54]
pYM14 (6 x HA-Tag)	300	[38]
pYM17 (6 x HA-Tag)	303	[38]
pYM24 (3 x HA-Tag)	236	[38]
pYM45 (1 x HA-Tag)	257	[38]
pYM-N8 (<i>ADH</i> -Promoter und 3 x HA-Tag)	289	[38]
pYM-N12 (<i>CYC1</i> -Promoter und 3 x HA-Tag)	292	[38]
pYM-N24 (<i>GAL1</i> -Promoter und 3 x HA-Tag)	295	[38]

1.9 Oligonukleotide und Epitopsequenzen

Tabelle 9: Primer zur Amplifikation der genomischen *GAL4*-Sequenz für die anschließende Klonierung

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
GAL4_pYes2CT_for_BamHI	CGGGATCCAAAAATGAAGCTACTGTCTTCTATCG
GAL4_CT_rev_EcoRI	CCGGAATTCCTCTTTTTTTGGGTTTGGTGGGGTA

Tabelle 10: Primer für die *GAL4*-Mutagenese (*QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* Protokoll)

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
g22t_a24g	TGAAGCTACTGTCTTCTATCTAGCAAGCATGCGATATTTGCCG
g22t_a24g_antisense	CGGCAAATATCGCATGCTTGCTAGATAGAAGACAGTAGCTTCA
c55t_t56a_c57g	CATGCGATATTTGCCGACTTAAAAAGTAGAAGTGCTCCAAAGAAAAACCGAA
c55t_t56a_c57g_antisense	TTCCGGTTTTTCTTTGGAGCACTTCTACTTTTTAAGTCGGCAAATATCGCATG
g62a_c63g	TATTTGCCGACTTAAAAAGCTCAAGTAGTCCAAAGAAAAACCGAAGTG
g62a_c63g_antisense	CACTTCGGTTTTTCTTTGGACTACTTGAGCTTTTTAAGTCGGCAAATA
a148t_c149a_t150g	AAAACCAAAGGTCTCCGCTGTAGAGGGACATCTGACAGAAGTG
a148t_c149a_t150g_antisense	CACTTCTGTGATGTGCCCTCTACAGCGGAGACCTTTTTGGTTTTT
a151t_g152a	CCAAAAGGTCTCCGCTGACTTAGGCACATCTGACAG
a151t_g152a_antisense	CTGTCAGATGTGCCTAAGTCAGCGGAGACCTTTTTGG

Tabelle 11: Primer für die *GAL4*-Sequenzierung

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
For451	GCAGCTCATCATGATAACTCCACAA
For901	ATAGATGTTTTTTACTATCAAAATG
For1351	GCAGAAAAAGTCCTATATGTGCAA
For1801	GCTGAGAATAACGAGACCGCACAAAT
For2251	CAACAGCTGCAATCATTAGTGCCAC
Inv2201	TCAATCGATACAGTCAACTGTCTTT

Tabelle 12: Primer für die semiquantitative PCR

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
GAL7for	GATCGTCAGTCAATGCTTGC
GAL7rev	GGTCAACAGGAGGCTGCTTA
GAL7neg_for	GTCTGACAGCAAAGCCCATT
GAL7neg_rev	ATAAGTGGGACCAGTGAGG
ACT1for	TCCGGTGATGGTGTACTCA
ACT1rev	AGCGGTTTGCATTTCTTGTT

Tabelle 13: Primer zur Amplifikation der genomischen *AHA1*-Sequenz für die Klonierung

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
AHA1_BamHI	CGGGATCCATGGTCGTGAATAACCCAAA
AHA1_XbaI	GCTCTAGATAATACGGCACCAAAGCCGAATG

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 14: Primer für die AHA1-Mutagenese (Phusion Site Directed Mutagenesis Protokoll)

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Aha1_P59_Arg	TGTGAAGTTAATCAGTAGAAGGGGAAGGTTATA
revAha1_P59_Arg	ATCACCTTCAATGGACGAAACAGACTTGAT
Aha1_P60_Lys	GAAGTTAATCAGCGTTAGGGGAAGGTTATATCT
revAha1_P60_Lys	ACAATCACCTTCAATGGACGAAACAGACTT
Aha1_P61_Gly	GTTAATCAGCGTAAGTAGAAGGTTATATCTTTG
revAha1_P61_Gly	TTCACAATCACCTTCAATGGACGAAACAGA
Aha1_P62_Lys	AATCAGCGTAAGGGGTAGGTTATATCTTTGTTT
revAha1_P62_Lys	AACTTACAATCACCTTCAATGGACGAAAC
Aha1_P63_Val	CAGCGTAAGGGGAAGTAGATATCTTTGTTTGAT
revAha1_P63_Val	ATTAACCTTACAATCACCTTCAATGGACGA
Aha1_P64_Ile	CGTAAGGGGAAGGTTTAGTCTTTGTTTGATTTG
revAha1_P64_Ile	CTGATTAACCTTACAATCACCTTCAATGGA
Aha1_P65_Ser	AAGGGGAAGGTTATATAGTTGTTTGATTTGAAA
revAha1_P65_Ser	ACGCTGATTAACCTTACAATCACCTTCAAT
Aha1_P66_Leu	GGGAAGGTTATATCTTAGTTTGATTTGAAAATC
revAha1_P66_Leu	CTTACGCTGATTAACCTTACAATCACCTTC

Tabelle 15: Primer für die AHA1-Sequenzierung

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
F-Aha1-303	TAGCGAGGCCTCAAGCTATC
F-Aha1-758	CGAAGCTGGAGACCAAAGAA
R-Aha1-439	GCAAATCCTTGCCAAATTGT
GAL1_Promotor_for	TGAAGAGGAAAAATTGGCAGT
Cyc1_Term_rev	CCCAAAACCTTCTCAAGCAA

Tabelle 16: Primer für das PCR-Tagging Protokoll (N-terminal)

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
S1_AHA1	AGTCTTATTCTTAATCGTTTATAGTAGCAACAATATATCAATATGCCGTACG CTGCAGGTCGAC
S4_AHA1	ATGCAGTTCTTATCGACCCAGTGCCAGTTATTTGGGTTATTCACGACCATCG ATGAATTCTCTGTGCG

Tabelle 17: Primer für das PCR-Tagging Protokoll (C-terminal)

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
S2_AHA1	GTAATATTTACGCATACTTTTATTGAAACATGAGAACAATATATCTTAATC GATGAATTCGAGCTCG
S3_AHA1	CTACGTGCGTTCTATTAATTTGACATTCGGCTTTGGTGCCGTATTACGTACG CTGCAGGTCGAC

Tabelle 18: Epitopsequenzen

Epitopsequenz	Nukleotidsequenz (5' → 3')
Watson-V5	CTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGAT TCTACGTGAGTTT
Crick-V5	AAACTCACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCTTC GAAGGGCCCT
Watson-HA	CTAGAGGGCCCTTCGAATACCCATACGACGTCCCAGACTACGCTTGAGTTT

Crick-HA	AAACTCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTATTCTGAAGGGCCCT
Watson-Flag	CTAGAGGGCCCTTCGAAGATTACAAGGATGACGACGATAAGTGAGTTT
Crick-Flag	AAACTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTTCGAAGGGCCCT

1.10 *Escherichia coli*-Stämme

Escherichia coli Stamm DH5 α :

Genotyp: F-, *endA1*, *hsdR17* (rk-, mk-), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, Δ (*argF-lac*)U169, λ -, ϕ 80*dlacZ* Δ M15

Bezugsquelle: Invitrogen, Karlsruhe.

1.11 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Beschreibung der Ausgangsstämme

1.) INVSc1

Genotyp: *his3* Δ 1/*his3* Δ 1 *leu2*/*leu2* *trp1-289*/*trp1-289* *ura3-52*/*ura3-52*

Referenz, Bezugsquelle: Invitrogen, Karlsruhe

2.) YPH501

Genotyp: *ura3-52*/*ura3-52* *lys2-801*^{amber}/*lys2-801*^{amber} *ade2-101*^{ochre}/*ade2-101*^{ochre}
trp1- Δ 63/*trp1- Δ 63* *his3- Δ 200*/*his3- Δ 200* *leu2- Δ 1*/*leu2- Δ 1*

Referenz, Bezugsquelle: Agilent Technologies, Waldbronn

In dieser Arbeit hergestellte und verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Tabelle 19: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Name in der Stamm-sammlung	Ausgangs-stamm	transfizierte Plasmide	Kassette	Referenz, Bezugsquelle
2I	INVSc1			Invitrogen
2IA0C1	INVSc1	pYES2/CT pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2IA1C1	INVSc1	pYES2/CT-GAL4 pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit

MATERIAL UND METHODEN

2IA1,8C1	INVSc1	pYES2/CT-GAL4(E8TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2IA1,19C1	INVSc1	pYES2/CT-GAL4(L19TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2IA1,21C1	INVSc1	pYES2/CT-GAL4(C21TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2IA1,50C1	INVSc1	pYES2/CT-GAL4(T50TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2IA1,51C1	INVSc1	pYES2/CT-GAL4(R51TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2Y	YPH501		Agilent Technologies
2YA0C1	YPH501	pYES2/CT pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1 pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,59C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(R59TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,60C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(K60TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,61C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(G61TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,62C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(K62TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,63C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(V63TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,64C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(I64TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,65C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(S65TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,66C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(L66TAG) pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6C2	YPH501	pYES2/CT-AHA1 pBR2/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,63C2	YPH501	pYES2/CT-AHA1(V63TAG) pBR2/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA6,64C2	YPH501	pYES2/CT-AHA1(I64TAG) pBR2/trRNA _{CUA}	diese Arbeit
2YA21C1	YPH501	pYES2/CT(V5)-AHA1 pAR3/trRNA _{CUA}	diese Arbeit

2YA21,59C1	YPH501	pYES2/CT(V5)-AHA1(R59TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA21,63C1	YPH501	pYES2/CT(V5)-AHA1(V63TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA21,64C1	YPH501	pYES2/CT(V5)-AHA1(I64TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA31C1	YPH501	pYES2/CT(HA)-AHA1 pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA31,59C1	YPH501	pYES2/CT(HA)-AHA1(R59TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA31,63C1	YPH501	pYES2/CT(HA)-AHA1(V63TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA31,64C1	YPH501	pYES2/CT(HA)-AHA1(I64TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA41C1	YPH501	pYES2/CT(FLAG)-AHA1 pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA41,59C1	YPH501	pYES2/CT(FLAG)-AHA1(R59TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA41,63C1	YPH501	pYES2/CT(FLAG)-AHA1(V63TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2YA41,64C1	YPH501	pYES2/CT(FLAG)-AHA1(I64TAG) pAR3/tRNA _{CUA}		diese Arbeit
2Y236	YPH501		pYM24	diese Arbeit
2Y257	YPH501		pYM45	diese Arbeit
2Y289	YPH501		pYM-N8	diese Arbeit
2Y292	YPH501		pYM-N12	diese Arbeit
2Y295	YPH501		pYM-N24	diese Arbeit
2Y300	YPH501		pYM14	diese Arbeit
2Y303	YPH501		pYM17	diese Arbeit
2Y257A0C1	YPH501	pYES2/CT pAR3/tRNA _{CUA}	pYM45	diese Arbeit
2Y257A6C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1 pAR3/tRNA _{CUA}	pYM45	diese Arbeit
2Y257A6,59C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(R59TAG) pAR3/tRNA _{CUA}	pYM45	diese Arbeit
2Y257A,63C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(V63TAG) pAR3/tRNA _{CUA}	pYM45	diese Arbeit
2Y257A6,64C1	YPH501	pYES2/CT-AHA1(I64TAG) pAR3/tRNA _{CUA}	pYM45	diese Arbeit

2. Methoden

2.1 Kultivierung von *E. coli* und Anlegen von Dauerkulturen

Die Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium bei 37 °C für 16 bis maximal 24 h. Festmedien enthielten eine Endkonzentration von 2 % Agar. Die Selektion nach plasmidkodierter Antibiotikaresistenz erfolgte in Gegenwart von 100 µg/ml Ampicillin. Dauerkulturen wurden in 50 % Glycerin bei -80 °C aufbewahrt.

2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Dauerkulturen

Aus einer *S. cerevisiae*-Flüssigkultur wurden nach 48 h Inkubation bei 30 °C und 160 rpm 2 ml entnommen. Die OD600 lag zwischen 2 und 2,5. Die Zellen wurden anschließend in einem 2 ml Reaktionsgefäß 4 min bei 1523 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 500 µl frischem Kultivierungsmedium resuspendiert und mit 500 µl Glycerin (87 %) versetzt. Nach einem kurzen Vortex-Schritt wurden die Zellen als Dauerkultur bei -80 °C abgelegt.

Induktion der Expression

- pAzpa wurde vor der Zugabe in einer Konzentration von 1 M in 1 M NaOH gelöst
- pBzpa wurde vor der Zugabe in einer Konzentration von 200 mM in 1 M NaOH gelöst
- Inkubationsbedingungen: Im Schüttelschrank bei 30 °C und 160 rpm

Für die Expression der Gal4 Varianten wurden die Zellen aus einer Dauerkultur in SC^{-TRP/URA}-Glukosemedium angeimpft, nach 48 h im 30 °C-Schrank in SC^{-TRP/URA}-Galaktosemedium auf eine OD600 von 0,4 überimpft, pAzpa auf eine Endkonzentration von 1 mM dazugegeben und nach 4 h Inkubation die Quervernetzung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm induziert.

Für die Expression der mutagenisierten Aha1-Varianten wurden die Zellen aus einer Dauerkultur im SC^{-TRP/URA}-Glukosemedium angeimpft, nach 48 h im 30 °C-Schrank ins SC^{-TRP/URA}-Galaktosemedium auf eine OD600 von 1,0 überimpft, pAzpa oder pBzpa

wurde auf eine Endkonzentration von 1 mM dazugegeben und nach 24 h Inkubation wurde die Quervernetzung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm induziert. Abweichungen von diesem Prozedere sind im Ergebnisteil explizit erwähnt.

2.3 Methoden für die Analyse von DNA

2.3.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Stämmen erfolgte nach den Protokollen von Mandel und Higa sowie Cohen *et al.* [133,134].

Vor jeder Transformation wurde ein Aliquot chemisch kompetenter, bei -80 °C gelagerter *E. coli* DH5 α -Zellen auf Eis ca. 30 min aufgetaut. Für einen Transformationsansatz wurden 100 μ l aufgetaute Zellen entweder zu einem 20 μ l Ligationsansatz oder zu 1 μ l einer 1:100 Verdünnung eines Plasmids (Miniprep) im 2 ml Reaktionsgefäß dazugegeben und vorsichtig ohne Blasenbildung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 min auf Eis wurde der Ansatz für 1 min in einem Heizblock bei 42 °C erwärmt (Hitzeschock) und danach für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 μ l LB-Medium wurden die Zellen bei 37 °C für 45 min geschüttelt und anschließend 5 s bei 16.060 x g pelletiert. Vom Überstand wurden 900 μ l abgenommen, in der verbleibenden Flüssigkeit wurde das Zellpellet resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden dann im 37 °C-Schrank über Nacht inkubiert, bis deutliche Kolonien zu sehen waren. Die einzelnen Kolonien wurden auf einer frischen LB-Agarplatte mit 100 μ g/ml Ampicillin vereinzelt und eine weitere Nacht im 37 °C-Schrank inkubiert. Die vereinzelt Klone können sowohl zur Herstellung von Dauerkulturen als auch zur Isolierung von Plasmid-DNA verwendet werden.

2.3.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden *QIAprep Spin Miniprep Kits* von Qiagen verwendet. Bis auf das 100%ige Ethanol, welches dem PE-Puffer zugesetzt werden muss, enthält das Kit alle für die Reaktion benötigten Reagenzien.

Am Vortag der Plasmidisolierung wurde der jeweilige *E. coli*-Stamm in 7 ml LB-Amp

MATERIAL UND METHODEN

Medium (15 ml PP-Röhrchen) angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 3.244 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss daran wurden 250 µl vom P2-Puffer dazugegeben und das Reaktionsgefäß 6-mal invertiert. Nach Zugabe von 350 µl N3-Puffer wurde erneut 6-mal invertiert und das Zellysate für 10 min bei 16.060 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, auf die Säule gegeben, erneut 1 min bei 16.060 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum Waschen der Säulenmatrix wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben, 1 min bei 16.060 x g zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Zentrifugationsschritt wiederholt, um die Säulenmatrix zu trocknen. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, auf die Säulenmatrix 50 µl EB-Puffer gegeben, welcher zuvor 5 min im Heizblock bei 65 °C erwärmt wurde und nach einer Inkubationszeit von 1 min die Plasmid-DNA in einem Zentrifugationsschritt 1 min bei 16.060 x g eluiert. Für eine größere Ausbeute kann der Elutions-Schritt unter Verwendung des Eluates wiederholt werden. Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.3 Präparation genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

DNA-Isolation

- Hefe-Lysepuffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 2 % (v/v) Triton X-100; 1 % (w/v) SDS)
- Roti® -Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), Carl Roth
- TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA)
- Gasperlen mit 0,25-0,5 mm Durchmesser, Carl Roth

Die Isolation von DNA aus *S. cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll von Hoffmann und Winston [135].

Dafür wurden die Zellen 4 min bei 1.072 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit 500 µl H₂O_{mol. biol.} durch vorsichtiges Resuspendieren gelöst, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut pelletiert und der Überstand verworfen. (An dieser Stelle kann das Pellet schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt

werden.) Entsprechend der Pelletgröße wurde ein äquivalentes Volumen an Hefelysepuffer, Glasperlen und Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) hinzupipettiert (jeweils ca. 300 µl). Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei 4 °C. Dabei wurden die Zellen auf der höchsten Einstellung des Vortexers dreimal je 5 min durch Scherkräfte aufgeschlossen. Zwischen den Schritten wurden die Ansätze jeweils 5 min auf Eis gekühlt. Nach dem Aufschluss wurde der Ansatz 10 min bei 16.060 x g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, der klare Überstand unterm Abzug in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 100%igem Ethanol auf 2 ml aufgefüllt und gut durchmischt. Die Fällung der DNA und RNA erfolgte für mindestens 1 h bei -80 °C. Darauffolgend wurde die ausgefallene DNA und RNA bei 16.060 x g 10 min pelletiert, der Überstand abgenommen, das Pellet gleich wieder in 300 µl 1 x TE-Puffer gelöst, mit 3 µl RNase A-Lösung (10 mg/ml) versetzt, der Ansatz mehrmals invertiert und 10 – 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut mit 100%igen Ethanol auf 2 ml aufgefüllt und auf dem Vortexer durchmischt. Die DNA wurde für mindestens 1 h bei -80 °C gefällt und anschließend bei 16.060 x g für 10 min pelletiert. Das so gewonnene DNA-Pellet wurde nach der Abnahme des Überstandes an der Luft getrocknet und entweder in H₂O_{mol. biol.} oder Restriktionspuffer (NEB 2) aufgenommen. Die gelöste DNA wurde bei -20 °C gelagert.

DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dafür wurde das Photometer V-630 von Jasco mit der Nanodrop-Einheit verwendet. Vor der Messung wurden die Proben 1:500 mit H₂O_{mol. biol.} verdünnt.

2.3.4 Transfektion von *S. cerevisiae*

- 10 x Lithiumacetat-Puffer pH 7,5 (1 M Lithium)
- 10 x TE-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA)
- PEG 3350 (Sigma)

1 x TE-Puffer; 1 x LiAc/0,5 x TE-Puffer und 1 x LiAc/40 % PEG-3350 (w/v)/1 x TE-Puffer wurden aus den obigen Stocklösungen hergestellt.

MATERIAL UND METHODEN

S. cerevisiae wurde nach der Lithium-Acetat-Methode transfiziert. Sie wurde zuerst von Ito et al. [136] beschrieben und über Jahre weiter optimiert [137].

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurden 20 ml YPD-Medium mit der jeweiligen *S. cerevisiae*-Kultur angeimpft und 48 h bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die OD600 bestimmt, die Zellen auf eine OD600 von 0,4 in 25 ml frischem YPD-Medium überimpft und für weitere 3 h im 30 °C-Schüttelschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen im 50 ml PP-Röhrchen 2 min bei 1.267 x g pelletiert und in 20 ml 1 x TE-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden erneut 2 min bei 1.267 x g pelletiert, das Pellet in 1 ml 1 x LiAc / 0,5 x TE-Puffer resuspendiert und der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden zu 100 µl Zellsuspension 1 µl Plasmid-DNA und 100 µg fragmentierter Lachssperma-DNA, die zuvor bei 100 °C denaturiert wurde, dazugegeben. Für eine Co-Transfektion von zwei Plasmiden wurden von jedem Plasmid 3 µl hinzupipettiert. Der Ansatz wurde anschließend vorsichtig ohne Blasenbildung resuspendiert, 700 µl vom 1 x LiAc/40 % PEG-3350/1 x TE-Puffer hinzupipettiert und erneut gut resuspendiert. Daraufhin folgte die Inkubation der Reaktionsgefäße für 30 min bei 30 °C im Schüttelschrank bei 160 rpm. Nach der Inkubation wurden 88 µl DMSO zugegeben, resuspendiert und die Hefezellen bei 42 °C für 7 min einem Hitzeschock ausgesetzt. Im Anschluss daran wurden die Zellen 2 min bei 381 x g pelletiert, der Überstand verworfen, in 1 ml 1 x TE-Puffer aufgenommen und erneut pelletiert. Anschließend wurden die Zellen, abhängig von der Pelletgröße, in 50 – 100 µl SC^{-TRP/URA}-Glukosemedium aufgenommen, auf einer Selektionsplatte ausplattiert und über Nacht im 30 °C-Schrank inkubiert. Die Kolonien können nach der Vereinzlung auf Agar-Platten nun als Flüssigkulturen für Experimente und/oder Dauerkulturen angeimpft werden.

2.3.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

QIAquick PCR Purification Kit

Mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* können große DNA-Fragmente bis 10.000 bp angereichert und kleine DNA-Fragmente bis 100 bp, wie Primer oder Restriktionsfragmente, abgereichert werden. Neben den im Kit enthaltenen Reagenzien wird zusätzlich 100%iges Ethanol benötigt.

Der Ansatz, aus dem das DNA-Fragment isoliert werden soll, wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem 5-fachen Volumen PB-Puffer versetzt und durch

Resuspendieren gemischt. Anschließend wird die Probe auf die Säule gegeben, 1 min bei 16.060 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Darauffolgend wurde auf die Säule 750 µl PE-Puffer pipettiert, 1 min bei 16.060 x g zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und die Säule 1 min bei 16.060 x g trocken zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 30 µl EB-Puffer auf die Säule gegeben und 1 min stehen gelassen. Die Elution erfolgte durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 16.060 x g. Um eine höhere Ausbeute zu erhalten, kann das Eluat auf die Säule gegeben und der Elutionsschritt wiederholt werden. Die Eluate wurden bei -20 °C aufbewahrt.

QIAquick® Gel Extraction Kit

Das *QIAquick® Gel Extraction Kit* wurde verwendet, um ein bestimmtes DNA-Fragment nach der PCR oder einem Restriktionsverdau von unerwünschten DNA-Fragmenten größer 100 bp zu trennen. Dafür wurden zuerst die Fragmente in einem 0,8 – 1%igen Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurde das gewünschte DNA-Fragment ausgestochen und aus dem Agarosegel isoliert. Neben den im Kit enthaltenen Reagenzien wurde zusätzlich 100%iges Ethanol und 100%iges Isopropanol benötigt.

Zum ausgeschnittenen Gel-Fragment wurden 450 µl Puffer QG gegeben und das Gelstück wurde ca. 10 min bei 50 °C geschmolzen. Anschließend wurden 150 µl Isopropanol hinzupipettiert, der Ansatz gut gevortext, diese Lösung wurde auf die Säule gegeben, 1 min bei 16.060 x g zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. Auf die Säule wurden danach 750 µl PE-Puffer pipettiert, bei 16.060 x g für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Darauffolgend wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, auf die Säule 30 µl EB-Puffer gegeben und nach einer 1-minütigen Inkubation die DNA 1 min bei 16.060 x g eluiert. Um eine höhere Ausbeute zu erhalten, kann das Eluat auf die Säule gegeben und der Elutionsschritt wiederholt werden. Die Eluate wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.6 Klonierung

Restriktionsverdau

Vor der Klonierung wurde das DNA-Insert und der Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Endkonz. je 0,66 U/ μ l) in einem Volumen von 60 μ l bei 37 °C über Nacht verdaut. Die Restriktionsenzyme wurden am nächsten Tag 20 min bei 65 °C inaktiviert. Die jeweiligen Pufferbedingungen können den Herstellerangaben entnommen werden.

Anschließend wurden die DNA-Inserts mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* und die restriktionsverdauten Vektoren mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit*, nach vorhergehender Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel, aufgereinigt.

Dephosphorylierung des Vektors

Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, muss er zuvor dephosphoryliert werden. Zu den 30 μ l Eluat aus der Gelextraktion wurden 1 μ l Antarktische Phosphatase (Endkonz. 0,1 U/ μ l), 5 μ l Antarktische Phosphatasepuffer (Endkonz. 1 x) dazugegeben und mit $H_2O_{mol.biol.}$ auf 50 μ l Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach 20 min bei 37 °C wurde nochmal dieselbe Menge Antarktische Phosphatase hinzupipettiert und erneut 20 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 70 °C deaktiviert und der Vektor mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* aufgereinigt.

Ligation

Für die Ligation wurden Vektor und DNA-Insert in den Verhältnissen 1:3 und 1:10 (Vektor:DNA) gemischt. Als Negativkontrolle für die Religationsrate des Vektors wurde ein Ansatz ohne DNA-Insert hergestellt. Die Ligation erfolgte unter Verwendung der T4-DNA Ligase (Endkonz. 1 U/ μ l) im T4-DNA Ligase Puffer (Endkonz. 1 x) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l. Die Ligationsansätze wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz für die Transformation in *E. coli* verwendet.

2.3.7 PCR-basierte, positionsspezifische Mutagenese von Plasmiden nach dem *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* Protokoll

- Das Kit enthält alle für die Reaktion erforderlichen Komponenten.

Das *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* Protokoll wurde für die Mutagenese von *GAL4* verwendet.

Primer-Design

Das Primer-Design für die Mutagenese von *GAL4* erfolgte mit der vom Hersteller bereitgestellten Software (siehe unten). Für jedes Codon, welches zum Stopp-Codon TAG mutagenisiert werden sollte, wurden zwei komplementäre Primer entworfen. Primer wurden bei Thermo Hybaid synthetisiert und mit RP-HPLC aufgereinigt. Die Primer wurden auf eine Konzentration von 100 ng/μl mit H₂O_{mol.biol.} rekonstituiert. Eine Phosphorylierung am 5'-Ende war nicht notwendig.

(<https://www.genomics.agilent.com/CollectionSubpage.aspx?PageType=Tool&SubPageType=ToolQCPD&PageID=15>)

Mutagenese-PCR

Tabelle 20: Amplifikationsansatz (*QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis*)

Reagenz	Volumen
10 x Reaktionspuffer	5 μl
pYES2/CT-GAL4	X μl (10 ng)
dNTP-Mix	1 μl
Primer #1 (100 ng/μl)	1,25 μl
Primer #2 (100 ng/μl)	1,25 μl
QuikSolution-Reagenz	3 μl
H ₂ O _{mol.biol.} für ein Endvolumen von 50 μl	X μl

Tabelle 21: Amplifikationsprotokoll (*QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis*)

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95 °C	1 min
18	95 °C	50 s
	60 °C	50 s

MATERIAL UND METHODEN

	68 °C	9 min (ca. 1 min/kb)
1	68 °C	7 min

Verdau parentaler Vektoren und Transformation in XL 10-Gold E. coli-Zellen

Nach der PCR wurden 10 µl von jedem Ansatz im 0,8%igen Agarosegel auf ein vorhandenes Amplicon überprüft. Die parentale, methylierte und hemimethylierte DNA wurde durch die Zugabe von 1 µl *DpnI* bei 37 °C eine Stunde hydrolysiert.

Die Transformation der mutagenisierten Plasmide erfolgte in die ultrakompetente XL 10-Gold *E. coli*-Zellen, welche im Kit enthalten waren. XL 10-Gold Zellen wurden aus dem -80 °C-Schrank auf Eis aufgetaut und für jeden Transformationsansatz à 45 µl im vorgekühltem 15 ml PP-Röhrchen aliquotiert. Anschließend wurden 2 µl β-Mercaptoethanol zu jedem Aliquot dazugegeben, durch leichtes Schütteln gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Während der 10-minütigen Inkubation wurden alle 2 min die Ansätze wie oben beschrieben gemischt. Danach wurden zu jedem Transformationsansatz 2 µl vom *DpnI* verdauten PCR-Ansatz hinzupipettiert, gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 42 °C. Anschließend wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt, 500 µl auf 42 °C vorgewärmtes LB-Medium hinzupipettiert und die Zellen 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Ansätze wurden zweigeteilt, auf LB Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Positive Klone wurden nach einer Sequenzkontrolle des Vektors als Dauerkulturen bei -80 °C gelagert.

2.3.8 PCR-basierte, positionsspezifische Mutagenese von Plasmiden nach dem *Phusion Site-Directed Mutagenesis* Protokoll

Das *Phusion Site-Directed Mutagenesis* Protokoll wurde für die Mutagenese von *AHA1* verwendet. Es wurde nicht das dazugehörige Kit bestellt, da alle für dieses Protokoll benötigten Komponenten standardmäßig im Labor vorhanden sind.

Primer-Design

Anders wie für das *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* Protokoll steht für dieses Protokoll keine Software für das Primer-Design zur Verfügung. Der Mutagenese-Primer

(*forward*-Primer) trägt das Amber Stopp-Codon TAG in der Mitte und wird flankiert von 10 - 15 Nukleotiden. Direkt an das 5'-Ende des *forward*-Primers schließt sich der *reverse*-Primer an. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 65 °C und 72 °C liegen. Primer wurden mit der RP-HPLC aufgereinigt und auf eine Konzentration von 100 µM in H₂O_{mol.biol.} verdünnt.

Phosphorylierung der Primer

Nach der Mutagenese-PCR entsteht ein linearisierter Vektor. Damit er zu einem zirkulären Vektor ligiert werden kann, müssen die Primer vor der Mutagenese-PCR phosphoryliert werden.

Tabelle 22: Phosphorylierungsansatz

Reagenz	Volumen
10 x T4-DNA-Ligasepuffer	5 µl
<i>forward</i> -Primer (100 µM)	1,5 µl
<i>reverse</i> -Primer (100 µM)	1,5 µl
T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)	1 µl
H ₂ O _{mol.biol.} für ein Endvolumen von 50 µl	41 µl

Die Phosphorylierung wurde für 30 min bei 37 °C durchgeführt und anschließend wurde die T4-Polynukleotidkinase bei 65 °C für 20 min inaktiviert.

Mutagenese-PCR

Tabelle 23: Amplifikationsansatz (*Phusion Site-Directed Mutagenesis*)

Reagenz	Volumen
5 x Phusion HF Puffer	10 µl
Primermix aus der Phosphorylierung	8 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
pYES2/CT-AHA1 (10 - 20 ng/µl)	1 µl
Phusion Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{mol.biol.} für ein Endvolumen von 50 µl	29,5 µl

Tabelle 24: Amplifikationsprotokoll (*Phusion Site-Directed Mutagenesis*)

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	98 °C	30 s
30	98 °C	10 s
	65 °C	30 s
	72 °C	3 min 30 s (ca. 30 s/kb)
1	72 °C	10 min

Die Amplikons wurden im Anschluss in einem 0,8%igen Agarosegel überprüft und mit dem QIAquick® *PCR Purification* Kit aufgereinigt.

Ligation

Tabelle 25: Ligationsansatz für die Zirkularisation der Vektoren

Reagenz	Volumen
linearisierter Vektor	20 µl
10 x T4-DNA-Ligasepuffer	3 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
H ₂ O _{mol.biol.} für ein Endvolumen von 30 µl	6 µl

Die Ligation erfolgte für 1 h bei RT. Eine anschließende Aufreinigung ist nicht notwendig.

Verdau parentaler Vektoren und Transformation in DH5α *E. coli*-Zellen

Hydrolysierung parentaler, methylierte und hemimethylierter DNA durch *DpnI*.

Tabelle 26: *DpnI*-Ansatz

Reagenz	Volumen
Ligationsansatz	20 µl
10 x NEB-Puffer	3 µl
<i>DpnI</i> (20 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{mol.biol.} für ein Endvolumen von 30 µl	6,5 µl

Der Restriktionsverdau wurde 1 h bei 37 °C durchgeführt und anschließend wurde *DpnI*

20 min bei 65 °C inaktiviert. Für die Transformation in DH5 α *E. coli*-Zellen wurde der gesamte Restriktionsansatz verwendet. Positive Klone wurden nach einer Sequenzkontrolle des Vektors als Dauerkulturen abgelegt.

2.3.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Semiquantitative PCR zur Auswertung präzipitierter DNA-Fragmente

Mit der semiquantitativen PCR wurde ausgewertet, inwiefern spezifische DNA-Bindesequenzen für den Transkriptionsfaktor Gal4 mit der Chromatin-Immunpräzipitation angereichert werden konnten. Als Positivkontrolle wurde die *GAL7*-Promotorsequenz, als Negativkontrollen die *ACT1*-Sequenz sowie eine *GAL7*-Sequenz, welche über keine Bindestellen für Gal4 verfügt, verwendet.

Tabelle 27: Amplifikationsansatz mit einem Primerpaar (Semiquantitative PCR)

Reagenz	Volumen
5 x Phusion HF Puffer	10 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	1 μ l
<i>forward</i> -Primer (10 μ M)	2,5 μ l
<i>reverse</i> -Primer (10 μ M)	2,5 μ l
präzipitierte DNA	5 μ l
Phusion Polymerase (2 U/ μ l)	0,5 μ l
H ₂ O _{mol.biol.} für ein Endvolumen von 50 μ l	28,5 μ l

Bei der Multiplex-PCR wurden weitere Primerpaare dazugegeben und die Zugabe von H₂O_{mol.biol.} entsprechend angepasst.

Tabelle 28: Amplifikationsprotokoll (Semiquantitative PCR)

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	98 °C	30 s
32	98 °C	10 s
	62 °C	30 s
	72 °C	30 s
1	72 °C	10 min

Zu bestimmten Zyklen (siehe Ergebnisse) wurden 5 μ l entnommen und in 8%igen Polyacrylamidgelen ausgewertet.

MATERIAL UND METHODEN

Amplifikation von Kassetten zur genomischen Inserierung (PCR-Tagging)

Das Primer-Design (siehe Figure 2 in der Originalliteratur) und die Amplifikation der Kassetten für die genomische Inserierung wurde angelehnt an das Protokoll aus Janke et al. durchgeführt [38]. Für die N-terminale Fusionierung der Kasette an das endogene *AHA1* wurde das Primerpaar S1-/S4-AHA1 und die Vektoren pYM-N8, pYM-N12 und pYM-N24 verwendet. Für die C-terminale Fusionierung der Kasette an das endogene *AHA1* kamen das Primerpaar S3-/S4-AHA1 und die Vektoren pYM24, pYM45, pYM14 und pYM17 zum Einsatz.

Tabelle 29: Amplifikationsansatz (PCR-Tagging)

Reagenz	Volumen
5 x Phusion HF Puffer	10 µl
dNTP-Mix (5 mM)	2 µl
Primer 1 (10 µM)	2,5 µl
Primer 2 (10 µM)	2,5 µl
Vektor (aus der Miniprep)	1,5 µl
Phusion Polymerase (2 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O _{mol.biol.} für ein Endvolumen von 50 µl	31 µl

Tabelle 30: Amplifikationsprotokoll (PCR-Tagging)

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	98 °C	30 s
12	98 °C	10 s
	60 °C	30 s
	72 °C	65 s
18	98 °C	10 s
	72 °C	65 s
1	72 °C	10 min

Die Amplikons wurden nach der PCR im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel geschnitten und mit *QIAquick® Gel Extraction Kit* in 30 µl H₂O_{mol.biol.} eluiert. Anschließend wurden 25 µl von der aufgereinigten Kasette für die Transfektion in *S. cerevisiae* verwendet. Die Zellen wurden auf den entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen und vereinzelt.

2.3.10 DNA-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese

- Seakem LE Agarose, Cambrex BioScience (Rockland (USA))
- Ethidiumbromid, Carl Roth (Karlsruhe)
- kleine Gele 7 x 8 cm: für 0,8%ige Gele 0,4 g und für 1%ige 0,5 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer lösen
- große Gele 12 x 14 cm: für 0,8%ige Gele 1,2 g und für 1%ige 1,5 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer lösen
- 6 x DNA-Ladepuffer (0,25 % w/v Bromphenolblau; 0,25 % w/v Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerin)
- 2-log DNA Ladder [100 - 10.000 bp] (New England Biolabs, Frankfurt a.M.)

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine sehr schnelle und zuverlässige Methode um Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufzutrennen. DNA-Fragmente der Größe 1000 – 7000 bp wurden in 0,8%igen und DNA-Fragmente kleiner 1000 bp in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die jeweilige Agarosemenge wurde zum TAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben dazugegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Das Gel wurde in einem Schlitten gegossen. Abhängig von der Gelgröße wurde Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 1:20.000 dazugegeben und der Kamm eingesetzt. DNA-Proben wurden im Verhältnis von 6 zu 1 mit 6 x DNA-Ladepuffer gemischt. Als Größenstandard wurden 10 µl von der 2-log DNA Ladder verwendet. Die Auftrennung der Fragmente in der Elektrophorese-Kammer erfolgte bei 400 mA und je nach Gelgröße bei einer Spannung zwischen 100 – 140 V für 30 - 60 min. Anhand der beiden Farbstoffe im Gel konnte der Stand der Auftrennung ermittelt werden. Die DNA-Fragmente wurden mit UV-Licht (Camilla – High Resolution Digital Camera) visualisiert und digitalisiert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- 8%ige Polyacrylamid-Lösung (30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (37,5:1 w/w); 1 x TAE). Die Lösung wurde sterilfiltriert.
- 10%iges (w/v) APS-Lösung
- TEMED

MATERIAL UND METHODEN

- 6 x DNA-Ladepuffer (0,25 % w/v Bromphenolblau; 0,25 % w/v Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerin)
- 1 x TAE-Puffer
- SYBR Gold

Die Polyacrylamid-Gele wurden mit der Apparatur des PROTEAN II xi Systems gegossen. Für ein 1 mm x 16 cm x 16 cm Gel wurden 28 ml einer 8%ige Polyacrylamid-Lösung mit 28 µl TEMED und 280 µl APS versetzt, durch mehrmaliges Invertieren gemischt, zwischen die Glasplatten gegossen und der Kamm eingesetzt. Eine ausreichende Polymerisation ist nach einer Stunde bei Raumtemperatur erreicht. Anschließend wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit 1 x TAE-Puffer gespült und die DNA-Proben, versetzt mit 6 x DNA-Ladepuffer, in die mit 1 x TAE-Puffer gefüllten Taschen beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 220 V für 1 h und 20 min. Im Anschluss wurden die Gele in 200 ml 1 x TAE-Puffer mit 10 µl SYBR Gold überführt und 30 min bei RT unter leichtem Schütteln gefärbt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit Fuji FLA-5000 Laserscanner (Filter: FITC; Laser: 473 nm).

2.3.11 Veränderung des Epitops im pYES2/CT

Generierung eines alternativen Epitops

Der Watson- und der Crick-Strang der HA-, V5- und Flag-Epitopsequenz wurden von Thermo Hybaid hergestellt. Sie wurden über Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgereinigt. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden in EB-Puffer von Qiagen auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt. Anschließend wurden jeweils 10 µl von der Watson- und Crick-Sequenz plus 20 µl EB-Puffer gemischt und bei 95 °C für 2 min im PCR-Cycler denaturiert. Danach erfolgte eine Abkühlung der Ansätze um jeweils 0,1 °C/s bis zu einer Temperatur von 25 °C. Im Anschluss wurden die Ansätze mit 5 µl 10 x T4-DNA-Ligasepuffer, 4 µl H₂O_{mol.biol.} und 1 µl T4-Polynukleotidkinase auf ein Gesamtvolumen von 50 µl versetzt. Die doppelsträngigen Epitopsequenzen wurden für 30 min bei 37 °C mit der T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und im Anschluss daran wurde das Enzym 20 min bei 65 °C inaktiviert.

Klonierung des alternativen Epitops in den pYES2/CT-Vektor und Fusionierung an AHA1

Der pYES2/CT-Vektor wurde nach Herstellerangaben gleichzeitig mit *PmeI* (0,33 U/ μ l) und *XbaI* (0,66 U/ μ l) 1 h bei 37 °C geschnitten. Anschließend wurde der Vektor im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* aufgereinigt. Zu den 30 μ l Eluat (in H₂O_{mol.biol.}) wurden 5 μ l 10 x Antarktische Phosphatasepuffer, 1 μ l Antarktische Phosphatase (5 U/ μ l) und 14 μ l H₂O_{mol.biol.} dazugegeben und der Vektor 20 min bei 37 °C dephosphoryliert. Danach wurde erneut 1 μ l Antarktische Phosphatase (5 U/ μ l) dazugegeben und der Ansatz wurde für weitere 20 min bei 37 °C der Ansatz inkubiert. Der dephosphorylierte Vektor wurde mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* aufgereinigt und in 30 μ l H₂O_{mol.biol.} eluiert. Im Anschluss wurde der linearisierte Vektor mit dem Insert in einem Verhältnis von 1:3 in einem Gesamtvolumen von 20 μ l ligiert.

Die doppelsträngigen Insert-Nukleotidsequenzen, die in den offenen Vektor kloniert wurden, sind 5' nach 3' folgendermaßen aufgebaut: vier Basen Überhang passend zur der geschnittenen *XbaI*-Schnittstelle im Vektor (*XbaI*-Schnittstelle wurde wieder hergestellt), Linkersequenz wie im ursprünglichen pYES2/CT-Vektor zwischen *XbaI*-Schnittstelle und dem V5-Epitop, das Epitop (V5, HA oder Flag), Stopp-Codon TGA und die ersten 4 Basenpaare der *PmeI*-Schnittstelle (*PmeI*-Schnittstelle wird wieder hergestellt).

2.4 Methoden für die Analyse von Proteinen

2.4.1 Induktion der Quervernetzung

- Petrischalen mit 90 mm Durchmesser, Sarstedt
- Bio-Link BLX 365 Crosslinker, Peqlab
- 312 nm UV-Röhren

Für die Induktion einer Quervernetzung von Gal4 mit der DNA-Konsensussequenz wurden 20 ml Kultur in eine Petrischale gegeben und 5 min mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm belichtet. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 1297 x g pelletiert. Anschließend wurde die DNA aufgeschlossen. Eine Aufbewahrung der Zellpellets vor dem Aufschluss ist bei -80 °C möglich.

Die Quervernetzung zwischen Aha1 und seinem Interaktionspartner wurde mit UV-

MATERIAL UND METHODEN

Licht der Wellenlänge 365 nm für pAzpa und pBzpa induziert. Die quervernetzten Dimere wurden bereits nach 5 min Belichtung beobachtet. Für die größtmögliche Ausbeute an Dimer ist eine längere Belichtung der Zellen von bis zu 2 h notwendig. Die Zellpellets können vor dem Aufschluss bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.4.2 *S. cerevisiae* Proteinaufschluss

Proteinaufschluss mit Glasperlen

- Aufschlusspuffer (200 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100)
- Glasperlen mit 0,25 - 0,5 mm Durchmesser, Carl Roth
- 25 x Protease Inhibitor Cocktail, Roche

Zellen wurden 5 min bei 1.267 x g pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet in einem äquivalenten Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde ein zum Pellet äquivalentes Volumen an Glasperlen dazugegeben und dreimal 5 min im Kühlraum mit dem Vortexer bei maximaler Leistung aufgeschlossen. Zwischen den Vortexschritten wurden die Zellen 3 min auf Eis gekühlt. Die Zellreste wurden in der Kühlzentrifuge bei 4 °C für 10 min und 16.060 x g abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und das Pellet verworfen. Mit den so erhaltenen Überständen können Proteinkonzentrationsbestimmungen, Proteinfällungen, Immunpräzipitationen oder Western Blot-Analysen durchgeführt werden.

Proteinaufschluss mit der Labor-Schwingmühle

Dieser Aufschlussmethode ist vor allem dann interessant, wenn die aufgeschlossenen Proteine in einem Puffer benötigt werden, welcher kein oder nur sehr wenig Detergens enthält und somit mit dem Glasperlen-Aufschluss keine zufriedenstellenden Aufschluss der Zellen zur Folge hätte.

Zellen wurden 5 min bei 1.267 x g pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension langsam in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß getropft, welches mit flüssigem Stickstoff gefüllt war. Das Falcon-Reaktionsgefäß wurde leicht verschlossen und durch kräftiges Schütteln der

Stickstoff entfernt. Die so hergestellten Zellperlen können bei -80 °C aufbewahrt werden. Für den Proteinaufschluss wurden die Zellperlen in einen Teflonbehälter mit einer Woframkarbid-Kugel überführt. Der Teflonbehälter wurde im Vorfeld zuerst mit 0,5%igem Natriumchlorit, danach mit 70%igem EtOH gewaschen und mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Zellen wurden in einer Labor-Schwingmühle (Retsch, Typ MM 200) mechanisch mit einer Schüttelfrequenz von 30/s für 2 min zermahlen. Um einen besseren Aufschluss zu erhalten, wurden die Teflonbehälter erneut in flüssigem Stickstoff gekühlt und weitere 2 min geschüttelt. Das feine Zellpulver wurde anschließend in den jeweiligen Puffer überführt und die Zellreste 10 min bei 4 °C und 16.060 x g abzentrifugiert.

2.4.3 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

- 1%ige SDS-Lösung (w/v)
- 1 M NaOH-Lösung
- 1:4 Chloroform/Methanol-Lösung
- 100%iges Methanol

Die Proteinfällung nach Wessel und Flügge stellt eine schnelle und zuverlässige Methode dar, um sowohl lösliche als auch hydrophobe Proteine aus einer Lösung heraus zu fällen. Dabei spielt die Anwesenheit von Lipiden, Salzen, β -Mercaptoethanol und Detergenzien keine Rolle [138]. Die dazugegebenen Volumina im Protokoll beziehen sich auf das Volumen des Proteinlysats.

Zum Proteinlysats wurde das 5-fache Volumen einer 1:4 Chloroform/Methanol-Lösung dazugegeben, gemischt, anschließend das 3-fache Volumen an $H_2O_{mol.biol.}$ hinzupipettiert, der Ansatz erneut gemischt und 5 min bei 6.093 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt befinden sich die Proteine zwischen zwei flüssigen Phasen. Die obere Phase wurde abgenommen, das 3-fache Volumen an 100%igen Methanol dazugegeben und durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Das Proteinpellet setzte sich ab. Der flüssige Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem 37 °C-Heizblock getrocknet. Das Lösen der Proteine erfolgt je nach Größe der Proteinpellets im entsprechenden Volumen 1%iger SDS-Lösung, welche zuvor mit 1 M NaOH (v/v) auf eine Endkonzentration von 50 mM versetzt wurde. Die Löslichkeit kann durch das Erwärmen auf 65 °C verbessert werden.

2.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry

Die quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem *Dc Protein Assay* von BioRad durchgeführt. Dieses Protokoll basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry [139]. Der wesentliche Vorteil gegenüber der Bestimmung nach Bradford liegt in der Kompatibilität zu vielen Chemikalien wie zum Beispiel Detergens (bis zu 10 % SDS) oder 0,5 M Natronlauge.

Für die Eichgerade wird eine BSA-Stammlösung mit der Konzentration 2 µg/µl benötigt. In sieben 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden 20 µl einer 1%igen SDS-Lösung vorgelegt und sieben unterschiedliche BSA-Konzentrationen (0, 4, 8, 16, 24, 32 und 40 µg) hergestellt. Jeweils 2 µl einer Probe werden in doppelter Ausführung ebenfalls zu 20 µl 1%iger SDS-Lösung pipettiert. Zu jedem Ansatz wurden zuerst 100 µl Reagenz A und 2 µl Reagenz S hinzupipettiert. Die Mischung aus Reagenz A und S lässt sich für mehrere Proben als Mastermix herstellen. Anschließend wurden 800 µl Reagenz B zu jedem Ansatz pipettiert, gemischt und 15 min unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurde die Absorption in 1 ml Küvetten bei 750 nm gemessen. Die Absorption der Proben ist nach den ersten 15 min für eine Stunde stabil.

2.4.5 Immunpräzipitation

Für die Anreicherung des Aha1-Monomers und des quervernetzten Dimers kam das *V5 tagged Protein Purification Kit* von MBL zum Einsatz. Bis auf den Aufschlusspuffer und den 4-fach Laemmli-Puffer enthält es alle für die Präzipitation notwendigen Reagenzien.

Anti-V5 Immunpräzipitation Kit

- 4-fach Laemmli-Puffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; Spatelspitze Bromphenolblau.
Wird zu je 1 ml aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.
- Aufschlusspuffer (200 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100)

Zellen wurden mit dem Aufschlusspuffer aufgeschlossen und 500 µl Proteinlysate auf die

Zentrifugationssäule pipettiert. Die Anti-V5 tag Beads wurden vorsichtig durch „Anschnipsen“ (nicht vortexen) gemischt, 20 µl der Beads wurden zum Proteinlysate dazugegeben, der Deckel draufgeschraubt und für 1 h bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurde der Deckel gelockert, der untere Verschluss entfernt (aufheben) und 15 s mit maximaler Geschwindigkeit (16.060 x g) zentrifugiert. Alle anfallenden Durchflüsse wurden für die Auswertung im Western Blot aufgehoben. Auf die Säule wurden 200 µl Waschlösung gegeben, zentrifugiert und zwei weitere Male wiederholt. Die Säule wurde mit dem Verschluss verschlossen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die Beads in 20 µl V5-Peptidlösung resuspendiert, der Deckel fest draufgeschraubt und der Ansatz 30 min bei RT inkubiert. Das Eluat wurde 15 s bei 16.060 x g abzentrifugiert, die Beads erneut mit 20 µl V5-Peptidlösung versetzt, weiter 5 min bei RT inkubiert und anschließend 15 s bei 16.060 x g abzentrifugiert. Beide Eluate wurden zu einem Eluat gepoolt. Alternativ zu der spezifischen V5-Peptidelution kann auch mit 4-fachem Laemmli-Puffer eluiert werden. Dafür wurden die Beads nach den Waschschritten mit 20 µl 4-fachem Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Eluat 15 s bei 16.060 x g abzentrifugiert. Für die massenspektrometrische Charakterisierung des Monomers reicht die resultierende Menge aus einem IP-Eluat aus. Das Eluat wurde im großen 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, silbergefärbt und die Aha1-Proteinbande auf der Höhe von etwa 48 kDa ausgeschnitten.

Für die massenspektrometrische Charakterisierung des quervernetzten Dimers wurden zehn Immunpräzipitationen durchgeführt. Dabei konnten sechs Immunpräzipitationen gleichzeitig durchgeführt werden. Die Elution erfolgte unspezifisch mit 4-fachem Laemmli-Puffer. Beads in zwei Säulen wurden jeweils mit 50 µl 4-facher Laemmli-Puffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Eluat 15 s bei 16.060 x g abzentrifugiert und auf die nächsten zwei Säulen gegeben. Am Ende wurden die zwei 50 µl Eluate, welche jeweils ein Pool aus fünf IP-Eluaten darstellen, vereinigt. Der Pool aus 10 IP-Eluaten wurde im großen 6%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, silbergefärbt, anschließend die Proteindimerbande auf der Höhe von 100 kDa aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch ausgewertet.

MATERIAL UND METHODEN

Native Co-Immunpräzipitation

- Co-IP-Lysepuffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 x PIC;
- Co-IP-Waschpuffer: 20 mM Tris-HCl, pH7,5; 1 x PIC; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 0,1 % (v/v) Tween 20;

Für die native Co-Immunpräzipitation von Aha1/Hsp90-Komplexen wurden Pufferbedingungen mit einer geringen Salzkonzentration verwendet, aufgrund bereits gezeigter Instabilität dieser Interaktion gegenüber hohen Salzkonzentrationen [96,102]. Zellen wurden mit der Labor-Schwingmühle aufgeschlossen, das Zellpulver im Co-IP-Lysepuffer gelöst und die Zelltrümmer 10 min bei 4 °C und 16.060 x g abzentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl des Überstandes für die Co-IP mit dem *V5 tagged Protein Purification Kit* eingesetzt. Nach insgesamt vier Waschschritten mit dem Co-IP-Waschpuffer wurde spezifisch mit dem V5-Peptid eluiert. Die Eluate wurden mit dem 4-fachen Laemmli-Puffer versetzt und im Western Blot ausgewertet.

2.4.6 Chromatin-Immunpräzipitation

- Ultraschallwandler UW 2200 von Bandelin
- Dynalbeads Protein G, Invitrogen
- Elutionspuffer 1: 1 x PBS mit 1 µg/µl V5-Peptid
- Elutionspuffer 2: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 % (v/v) SDS;
- Proteinase K, Fermentas

Die Expression von Gal4 L19X in Stamm 2YA1,19C1 wurde in SC-Galaktosemedium mit 1 mM pAza für 4 h induziert. Danach wurden die Zellen 5 min mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm belichtet. Die DNA wurde nach dem Protokoll in Kapitel 2.3.3 isoliert. Die präzipitierte DNA wurde in NEB-Puffer 2 aufgenommen. Die Konzentration liegt dabei idealerweise zwischen 3 und 5 µg/µl. Die Fragmentierung der DNA wurde sowohl mit *RsaI* wie auch mit Ultraschall durchgeführt. Für die Fragmentierung von 300 µg DNA wurden 300 Units *RsaI* eingesetzt und für 2 h 45 min bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde *RsaI* bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Die Fragmentierung mit Ultraschall erfolgte im Kühlraum. Der Puls wurde bei einer Power von 20 – 30 % 10 x 10 s durchgeführt. Die Fragmentierung der DNA-Fragmente wurde im Anschluss in einem 1%igen Agarosegel überprüft. Zu der fragmentierten DNA wurden 10 µl von

monoklonalen anti-V5 Antikörper (Konz. 1 µg/µl) pipettiert, der Ansatz mit NEB-Puffer 2 auf 450 µl in 2 ml Reaktionsgefäßen aufgefüllt und über Nacht rotierend im Kühlraum inkubiert. Danach wurden 100 µl Dynalbeads Protein G dazugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Das Waschen der Beads erfolgte 5-mal mit 750 µl 1-fachem PBS-Puffer. Die Beads sind magnetisch und können mit einem Magneten pelletiert werden. Die Elution erfolgte spezifisch mit V5-Peptid wie auch unspezifisch mit Protease K. Bei der spezifischen Elution wurden die Beads in 200 µl Elutionspuffer 1 aufgenommen und bei RT unter leichtem Schütteln 1 h inkubiert. Bei der unspezifischen Elution erfolgte die Elution im Elutionspuffer 2, dabei wurden die Beads in 150 µl Elutionspuffer 2 resuspendiert, mit 79 µg Proteinase K versetzt und 1 h bei 65 °C inkubiert. Nach der Elution wurden 1,85 ml 100%igen Ethanol, 20 µl 3 M NaAc und 7 µl Glykogen dazugegeben und gevortext. Die Fällung der DNA-Fragmente erfolgte über Nacht bei -80 °C. Am nächsten Tag wurde die gefällte DNA bei 16.060 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet, sichtbar durch das Glykogen, wurde in 40 µl H₂O_{mol.biol.} aufgenommen. Die Amplifikation der präzipitierten Fragmente ist im Kapitel 2.3.9 beschrieben.

2.4.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

- 4-fach Laemmli-Puffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 5 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; Spatelspitze Bromphenolblau.
Wird zu je 1 ml aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.
- 4-fach Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS;
- 4-fach Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS;
- 30%-iges Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 37,5 : 1 (Bio-Rad)
- 10%ige (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)
- TEMED (Tetramethylethyldiamin)
- 10-fach Elektrophorese-Puffer: 250 mM Tris; 2 M Glycin; 1 % (w/v) SDS;
- Größenstandard: Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder
- PROTEAN® II xi Cell von Bio-Rad (große Gele)
- SE 250 Mighty Small II von Hoefer (kleine Gele)

Die Vorrichtungen wurden nach Herstellerangaben zusammengesetzt. Nach dem Zusammenbau wurden Markierungen auf der kleinen Glasplatte für den Füllstand des

MATERIAL UND METHODEN

Trenngels angebracht. Bei den kleinen Gelen 3 cm und bei den großen Gelen 4 cm, gemessen von der oberen Kante der kleinen Glasplatte. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach [131,140].

Tabelle 31: Pipettierschema für die Herstellung von zwei kleinen Trenngelen (5 cm x 8 cm x 1 mm)

Acrylamid-/Bisacrylamid-Konzentration	6 %	8 %	10 %	12,8 %	16 %
ddH ₂ O	6,6 ml	5,8 ml	5 ml	4 ml	2,6 ml
Trenngel-Puffer	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
30%ige Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung	2,4 ml	3,2 ml	4 ml	5 ml	6,4 ml
TEMED	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl	14 µl
10%iges APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl

Zusammensetzung für zwei kleine Sammelgele (4%-ig): 3 ml ddH₂O; 1,25 ml Sammelgel-Puffer; 665 µl 30%iger Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung; 5 µl TEMED; 50 µl 10%iges APS.

Tabelle 32: Pipettierschema für die Herstellung von zwei großen Trenngelen (12 cm x 16 cm x 1 mm)

Acrylamid-/Bisacrylamid-Konzentration	6 %	8 %	10 %	12,8 %	16 %
ddH ₂ O	26,7 ml	23,3 ml	20,4 ml	17 ml	10,7 ml
Trenngel-Puffer	12,2 ml	12,2 ml	12,2 ml	12,2 ml	12,2 ml
30%ige Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung	9,7 ml	13,1 ml	16 ml	19,4 ml	25,8 ml
TEMED	56,7 µl	56,7 µl	56,7 µl	56,7 µl	56,7 µl
10%iges APS	405 µl	405 µl	405 µl	405 µl	405 µl

Zusammensetzung für zwei große Sammelgele (4%ig): 6 ml ddH₂O; 2,5 ml Sammelgel-Puffer; 1,33 ml 30%iger Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung; 10 µl TEMED; 100 µl 10%iges APS.

Die Komponenten wurden in einem PP-Röhrchen zusammenpipettiert und durch invertieren gemischt. Anschließend wurde das Trenngel bis zur Markierung zwischen die Glasplatten gegossen, mit wassergesättigtem Isopropanol überschichtet und etwa 1 h auspolymerisiert. Danach wurde das Isopropanol mit Whatman-Papieren abgesaugt,

das Sammelgel gegossen und der entsprechende Kamm eingesetzt. Nach 20 min ist das Sammelgel auspolymerisiert. Der Kamm wurde entfernt und die Taschen mit einfachem Elektrophorese-Puffer ausgespült. Nachdem die Gele in die Elektrophorese-Apparatur eingebaut wurden, wird der einfache Elektrophorese-Puffer in die Beladekammer gefüllt und die Proteinproben in die Taschen beladen. Die Proteinproben wurden zuvor mit 4-fachem Laemmli-Puffer versetzt (Endkonz. muss mindestens einfach sein) und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei kleinen Gelen bei 110 V und bei großen Gelen bei 160 V. Die Stromstärke wurde auf Maximum eingestellt. Der Fortschritt der Auftrennung kann anhand des Größenstandards beobachtet werden. Nach ausreichender Auftrennung wurden die Gele für Western Blot-Analysen oder Proteinfärbungen verwendet.

2.4.8 Detektion von Proteinen im SDS-Gel

Silberfärbung

- *FOCUS-FAST Silver Kit* (G-Biosciences)
- Fixierlösung: 30 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Eisessig
- Waschlösung: 10 % (v/v) Ethanol
- 2 % (v/v) Eisessig
- H₂O_{mol.biol.}

Nach der Elektrophorese wurden die großen Gele für eine Stunde bei RT und leichtem Schütteln in der Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurden zweimal je 10 min in der Waschlösung und dreimal je 10 min mit H₂O_{mol.biol.} gewaschen. *FOCUS-Silver Stain* (10-fach) wurde in H₂O_{mol.biol.} in einem Gesamtvolumen von 50 ml gelöst, 65 µl Sensitizer I zugegeben und darin das Gel 30 min leicht schüttelnd inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit kann der Entwickler vorbereitet werden. Dafür wurden 3 g *FOCUS-Developer* in 100 ml H₂O_{mol.biol.} gelöst und mit jeweils 65 µl Sensitizer I und II versetzt. Nach den 30 min wurde der *FOCUS-Silver Stain* abgegossen, das Gel 20 s mit H₂O_{mol.biol.} gewaschen, abgegossen, die Entwicklerlösung dazugegeben und unter leichtem Schütteln solange entwickelt, bis die gewünschten Banden gut detektierbar waren. Die Entwicklung wurde abgestoppt, indem die Entwicklerlösung abgegossen und eine 2%ige Essigsäure dazugegeben wurde. Nun können die Proteinbanden mit dem Skalpell für die

MATERIAL UND METHODEN

massenspektrometrische Charakterisierung ausgeschnitten oder das Gel in der 2%igen Essigsäure im Kühlraum bei 4 - 8 °C aufbewahrt werden. Das Entfärben der Gelstücke und die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine wurde von der Firma Toplab (Martinsried) durchgeführt.

SYPRO Ruby Färbung

- *SYPRO Ruby* Färbelösung
- *SYPRO Ruby* Fixierlösung: 40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure;
- *SYPRO Ruby* Waschlösung: 10 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure;

SYPRO Ruby ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher an SDS-Protein-Komplexe bindet und mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Dazu wurde das Gel zunächst für 30 min in *SYPRO Ruby* Fixierlösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde es lichtgeschützt in der *SYPRO Ruby* Färbelösung für über Nacht inkubiert und danach für 1 h in *SYPRO Ruby* Waschlösung gewaschen. Die beste Anregung der Fluoreszenz von *SYPRO Ruby* liegt bei 280 nm.

2.4.9 2D-Gelelektrophorese

1. Dimension

- IPG buffer pH 3 – 10 (GE Healthcare)
- 11 cm Immobiline DryStrip pH 3 – 10 (GE Healthcare)
- DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare)
- 1 M DTT-Lösung
- DeStreak Rehydrationspuffer: 3 ml DeStreak Rehydration Solution wurde mit 15 µl IPG buffer pH 3 - 10 versetzt. Kurz vor dem Einsatz wird der benötigten Menge DTT aus der Stammlösung auf eine Endkonz. von 20 mM dazugegeben.
- 20 mM Tris-HCl, pH 7,5

Die Induktion der Aha1 I64X Expression im Stamm 2YA6,64C1 wurde für 24 h in SC-Galaktosemedium mit 1 mM pAzpa induziert. Die eine Hälfte der Kultur wurde 2 h bei 365 nm belichtet. Von den belichteten wie auch unbelichteten Zellen wurden mit je 20 ml Kultur Zellperlen hergestellt. Anschließend wurden jeweils Zellperlen von

belichteten wie unbelichteten Zellen mit der Labor-Schwingmühle aufgeschlossen und das Zellpulver in 1 ml 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 aufgenommen. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 16.060 x g und 4 °C wurde 1 ml Überstand von jedem Aufschluss abgenommen und jeweils zwei Immunpräzipitationen mit dem *V5 tagged Protein Purification Kit* durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 20 µl DeStreak Rehydrationspuffer. Nach jeder Elution wurde nochmals mit dem Eluat nacheluiert. Beide aus einem Überstand resultierende Eluate wurden gepoolt, 2,5 µl davon für Western Blot-Analysen aufbewahrt und der Rest auf 200 µl Gesamtvolumen mit dem DeStreak-Rehydrationspuffer aufgefüllt. Für die isoelektrische Fokussierung wurde die Apparatur IPGphor von Pharmacia Biotech benutzt. Die 200 µl Probe wurden in einen Keramik-Stripholder, welcher vorher mit Stripholder-Detergens gereinigt wurde, pipettiert. Anschließend wurde die Folie von dem 11 cm lange Immobiline DryStrip abgezogen und der DryStrip blasenfrei mit der Gelseite nach unten in den Stripholder reingelegt. Der DryStrip wurde mit 1 ml Paraffinöl überschichtet, der Deckel aufgesetzt und in die Apparatur gestellt. Die Auftrennung erfolgte mit dem in der Tabelle 33 gezeigtem Programm.

Tabelle 33: Programm für die Auftrennung in der 1. Dimension

Schritt	Spannung	Dauer	Einstellung
1.	30 V	12 h	
2.	500 V	1 h	
3.	1.000 V	1 h	Gradient
4.	6.000 V	2 h	Gradient
5.	6.000 V	30 min	
6.	5.000 V	45 min	Step-n-hold
7.	500 V	30 min	Step-n-hold

Ein wichtiger Punkt ist die Summe der erreichten Kilovoltstunden (kVh). In einem Lauf sollten je nach Komplexität der Probe 10.000 - 15.000 kVh erreicht werden. Sind einzelne Proteine in einer Probe stärker vertreten zum Beispiel durch eine Anreicherung, sind mehr kVh notwendig. Nach den ersten 5 Schritten wurden 11.606 kVh (am Gerät abzulesen) und nach den Schritten 6 und 7 insgesamt 15.616 kVh erreicht. Nach der elektrischen Fokussierung wurde das Gerät ausgeschaltet, das Paraffinöl abgetropft und mit der 2. Dimension fortgefahren. Die Gelstreifen können alternativ bei -80 °C aufbewahrt werden.

2. Dimension

- Äquilibrierungspuffer (Stammlösung): 50 mM Tris-HCl, pH 6,5; 6 M Harnstoff; 2 % (w/v) SDS; 30 % (v/v) Glycerin
- Äquilibrierungspuffer 1: Pro DryStrip werden 15 ml Äquilibrierungspuffer plus 300 mg DTT benötigt.
- Äquilibrierungspuffer 2: Pro DryStrip werden 15 ml Äquilibrierungspuffer plus 375 mg Iodacetamid und 200 µl gelöstes Bromphenolblau benötigt.
- 0,5 % (w/v) Agarose im einfachen Elektrophorese-Puffer
- Protean II xi Cell von Biorad

Jeder DryStrip wurde separat zuerst 12 min im Äquilibrierungspuffer 1 und anschließend 12 min im Äquilibrierungspuffer 2 in einer Petrischale inkubiert. Die Auftrennung in der 2. Dimension erfolgte in einem 12%igen und 1,5 mm dicken SDS-Polyacrylamidgel. Das Trenngel wurde bis zu 1 cm unterhalb der kleinen Glasplatte gegossen. Die Plastikenden des DryStrips wurden nach der Äquilibrierung abgeschnitten und der DryStrip genau auf das Trenngel gelegt. Neben dem DryStrip wurde ein 1,5 mm dicker Spacer eingesteckt. Diese Aussparung dient später für die Beladung der Protein-Ladder. Anschließend wurde das Trenngel mit 0,5%igen Agarose überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Kühlraum bei 150 V für 4 h 50 min. Die Gele können nach dem Lauf mit *SYPRO Ruby* gefärbt oder für Western Blot analysiert werden. Auch ist ein Western Blot nach einer vorhergehenden *SYPRO Ruby* Färbung möglich. Dafür wurden die Gele nach der Färbung in einfachem Elektrophorese-Puffer für 30 min bei leichtem Schütteln und RT inkubiert. Anschließend wurden die Gele bei 1,5 mA/cm² für 1 h 30 min geblottet.

2.4.10 Nachweis spezifischer Proteine mit Western Blot-Analyse

- Transferpuffer: 2,5 mM Tris; 19,2 mM Glycin; 12 % (v/v) Methanol;
- Blockierlösung: Magermilchpulver 5 % (w/v) in PBS gelöst
- PBST-Puffer mit 1 % (w/v) BSA
- *ECL Plus Western Blotting Substrate* (Pierce)

Für die Western Blot-Analyse wurden Gesamtproteinmengen von 75 – 100 µg eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurden Proteine aus dem Polyacrylamidgel mittels einer Blotapparatur (TE77X Large Semi-Dry Transfer Unit, Hoefer) auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Porengröße 0,45 µm, Millipore) immobilisiert. Zuerst wurden drei Whatman-Papiere in der Größe des Trenngels in Transferpuffer gewässert und auf die Anode gelegt. Anschließend wurde die PVDF-Membran ebenfalls in der Größe des Trenngels 30 s im 100%igen Methanol benetzt und 2 min im Transferpuffer äquilibriert und auf den Whatman-Papierstapel gelegt. Auf die Membran wurde dann das Trenngel und erneut drei Whatman-Papiere gelegt. Luftblasen wurden aus dem Stapel durch Rollen mit einem zylindrischen Gegenstand entfernt. Der Transfer der Proteine auf die Membran läuft 2 h mit 0,8 mA/cm² ab.

Nach dem Transfer wurde der Stapel abgebaut, die Markerbanden auf der Membran mit einem Kugelschreiber nachgefahren und die freien Bindestellen auf der Membran mit der Blockierlösung 1 h bei RT und leichtem Schütteln geblockt. Alternativ kann das Blocken übers Wochenende im Kühlraum auf einem Schüttler erfolgen. Anschließend wurde die Membran im PBST-Puffer für 10 min gewaschen.

Für die Detektion wurde Antikörper gegen das entsprechende Protein oder Epitop im PBST-Puffer mit 1 % BSA verdünnt und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es ist ausreichend, wenn die Membran leicht bedeckt ist. Die Membran wurde dreimal jeweils 5 min mit PBST gewaschen und für 30 min mit einem sekundären Antikörper, welcher an eine Meerrettichperoxidase konjugiert ist, inkubiert. Die Membran wurde mit dem Luminol Kit (ECL Plus) von Pierce entwickelt. Hierfür wurden für eine kleine Membran 50 µl Reagenz A mit 2 ml Reagenz B gemischt und auf die abgetropfte Membran gegeben. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem Dokumentationssystem LAS-1000 plus von Fujifilm. Abhängig vom Signal wurden unterschiedliche Belichtungszeiten verwendet.

Strippen einer Membran

- Stripping-Lösung: 100 mM NaOH; 2 % (w/v) SDS; 0,5 % (w/v) DTT

Die PVDF-Membran wurde mit der Stripping-Lösung bedeckt und für eine Stunde bei 55 °C leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Stripping-Lösung verworfen und die Membran 3-mal mit PBST gewaschen. Anschließend wurde mit der Blockierung,

wie im Western Blot-Protokoll beschrieben, fortgefahren.

2.4.11 Nachweis von an die DNA gebundenen Gal4 mittels Slot-Blot

- 6-faches SSC: 0,9 M NaCl; 90 mM tri-Natriumcitrat Dihydrat; pH 7,0
- 1 x TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA;
- Nitrocellulosemembran mit einem Porendurchmesser von 0,2 μm und einer Größe von 9 x 12 cm.
- drei Whatman-Papiere (7,7 x 11,3 cm)
- UV Stratalinker 1800 von Stratagene

Der Aufbau des Slot-Blots erfolgte nach den Herstellerangaben (Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus Instruction Manual, BioRad). Vor dem Aufbau wurde die Nitrocellulosemembran 10 min in 6-fachem SSC im Kühlraum inkubiert. Die Whatman-Papiere wurden kurz vorher in 6-fachem SSC gewässert. Luft einschüsse wurden mit einem zylindrischen Gegenstand entfernt und die nicht benötigten Bereiche auf der Membran mit Parafilm abgedeckt. Vor dem Auftragen der Proben in die Slots musste die Membran rehydriert werden. Dafür wurde in jeden Slot 500 μl 1-facher TE-Puffer pipettiert und durch eine Pumpe abgesaugt. Anschließend wurden in die Slots die DNA-Proben mit einer Gesamt-DNA-Menge von etwa 100 μg pipettiert und durch das Absaugen der Flüssigkeit die DNA in der Probe auf die Membran aufgebracht. Es ist darauf zu achten, dass alle Proben ein ähnliches Volumen haben. Nach dem Abbau wurden die Stellen auf der Membran, an denen sich die Proben befinden, markiert und die Membran bei 70 °C auf einem Papiertuch getrocknet. Danach wurde die DNA mit der Nitrocellulosemembran kovalent im Stratalinker quervernetzt (Einstellung: Auto). Anschließend wurde wie in der Western Blot-Analyse beschrieben, angefangen mit dem Blockierschritt für eine Stunde weiterverfahren. Die Detektion der Gal4-Varianten erfolgte mit monoklonalem anti-V5 Antikörper von Invitrogen.

2.4.12 Azid-Alkin-Cycloaddition

- Biotin-Alkin (B10185) von Invitrogen in DMSO, Konzentration 4 mM.
- *Click-iT® Protein Buffer Kit* (C10276) von Invitrogen wurde nach dem Eintreffen wie folgt aliquotiert. Komponente A wurde mit Biotin-Alkin auf eine Endkonz. von 40 μ M versetzt und à 100 μ l aliquotiert. Komponente B wurde à 10 μ l aliquotiert. Komponente C wurde zuerst in 500 μ l $H_2O_{mol.biol.}$ gelöst und à 20 μ l aliquotiert. Komponente D wurde in 540 μ l $H_2O_{mol.biol.}$ gelöst und à 21 μ l aliquotiert. Alle Aliquots wurden bei -20 °C gelagert.
- 50 mM Tris-HCl pH 8,0
- *V5 tagged Protein Purification Kit*, MBL
- 10 % (w/v) SDS

Mit der Azid-Alkin-Cycloaddition wurde ein Biotin-Alkin Molekül an die Azidogruppe von Aha1 I64X gebunden. Zellen aus 20 ml SC-Galaktosemedium mit 1 mM pAzpa wurden nach 2 h Induktion der Aha1-Expression für 5 min bei 1.267 x g pelletiert, Zellperlen hergestellt und mit der Labor-Schwingmühle aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zellpulver in 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen und die Zellreste 10 min bei 16.060 x g und 4 °C abzentrifugiert. Mit 500 μ l wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Elution erfolgte mit V5-Peptid. Zwei Aliquots à 2,5 μ l vom Eluat wurden als Input aufbewahrt und zu den restlichen 35 μ l wurde SDS auf eine Endkonzentration von 0,75 % zugegeben. Zu diesem Ansatz wurden 25 μ l $H_2O_{mol.biol.}$, 100 μ l Komponente A dazugegeben und für 5 s gevortext. Danach wurden 10 μ l Komponente B dazugegeben und ebenfalls 5 s gevortext. Anschließend wurden 20 μ l von der Komponente C dazugegeben, 5 s gevortext und für 2,5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 20 μ l Komponente D wurde der Ansatz 20 min bei RT gevortext. Die Proteine wurden nach Wessel und Flügge gefällt. Hierbei wurde die obere Phase nicht komplett abgenommen und 1 mm Überstand belassen. Danach wurden 450 μ l 100 % Methanol dazugegeben und der Ansatz 5 min bei 16.060 x g zentrifugiert. Überstand wurde komplett abgenommen und das Pellet (kaum sichtbar) in 25 μ l 4-fachem Laemmli-Puffer gelöst. Die Proben wurden im Western Blot mit Streptavidin-HRP und anti-V5 Antikörper ausgewertet.

2.4.13 Staudingerligation

Durchführung der Staudingerligation

- Protease Inhibitor Cocktail (PIC) ohne EDTA
- DyLight 550-Phosphine, Pierce (wird in DMSO 10 mM gelöst)
- *V5 tagged Protein Purification Kit*, MBL

Mit der Staudingerligation wurde ein Fluoreszenz-Molekül an die Azidogruppe von Aha1 I64X gebunden. Zellen aus 10 ml SC-Galaktosemedium mit 1 mM pAzpa wurden nach 2 h Induktion der Aha1-Expression für 5 min bei 1.267 x g pelletiert, zweimal mit je 1 ml PBS pH 7,4 gewaschen, Zellperlen hergestellt und mit der Labor-Schwingmühle aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zellpulver in 1 ml PBS pH 7,4 plus PIC ohne EDTA aufgenommen und die Zellreste 10 min bei 16.060 x g und 4 °C abzentrifugiert. Im Anschluss wurde 1 ml Überstand abgenommen und mit 10 µl 10 mM DyLight 550-Phosphine Lösung auf eine Endkonzentration von 100 µM versetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Schüttler für 3 h bei 37 °C. Danach wurde mit 500 µl eine Immunpräzipitation durchgeführt. Es wurde mit 4-fachem Laemmli-Puffer eluiert. Die restlichen 500 µl wurden nach Wessel und Flügge gefällt.

Fluoreszenzaufnahme

Die Fluoreszenz im SDS-Polyacrylamidgel wurde mittels Fuji FLA-5000 mit den Einstellungen: Filter Cy3; Laser 532 nm; Pixelgröße 50 µm; Intensität 650; detektiert.

2.5 Datenbanken und Datenverarbeitung

- Die in dieser Arbeit verwendeten Gen- und Proteinsequenzen für *S. cerevisiae* entstammen der Saccharomyces Genome Database (SGD) (<http://www.yeastgenome.org/>). Gensequenzen anderer Spezies entstammen der Datenbank National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) und Proteinsequenzen anderer Spezies entstammen der Datenbank Universal Protein Resource (UniProt) (<http://www.uniprot.org/>).
- Die in dieser Arbeit gezeigten Kristallstrukturen von Proteinen entstammen der freien Proteindatenbank PDB (Protein Data Bank) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Für die farbliche Anpassung der Kristallstrukturen, die Visualisierung von einzelnen Aminosäuren und Export der Grafik wurde der „Protein Workshop Viewer“ von PDB verwendet.
- Homologievergleiche zweier Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen erfolgten mit Hilfe des Programmes „BLAST 2Sequences“ [141]. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>).
- Homologievergleiche mehrerer Sequenzen erfolgten mittels des Programmes „ClustalW2“ [142] (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>).
- Auswertung von Proteinsequenzen zur Ermittlung von Molekulargewicht oder isoelektrischen Punkts erfolgte mit dem Programm „Pepstats“ (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/).
- Für die Übersetzung der DNA-Sequenz in die Proteinsequenz wurde das Programm „Transeq“ verwendet. (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)
- Die Analyse von DNA-Sequenzen hinsichtlich geeigneter Oligonukleotidsequenzen für die PCR erfolgte mit Hilfe des „Primer3“-Programmes des Whitehead Institute for Biomedical Research (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).
- DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms „Clone Manager 9“ (Scientific & Educational Software) für die Restriktionsanalyse untersucht.
- DNA-Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC Biotech, Konstanz, durchgeführt.

ERGEBNISSE

1. Etablierung einer Methode zur Studie und Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in *S. cerevisiae*

In den letzten Jahren ist ein rasanter Fortschritt im Bereich der Proteomforschung gelungen. Dafür verantwortlich sind vor allem die ständigen Verbesserungen der Massenspektrometer, neue Ansätze in der Probengenerierung und die Fortschritte in der bioinformatischen Auswertung der generierten Daten [143]. Dadurch ist es möglich die Expressionslevels von mehreren tausend Proteinen in einem Experiment zu identifizieren und zu quantifizieren. Ein möglicher Ansatz ist zum Beispiel der Vergleich der Expression von Proteinen in einer Bedingung, mit der Expression der Proteine in einer anderen Bedingung. Daraus können dann Proteine abgeleitet werden, welche charakteristisch für einen bestimmten Zelltyp bzw. Zellzustand sind. Die Proteine in der Zelle liegen jedoch nicht isoliert vor, sondern sie interagieren mit anderen Proteinen. Das können Interaktionen sein, bei denen ein Protein als Cofaktor ein anderes bindet, dessen Konformation verändert und so seine enzymatische Aktivität aktiviert oder verstärkt, bis hin zu koordinierten Protein-Protein-Wechselwirkungen, wodurch komplexe regulatorische Netzwerke wie Signaltransduktionskaskaden entstehen. Diese Information wird durch Expressionsprofile nicht erfasst. Um die molekulare Anatomie einer Zelle zu verstehen, sind Methoden zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen unentbehrlich. Das Interaktom von *S. cerevisiae* wurde anfangs zum großen Teil mit Hilfe der Yeast Two-Hybrid Methode erforscht [2,144]. Später kamen auch „High-Throughput“-Verfahren hinzu, wodurch eine Fülle von Daten generiert wurde [145]. Diese Studien haben einen großen Beitrag zum Verständnis des Interaktoms von *S. cerevisiae* geleistet. Dennoch sind wir noch weit davon entfernt, das gesamte Bild im Detail zu verstehen. Dafür bedarf es neuer, innovativer Methoden, welche die Möglichkeit bieten, die Wechselwirkungen *in vivo* zu studieren und die an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren zu charakterisieren. Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine Methode zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen zu etablieren, mit der eine detaillierte Beschreibung der Wechselwirkungen eines Zielproteins möglich ist. Dabei soll das Zielprotein so gering wie möglich verändert werden und es möglich sein einzelne Bereiche und Domänen des Proteins auf Interaktionen in seiner natürlichen

Umgebung zu analysieren. Eine weitere wichtige Zielsetzung dieser Methode ist die Erfassung von transienten Interaktionen unter den jeweiligen definierten Bedingungen.

Die dabei verfolgte Strategie ist in einer vereinfachten schematischen Darstellung in der **Abbildung 8** gezeigt. Als Modellprotein wurde Aha1, ein Co-Chaperon von Hsp90, gewählt. Unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes wurde die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa in die beschriebene Interaktionsdomäne von Aha1 mit Hsp90 eingebaut [96].

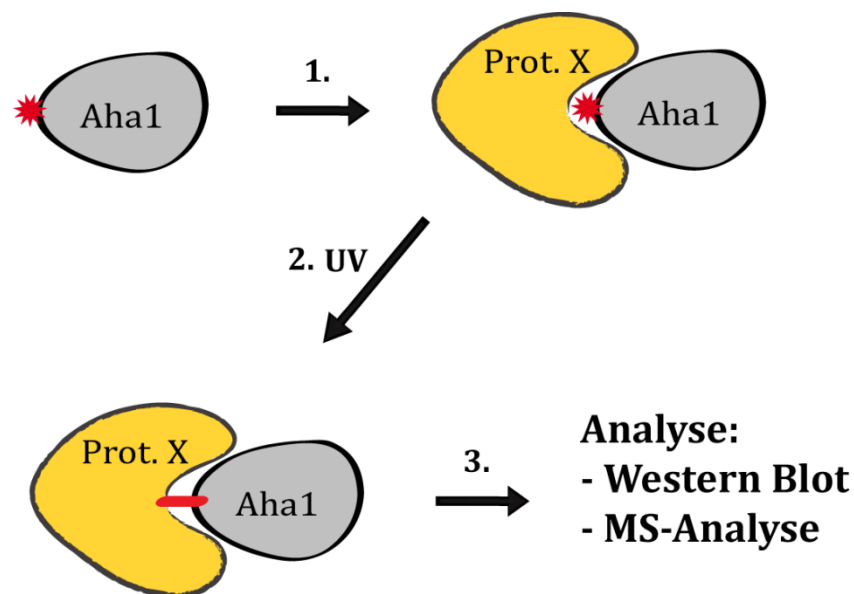


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Strategie zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen

1. Unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes wird das Aha1-Protein in *S. cerevisiae* mit pAzpa an einer definierten Position innerhalb einer bestimmten Interaktionsdomäne exprimiert (roter Stern). Dieses Aha1 soll sich *in vivo* wildtypisch verhalten und über die Interaktionsdomäne mit anderen Proteinen, hier das Hsp90, interagieren. **2.** Zu einem bestimmten Zeitpunkt werden die Zellen mit UV-Licht belichtet. Es entsteht eine kovalente Bindung zwischen Aha1 und seinem Interaktionspartner. Die funktionelle Gruppe der unnatürlichen Aminosäure pAzpa muss dabei in räumlicher Nähe und in optimaler Orientierung zum Interaktionspartner sein. **3.** Anschließend soll das Dimer immunologisch angereichert und mit Hilfe der Massenspektrometrie charakterisiert werden.

Aha1 wurde unter der Kontrolle des Galaktose-induzierbaren *GAL1*-Promotors, auf einem 2 μ Plasmid exprimiert und ist C-terminal an ein V5-Epitop/6 x His-Tag fusioniert, um es immunologisch detektieren bzw. anreichern zu können. Nach der Induktion der Expression im SC-TRP/URA-Galaktosemedium und Zugabe von 1 mM pAzpa, wurden die

ERGEBNISSE

Zellen nach 24 h Inkubation im 30 °C-Schüttelschrank mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm für 2 h belichtet. Dadurch sollte eine kovalente Bindung zwischen Aha1 und dem erwarteten Interaktionspartner Hsp90, vermittelt durch die Azidogruppe, induziert werden. Die Azidogruppe muss dabei, im Falle einer Wechselwirkung, in räumlicher Nähe und korrekter Orientierung zum Interaktionspartner sein. Um die Wahrscheinlichkeit für dieses Ereignis zu erhöhen, wurden für den Einbau von pAzpa innerhalb der Interaktionsdomäne acht Positionen (Position 59 bis einschließlich Position 66) gewählt. Im Anschluss daran wurden die Proteine im Western Blot analysiert, ob ein zusätzliches Signal neben dem Aha1-Signal im höhermolekularen Bereich erscheint. Dieses quervernetzte Dimer sollte dann immunologisch angereichert und die Interaktionspartner mit Hilfe der Massenspektrometrie eindeutig bestimmt werden.

Neben der Bestätigung der Interaktion zwischen Aha1 und Hsp90, ausgehend von der in der Literatur beschriebenen Interaktionsdomäne, sollten auch die einzelnen Schritte dieser neuen Methode näher charakterisiert werden. Dazu gehörten Fragestellungen wie: Welchen Einfluss hat das orthogonale Pärchen und die nicht-kanonischen Aminosäuren auf das Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae*? Zu welchem Zeitpunkt nach der Induktion können die ersten Dimere induziert werden? Kann durch längere Belichtungszeit die Ausbeute an quervernetztem Dimer erhöht werden? Ist es möglich die eingesetzte Aminosäuremenge von der in der Literatur beschriebenen 1 mM Konzentration zu reduzieren? Kann das Dimer mit beiden in dieser Arbeit verwendeten nicht-kanonischen Aminosäuren quervernetzt werden?

1.1 AHA1-Mutagenese

Für die Etablierung der in dieser Arbeit beschriebenen Methode ist Aha1 aus folgenden Gründen ein ideales Modellprotein. Aha1 ist unter normalen Bedingungen ein konstitutiv exprimiertes Protein, ist im Zytoplasma lokalisiert und mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa sehr gut für viele molekularbiologische Analyseverfahren geeignet [11,102]. Seine Überexpression unter einem starken Promotor wie *GAL1* führt nicht zu Wachstumsdefiziten [106]. Auch konnte in unterschiedlichen Studien keine negative Auswirkung der C-terminalen Fusionierung eines Epitops beobachtet werden [108,109]. Für die Auswahl der Positionen, an die

anstatt der kanonischen die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa eingebaut werden sollte, wurde die Kristallstruktur zwischen der N-terminalen Aha1-Domäne (N-Aha1: Aminosäuren 1 – 153) und der mittleren Hsp90-Domäne (M-Hsp90: Aminosäuren 273 – 530) verwendet [96,97]. Die **Abbildung 9A** zeigt diese Kristallstruktur. Aha1 ist in grau und der Bereich für den Einbau von pAzpa in rot dargestellt. Dieser Bereich liegt in einer flexiblen Schleife, welche zwei β -Faltblätter verbindet. Die Aminosäuren 64 und 66 sind direkt an der Interaktion zu Hsp90 beteiligt [96,97].

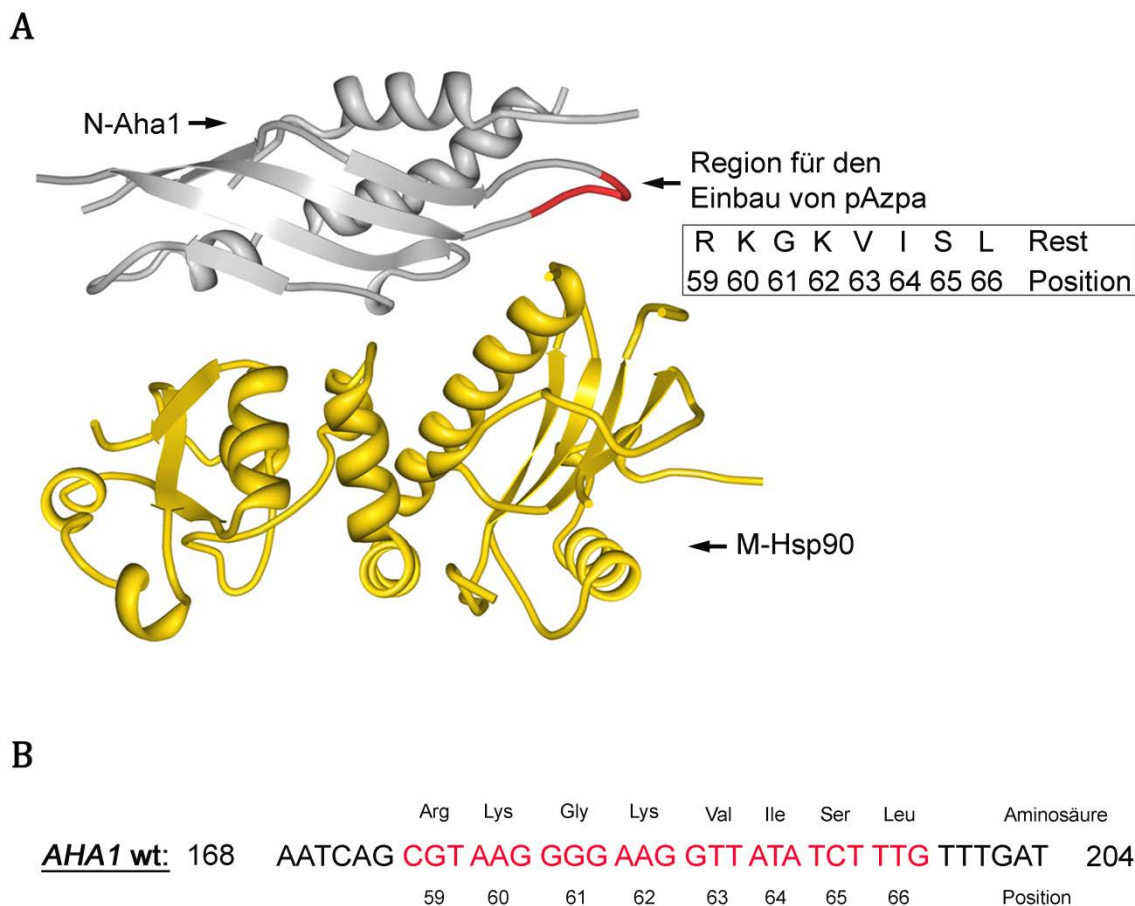


Abbildung 9: Aha1/Hsp90 Kristallstruktur und die Region im Aha1-Protein für den Einbau von pAzpa

A: Zu sehen ist die Interaktion zwischen der N-terminalen Domäne von Aha1 (N-Aha1: Aminosäuren 1 - 153) und der mittleren Domäne von Hsp90 (M-Hsp90: Aminosäuren 273 - 530) anhand einer Kristallstruktur. Die Region in Aha1 für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa ist rot hervorgehoben. An jede der einzelnen Aminosäurepositionen 59 - 66 wurde pAzpa eingebaut und das Quervernetzungsereignis zum Interaktionspartner überprüft. Die Kristallstruktur wird auf PDB unter dem Namen 1USU geführt [96].

B: Gezeigt ist die wtAHA1-Nukleotidsequenz (nt 168 - 204). Acht Codons, die für kanonische Aminosäuren an den Positionen 59 - 66 kodieren, wurden jeweils einzeln zum Stopp-Codon TAG mutagenisiert.

ERGEBNISSE

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, ein quervernetztes Dimer zu erhalten, wurden acht Positionen (59 – 66) ausgewählt. Aus der **Abbildung 9B** können die Codons für jede dieser Positionen und die resultierenden kanonischen Aminosäuren abgelesen werden. Pro Mutagenese-Ansatz wurde jeweils ein Codon nach dem „*Phusion Site-Directed Mutagenesis*“-Protokoll zum Amber-Stopp-Codon mutagenisiert und die Sequenz mit einer Sequenzierung überprüft. Ein Plasmid mit der nicht mutagenisierte Aha1-Sequenz wurde als Kontrolle bei den folgenden Experimenten verwendet (Aha1 wt). Die so hergestellten Plasmide wurden anschließend jeweils einzeln mit dem Plasmid pAR3/tRNACUA oder pBR2/tRNACUA, welches für das orthogonale Pärchen kodiert, in *S. cerevisiae* co-transfiziert [146].

1.2 Expression des Aha1-Fusionsproteins in Abhängigkeit von pAzpa

Die Zellen wurden aus einer Glukosevorkultur in SC-Galaktosemedium auf eine OD600 von 1,0 angeimpft, anschließend mit pAzpa auf eine Endkonzentration von 1 mM versetzt und 24 h bei 30 °C im Schüttler (160 rpm) inkubiert. Die Expression des Aha1-Fusionsproteins aus dem 2 µ Plasmid erfolgte unter der Kontrolle des durch Galaktose stark induzierbaren *GAL1*-Promotors. Die Konzentration von 1 mM pAzpa wurde aufgrund besserer Vergleichbarkeit zu anderen Studien, welche diese Konzentration als Richtwert angeben, ausgewählt [54,77,80]. Die **Abbildung 10** zeigt das Ergebnis für die Expression des Aha1-Fusionsproteins mit und ohne pAzpa in einem Western Blot (Auswertung mit anti-V5 Antikörper).

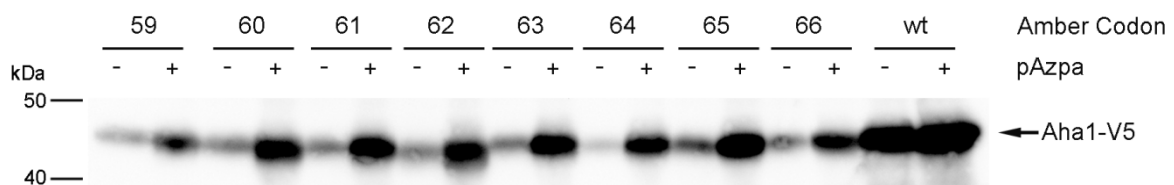


Abbildung 10: Expression der Aha1-Varianten in Abhängigkeit von pAzpa

Detektion der pAzpa abhängigen Aha1-Expression im Western Blot mittels anti-V5 Antikörper. Die Zugabe der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa zum Medium führte zur Suppression des Stopp-Codons TAG und der damit verbundenen Expression des mutagenisierten Aha1-Proteins. Ohne die Zugabe von pAzpa konnte eine schwächere Hintergrundsuppression beobachtet werden. Aha1 wt diente als Kontrolle und wurde unabhängig von pAzpa stark exprimiert. Das von der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht von Aha1 wt beträgt ca. 43 kDa.

Für alle untersuchten Positionen wurde das Aha1-Fusionsprotein in Abhängigkeit von pAzpa exprimiert. Ohne die Zugabe von pAzpa war ein schwächeres Signal für Aha1 zu beobachten. Dies deutet auf eine Suppression mit einer kanonischen Aminosäure hin. Aha1 wt wurde unabhängig von der nicht-kanonischen Aminosäure stark exprimiert.

1.3 Nachweis der Azidogruppe im Aha1-Fusionprotein

Um die Photolyse der Azidogruppe der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa zu vermeiden, erfolgte die Kultivierung der Stämme in lichtgeschützten Erlenmeyerkolben. Gegenüber den meisten Puffern und Lösungen ist die Azidogruppe inert. Ob und wie lange diese Gruppe und pAzpa selbst im Zytoplasma stabil sind, ist unklar. So könnte die Aminosäure katabolisiert werden oder die Azidogruppe nach dem Einbau in Aha1 abreagieren, wodurch sie für die Quervernetzungsversuche nicht mehr zur Verfügung stehen würde. In einem Versuch, in dem die Zellen 1 Woche im SC-Galaktosemedium mit pAzpa kultiviert wurden, konnte nur noch eine geringe Expression von Aha1 R59X beobachtet werden. Eine Quervernetzung dieses Proteins war nicht mehr möglich (Daten nicht gezeigt). Um die Reaktivität der Azidogruppe nach einer 24-stündigen Inkubation zu prüfen, wurde chemisch über die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition ein Biotin und mit Hilfe der Staudingerligation ein Fluoreszenzfarbstoff an Aha1 I64X gekoppelt. Gleichzeitig konnten auch Erkenntnisse über die Stabilität der Gruppe nach Zellaufschluss, Proteinfällung und Immunpräzipitation gewonnen werden.

1.3.1 Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition

Die Azid-Alkin-Cycloaddition ist auch unter dem Namen 1,3-dipolare Cycloaddition oder Klick-Chemie bekannt. Der Mechanismus wurde zuerst von dem deutschen Chemiker Rolf Huisgen beschrieben. Hierbei reagiert ein 1,3-Dipol mit einem Dipolarophil (System mit Mehrfachbindung) zu einem 5-gliedrigen Heterocyclen (stabile Triazolbindung). Als 1,3-Dipol fungieren mesomeriestabilisierte Verbindungen, wie z. B. Azide. Die klassische Azid-Alkin-Cycloaddition ist zeitintensiv und erfordert das Zuführen von Wärmeenergie. Die Entdeckung der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition hat stark zum Erfolg dieser Methode als Kopplungsverfahren für Biomoleküle beigetragen. Durch das Kupfer

ERGEBNISSE

ist eine schnelle Umsetzung bei Raumtemperatur in wässrigen Puffern möglich. Zudem kommt für die Biokonjugation als Vorteil hinzu, dass natürliche Substrate praktisch keine Azid- oder Alkingruppen tragen und die Methode dadurch bioorthogonal ist [70,73,147].

Für den Nachweis der Azidogruppe am Aha1 I64X wurde mit Hilfe der Kupfer-katalysierten Cycloaddition ein Biotin-Alkin-Molekül an das Aha1 I64X konjugiert. Dafür wurde Aha1 I64X exprimiert und mittels V5-Tag angereichert. Dadurch wurden die natürlich vorkommenden biotinylierten Proteine abgereichert. Das Eluat wurde anschließend für die Biotinylierung verwendet. Als Negativkontrollen im Western Blot dienten zum einen das nicht biotinylierte Eluat und zum anderen Aha1 wt. Aha1 I64X konnte präzipitiert und biotinyliert (Spur 4 in **Abbildung 11**). Hier ist ein deutliches Signal zwischen 40 und 50 kDa zu erkennen. Für die beiden Negativkontrollen konnte kein biotinyliertes Protein detektiert werden (Spur 2 und 3 in **Abbildung 11**). Als Positivkontrolle für das Vorhandensein von Aha1 I64X und Aha1 wt im Eluat wurden dieselben Proben wie in den Spuren 2 und 4 im Gel ein zweites Mal aufgetrennt und mit anti-V5 Antikörper ausgewertet (Spur 5 und 6 in **Abbildung 11**). Das mit anti-V5 Antikörper detektierte Aha1 läuft auf derselben Höhe wie das biotinylierte Aha1 I64X in Spur 4 (Membran wurde nach dem Bloten entlang des Markers geteilt und mit unterschiedlichen Antikörpern ausgewertet).

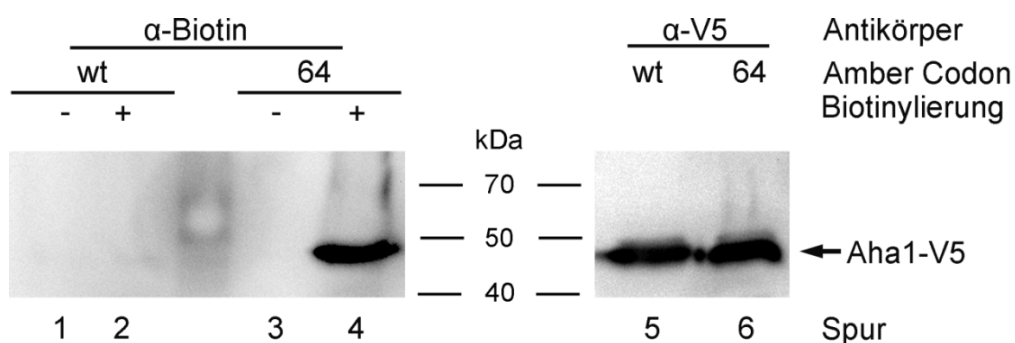


Abbildung 11: p-Azpa-abhängige Biotinylierung von Aha1 an der Position 64

Aha1 I64X und Aha1 wt wurden aus Zelllysaten immunologisch präzipitiert, mit Hilfe der Azid-Alkin-Cycloaddition biotinyliert (**Spur 2** und **4**) und anschließend im Western Blot mit Streptavidin-HRP analysiert. **Spur 4** zeigt, dass in Abhängigkeit von pAzpa an der Position 64 das Aha1 I64X erfolgreich biotinyliert wurde. Das Aha1 wt konnte dagegen nicht biotinyliert werden (**Spur 2**). **Spuren 1** und **3** waren die Kontrollen ohne Biotinylierung für die Detektion von zellulären, biotinylierten Proteinen. Die **Spuren 5** und **6** sind im selben Western Blot analysierte Aliquots der Proben aus den **Spuren 2** und **4** mit anti-V5 Antikörper.

Mit der Kupfer-abhängigen Azid-Alkin-Cycloaddition konnte die reaktive Azidogruppe im Aha1 I64X nach 24-stündiger Expression nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass die Azidogruppe sehr stabil ist. Bis zur Biotinylierung wurde *S. cerevisiae* aufgeschlossen und Aha1 I64X angereichert. Dabei war die Azidogruppe ständig wechselnden Pufferbedingungen ausgesetzt.

1.3.2 Staudingerligation

Die Kupfer-abhängige Azid-Alkin-Cycloaddition ist eine einfach ausführbare und zuverlässige Methode. Doch gerade die Verwendung von Kupfer bringt auch Nachteile mit sich. Durch das Kupfer werden reaktive Sauerstoffspezies erzeugt, welche Biomoleküle strukturell schädigen können [73]. Auch für den *in vivo* Einsatz ist diese Methode aufgrund der toxischen Wirkung des Kupfers ungeeignet. Deswegen wurde die Staudingerligation als eine weitere Methode zur chemoselektiven Kopplung an Azidogruppen verwendet. Hier reagiert ein Azid mit einem Phosphanreagenz zu einer stabilen Amidbindung. Sie eignet sich gut für *in vivo* Kopplungsversuche. Einziger Nachteil gegenüber der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition ist ihre langsamere Reaktionsgeschwindigkeit [68].

Für den Versuch wurde Aha1 I64X exprimiert, ein Zellysat hergestellt und der Fluoreszenzfarbstoff DyLight 550 an das Aha1 I64X im Zellysat über die Azidogruppe mit Hilfe der Staudingerligation kovalent gekoppelt. Nach der Kopplungsreaktion wurde die Probe geteilt. Aus einem Aliquot wurden die Proteine gefällt und jeweils 50 und 100 µg im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mit dem anderen Aliquot wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt und das Eluat im selben Gel aufgetrennt. Als Negativkontrolle wurde derselbe Ansatz auch mit Aha1 wt durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem FLA-5100 Laserscanner (**Abbildung 12**). In den Spuren 3 und 4 ist gut zu sehen, dass ein fluoreszierendes Protein für Aha1 I64X detektiert werden konnte. Dieses Signal ist zudem mengenabhängig. Auch konnte dieses Signal aus dem Gesamtproteinlysate immunologisch über das V5-Epitop angereichert werden (Spur 6). Das führt zu der Schlussfolgerung, dass das Aha1 I64X über die Staudingerligation an der Position 64 mit einem Fluoreszenzmolekül konjugiert werden konnte. Für die Negativkontrolle Aha1 wt konnte kein fluoreszierendes Protein

ERGEBNISSE

detektiert werden. Das SDS-Gel wurde im Anschluss geblottet. Für alle Spuren konnte ein Signal für Aha1 I64X und Aha1 wt gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

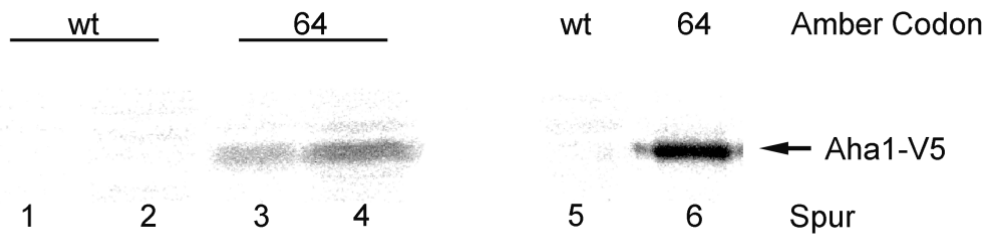


Abbildung 12: p-Azpa-abhängige Markierung von Aha1 an der Position 64 mit einem Fluoreszenzfarbstoff

Lysate der Stämme 2YA6C1 (Aha1 wt) und 2YA6,64C1 (Aha1 I64X) wurden einer Staudingerligation mit dem Fluoreszenzfarbstoff DyLight 550 unterzogen. Die Proben wurden im SDS-Gel aufgetrennt und die Fluoreszenz mit dem FLA-5100 Laserscanner detektiert. In den **Spuren 1** und **3** wurden 50 µg und in den **Spuren 2** und **4** 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Für den Stamm 2YA6,64C1 sieht man gegenüber 2YA6C1 ein deutliches Fluoreszenzsignal, welches abhängig von der aufgetrennten Proteinmenge intensiver wird. Nach der Staudingerligation wurde ein Teil des Zelllysats zur immunologischen Präzipitation des Aha1 verwendet (**Spuren 5** und **6**). Die **Spur 6** zeigt eindeutig, dass das in dem Gesamtproteinlysate (**Spur 3** und **4**) fluoreszierende Protein mit anti-V5 Antikörper angereichert werden konnte und es sich somit um das Aha1 I64X handelt.

Sowohl mit der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition, wie auch mit der Staudingerligation konnte eine chemoselektive Biokonjugation eines Moleküls an Aha1 I64X durchgeführt werden. Damit wurde bestätigt, dass die Azidogruppe der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa nach 24-stündiger Expression von Aha1 I64X intakt vorliegt.

1.4 Native Co-Immunpräzipitation und Nachweis von Hsp90

Es sind bereits viele Phänotypen und Krankheitsformen beschrieben, die auf genetische „*Missense Mutationen*“ zurückzuführen sind. Hierbei kann durch den Austausch eines einzelnen Nukleotids das wildtypische Codon gegen ein Codon verändert werden, welches für eine andere Aminosäure kodiert. Dadurch kommt es zum Austausch einer kanonischen Aminosäure durch eine andere in der Proteinstruktur. Das kann von Proteindefizienz, bis hin zum kompletten Funktionsverlust des Proteins führen [148,149].

Durch den Einbau von pAzpa an eine der ausgesuchten Positionen kann auch das Aha1-Protein degenerieren. Das wiederum könnte dazu führen, dass bestimmte, natürliche Interaktionen nicht mehr zustande kommen bzw. artifizielle Interaktionen entstehen. Der Nachweis über den Erhalt von Proteinstruktur und -funktion kann abhängig von den Proteinen unterschiedlich komplex ausfallen. Bei Enzymen bietet es sich an, die enzymatische Aktivität zu testen. Für den Cofaktor Aha1, welcher über keine bekannte eigene katalytische Funktion verfügt, sind unter anderem zwei Nachweisverfahren zum Erhalt der Proteinstruktur der mutagenisierten Aha1-Proteine möglich. Zum einen kann die Fähigkeit zur Induktion der ATPase-Aktivität von Hsp90 bestimmt werden [96] und zum anderen kann über eine native Co-Immunpräzipitation der Proteinkomplex bestehend aus Aha1 mit Hsp90 präzipitiert werden. Aufgrund der einfacheren und schnelleren Durchführbarkeit wurde für den Nachweis die native Co-Immunpräzipitation ausgewählt. Nach 24-stündiger Expression der mutagenisierten Aha1-Proteine wurden die Zellen mit der Retschmühle aufgeschlossen und unter Verwendung des V5-Tags die Aha1/Hsp90 Proteinkomplexe angereichert. Die Elution erfolgte spezifisch mit dem V5-Peptid. Die Eluate und die Zellysate nach der Proteinfällung wurden mittels Western Blot ausgewertet. Als Negativkontrolle wurde der Stamm 2YA0C1 (Leervektor) und als Positivkontrolle 2YA6C1 (Aha1 wt) verwendet. Das Ergebnis wurde zudem zweimal biologisch reproduziert. Die **Abbildung 13** (Hsp90: Co-IP) zeigt die Auswertung der Eluate im Hinblick auf die Anreicherung des Hsp90 Proteins. Ausgehend von der Position der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa im mutagenisierten Aha1-Protein wurde Hsp90 in unterschiedlich starken Ausbeuten angereichert. Am stärksten wurde Hsp90 für Aha1 wt angereichert, was mit seiner stärkeren Expression (Aha1-V5: Input) und der damit verbundenen größeren Anreicherung (Aha1-V5: Co-IP) erklärt werden kann. Für die anderen Positionen waren sowohl die Expression wie auch die Anreicherung von Aha1 vergleichbar. Dennoch wurde eine unterschiedliche Anreicherung von Hsp90 detektiert. Während für Aha1 R59X und Aha1 V63X das Hsp90 gut angereichert werden konnte, war für Aha1 L66X nur eine geringe Hsp90 Anreicherung zu erkennen. Dagegen konnte für Aha1 S65X kein Hsp90 angereichert werden. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass die Interaktion zwischen dem mutagenisierten Aha1 und Hsp90 abhängig von der Position, an welche pAzpa eingebaut wird, beeinflusst wird. In der Spur der Negativkontrolle (K) wurde kein Signal für eine unspezifische Präzipitation beobachtet.

ERGEBNISSE

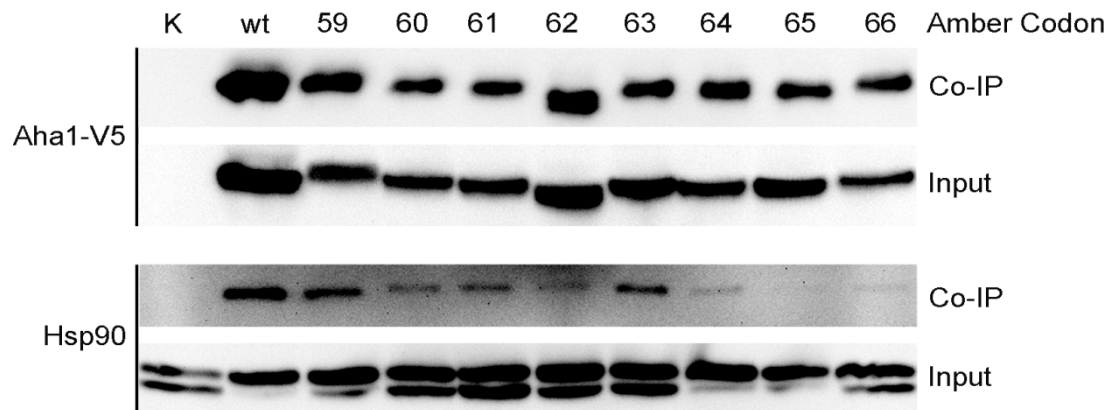


Abbildung 13: Native Co-Immünpräzipitation des Hsp90-Proteins mit Aha1-Varianten als *Bait-Protein*

Gesamtprotein (75 µg), sowie die Eluate aus der Co-IP wurden im Western Blot ausgewertet. Aha1-V5 wurde mit anti-V5 Antikörper und Hsp90 mit anti-Hsp90-Antikörper detektiert. Als Kontrolle (K) wurde der Stamm 2YA0C1 (Leervektor) verwendet.

Das Hsp90-Protein konnte mit allen Aha1-Varianten, bis auf Aha1 S65X, in der Co-IP präzipitiert werden. Die Menge des präzipitierten Proteins unterscheidet sich in Abhängigkeit von der Position, an die pAzpa eingebaut wird. In der Kontrolle war keine unspezifische Präzipitation von Hsp90 zu erkennen.

Mit anti-Hsp90-Antikörper konnten zwei nah beieinander liegende Proteinbanden im Input detektiert werden. Möglicherweise wurden hier die zwei Isoformen von Hsp90 in *S. cerevisiae*, Hsp82 und Hsc82, beobachtet [101]. Die Proteine zeigen eine 96%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz (siehe Anhang **Abbildung 42**). Bei der nativen Co-Immünpräzipitation (Hsp90: Co-IP) wurde die obere der beiden Banden angereichert (Daten nicht gezeigt).

1.5 Induktion der Quervernetzung

Aus den Ergebnissen der nativen Co-Immünpräzipitation wurde ersichtlich, dass der Einbau von pAzpa nicht zu einem Interaktionsverlust zu Hsp90 führt. Um diese Interaktion kovalent zu vernetzen, wurden die Zellen nach einer 24-stündigen Expression der mutagenisierten Aha1-Proteine, für 2 h mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm belichtet. Durch die Belichtung mit UV-Licht wird die Quervernetzung induziert. Dabei entsteht durch die Photolyse der Azidogruppe eine hochreaktive Nitrengruppe. Diese kann mit benachbarten Gruppen wie Amino-, Hydroxy- und C-H-Gruppen abreagieren, mit dem Ergebnis einer kovalenten Bindung zwischen den interagierenden

Proteinen [74,75]. Bei der anschließenden Auswertung mit anti-V5 Antikörper im Western Blot wird neben dem Signal für das Aha1-Monomer noch ein zusätzliches Signal für ein entstandenes Dimer mit einem größeren Molekulargewicht erwartet. Als Negativkontrolle wurde Aha1 wt, Kulturen ohne Zugabe von pAzpa und Kulturen ohne Belichtung mit UV-Licht verwendet.

In der **Abbildung 14** sind die Positionen gruppiert, für die die Ausbildung eines Dimers möglich war. Das stärkste Signal für das Dimer ist für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa an die Positionen 59 und 64 zu beobachten. Dieses quervernetzte Protein läuft bei einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa. Für eine angenommene Interaktion zwischen Aha1 und Hsp90 wurde ein Dimer mit einem Laufverhalten bei etwa 120 kDa erwartet, welches sich aus der Addition der einzelnen Molekulargewichte von Aha1 und Hsp90 ergibt. Wie erwartet, war die Ausbildung des Dimers sowohl von der Belichtung wie auch von der Zugabe der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa abhängig. Für das Aha1 wt konnte kein Dimer induziert werden. Diese Kontrolle ist wichtig, weil durch die starke UV-Bestrahlung in einem geringen Umfang auch die Quervernetzung ausgehend von kanonischen Aminosäuren möglich erscheint.

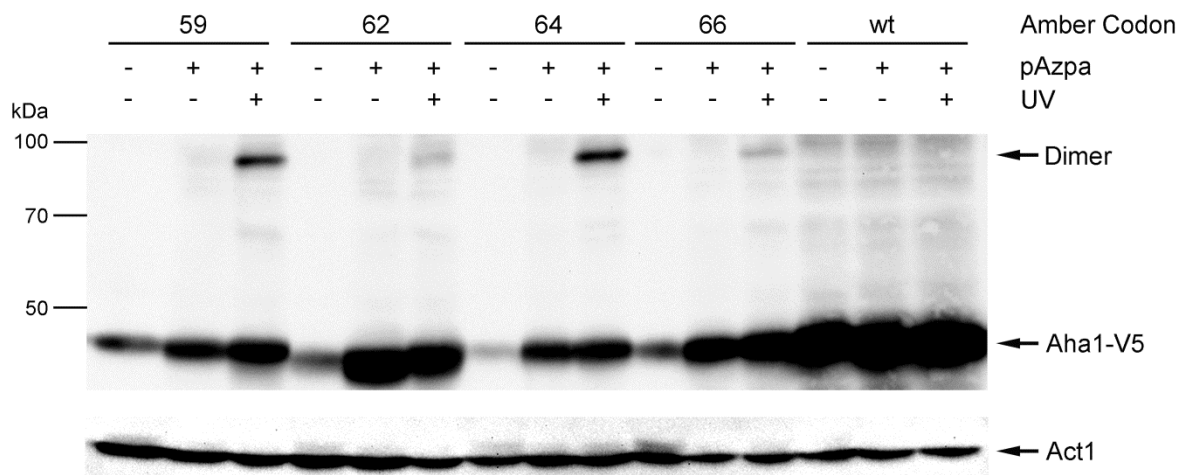


Abbildung 14: Aha1-Positionen, die ein kovalent quervernetzten Dimer ausbilden

Im Western Blot sind die Positionen aufgetragen, für die die Ausbildung eines kovalent quervernetzten Dimers möglich war. Das Dimer läuft auf der Höhe von 100 kDa. Die Ausbildung des Dimers ist positions-, UV- und pAzpa-abhängig. Als Kontrolle wurde Aha1 wt verwendet. Die Detektion erfolgte mit anti-V5 Antikörper. Als Ladekontrolle wurde Act1 mit anti-Act1 Antikörper detektiert.

In der **Abbildung 15** sind alle Positionen gruppiert, für die kein Dimer im Gesamtproteinlysate detektiert werden konnte. Ob über eine immunologische Anreicherung ein

ERGEBNISSE

Dimer hätte angereichert werden können, wurde nur für die Position 63, mit gleich bleibendem Ergebnis getestet (Daten nicht gezeigt).

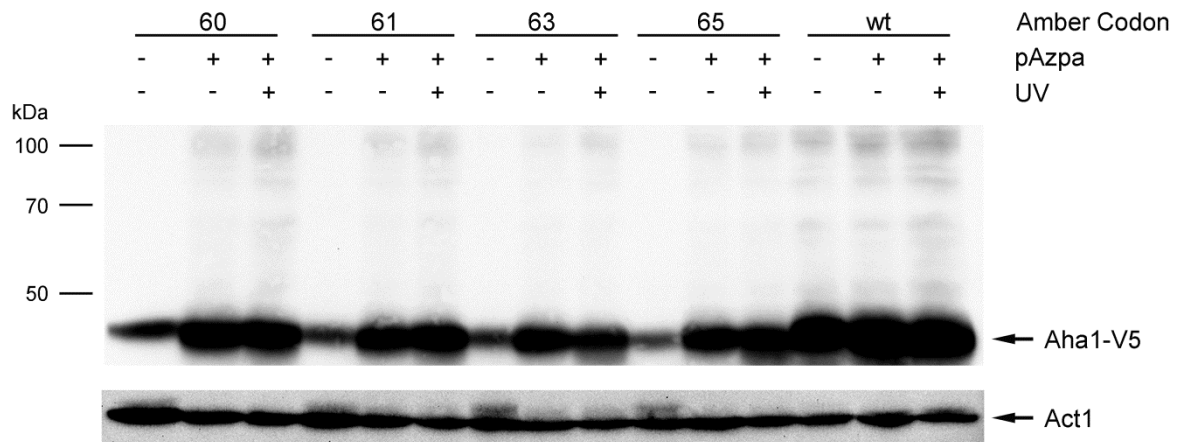


Abbildung 15: Aha1-Positionen, die kein kovalent quervernetzten Dimer ausbilden

Im Western Blot sind die Positionen zusehen, für die keine Ausbildung eines kovalent quervernetzten Dimers möglich war. Als Kontrolle wurde Aha1 wt verwendet. Die Detektion erfolgte mit anti-V5 Antikörper. Als Ladekontrolle wurde Act1 mit anti-Act1 Antikörper detektiert.

Für den besseren Vergleich wurden die belichteten Proben aller Positionen in einem Western Blot gruppiert (**Abbildung 16**). Vier der acht untersuchten Positionen (59, 62, 64 und 66) zeigten ein Dimersignal. Auffällig war, dass auf die Positionen, für die eine Quervernetzung möglich war, eine oder zwei Positionen folgten, für die eine Quervernetzung nicht induziert werden konnte.

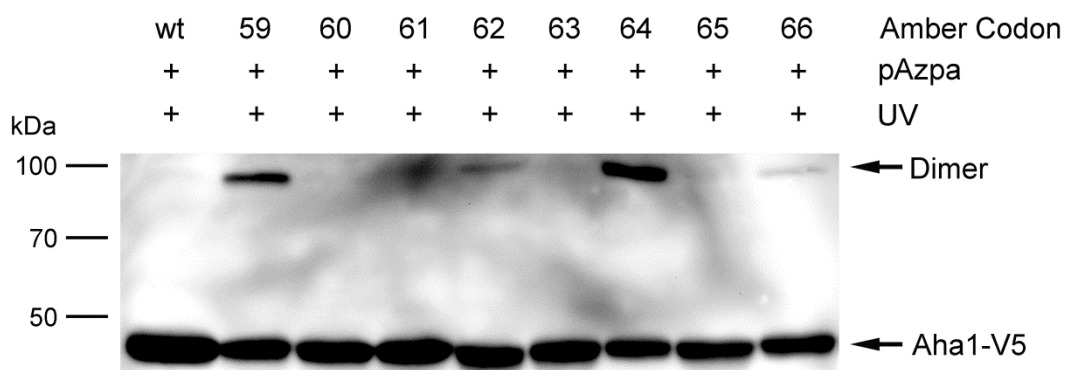


Abbildung 16: Aha1-Positionen nach UV-Belichtung

Die belichteten Proben für alle Positionen wurden in einem Western Blot gegenüber gestellt. Position 59 und 64 zeigen die stärkste Quervernetzungseffizienz. Für die Positionen 60, 61, 63, 65 und wt kann keine Quervernetzung beobachtet werden. Zur Detektion wurde ein anti-V5 Antikörper verwendet.

1.5.1 Quervernetzung in Abhängigkeit von der nicht-kanonischen Aminosäure pBzpa

Neben der nicht-kanonischen Aminosäure p-Azpa gibt es noch p-Benzoylphenylalanin (pBzpa) und p-(3-trifluoromethyl-3H-diazirin-3-yl)-Phenylalanin. Beide Aminosäuren können unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes in Proteine *in vivo* eingebaut werden und in Abhängigkeit von UV-Licht zur Quervernetzung von Proteinen verwendet werden [64]. Unter Verwendung von pBzpa sollte das Dimer reproduziert und damit die Unabhängigkeit von pAzpa gezeigt werden.

Dafür wurde die Expression von Aha1 I64X im Stamm 2YA6,64C2 induziert, nach 24 h die Zellen für 2 h mit UV-Licht belichtet und mittels Western Blot ausgewertet. Die Ausbildung des Dimers wurde in Abhängigkeit von der nicht-kanonischen Aminosäure pBzpa und UV-Licht gezeigt. Als Positivkontrolle wurde parallel das Aha1 R59X unter Zugabe von pAzpa exprimiert und das bereits bekannte Dimer mit UV-Licht induziert. pBzpa konnte in Aha1 I64X spezifisch eingebaut werden und nach der Belichtung mit UV-Licht wurde ein quervernetztes Dimer auf der Höhe von 100 kDa induziert (**Abbildung 17**). Dieses Dimer stimmt mit dem Dimer, quervernetzt mit Hilfe von pAzpa, vom Molekulargewicht überein. Für den Stamm 2YA6,63C2 wird trotz des Einbaus von pBzpa und UV-Belichtung keine zusätzliche Bande detektiert. Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung des Dimers nicht nur auf eine bestimmte nicht-kanonische Aminosäure limitiert ist.

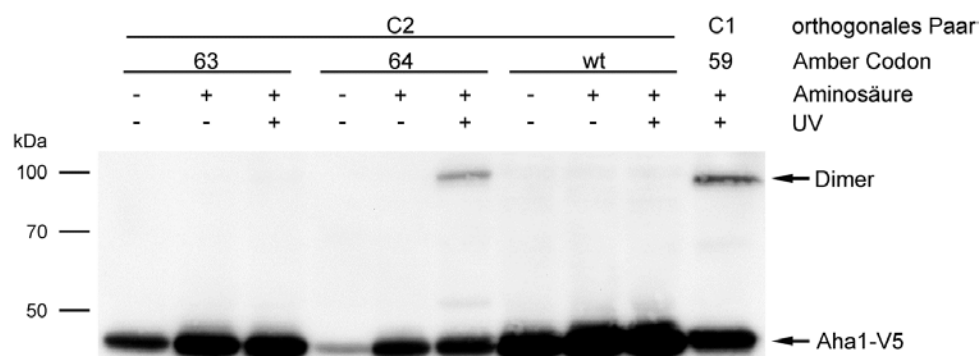


Abbildung 17: Reproduktion des Dimers mit der nicht-kanonischen Aminosäure pBzpa

Western Blot mit anti-V5 Antikörper. Die Expression von Aha1 V63X und Aha1 I64X wurde in den Stämmen 2YA6,63C2 und 2YA6,64C2 in Abhängigkeit von pBzpa induziert. Für die Position 64 konnte ein Dimer nach Belichtung mit UV-Licht ausgebildet werden, welcher auf einer Höhe von 100 kDa läuft. Dieses Dimer stimmt im Molekulargewicht mit dem Dimer quervernetzt mit Hilfe der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa überein (Positivkontrolle Aha1 R59X).

1.6 Identifizierung des entstandenen Dimers

Nachdem für die Positionen 59, 62, 64 und 66 abhängig von der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa und UV-Licht ein quervernetztes Dimer induziert werden konnte, soll in diesem Kapitel auf dessen Identifizierung eingegangen werden. Nach der Literaturrecherche war als Interaktionspartner Hsp90 zu erwarten [96,97]. Dieses Dimer würde nach der Addition der Molekulargewichte von Aha1 wt und Hsp90 ein Molekulargewicht von 120 kDa besitzen. Tatsächlich läuft das Dimer in einem SDS-Gel allerdings auf einer Höhe von etwa 100 kDa. Da das Laufverhalten von quervernetzten Proteinen schwer einzuschätzen ist, kann das Hsp90-Protein als Interaktionspartner nicht ausgeschlossen werden.

Im Falle einer erfolgreichen Quervernetzung wurde ein Proteindimer erwartet, welcher sowohl mit anti-V5 Antikörper wie auch anti-Hsp90 Antikörper detektiert werden kann. Ein Western Blot ausgewertet mittels anti-Hsp90 Antikörper hat gezeigt, dass es sich bei dem quervernetzten Interaktionspartner von Aha1 I64X nicht um das Hsp90 Protein handelt (Daten nicht gezeigt). Aus diversen Studien ist bekannt, dass unter Stressbedingungen, wie Inkubation bei 37 °C, die Expression von Aha1 und Hsp90 hochreguliert wird [105,150]. Um eine stressbedingte Interaktion der beiden Proteine auszuschließen, wurde die Expression von Aha1 V63X und Aha1 I64X für 24 h bei 21 °C induziert und anschließend ein Teil der Kultur einem Hitzeschock bei 37 °C für 20 min ausgesetzt. Sowohl die 21 °C als auch 37 °C Kulturen wurden anschließend mit UV-Licht belichtet. Das Experiment ist angelehnt an die Studie von Gasch et al. [105].

Die Proteinlysate wurden im Western Blot mit anti-V5 (**Abbildung 18A**) bzw. anti-Hsp90 Antikörper (**Abbildung 18B**) ausgewertet. Als Negativkontrolle wurde der Aha1 V63X verwendet. Das bei 30 °C beobachtete Proteindimer konnte für Aha1 I64X sowohl bei 21 °C wie auch bei 37 °C reproduziert werden. Weitere, zusätzliche Proteindimere wurden nicht detektiert.

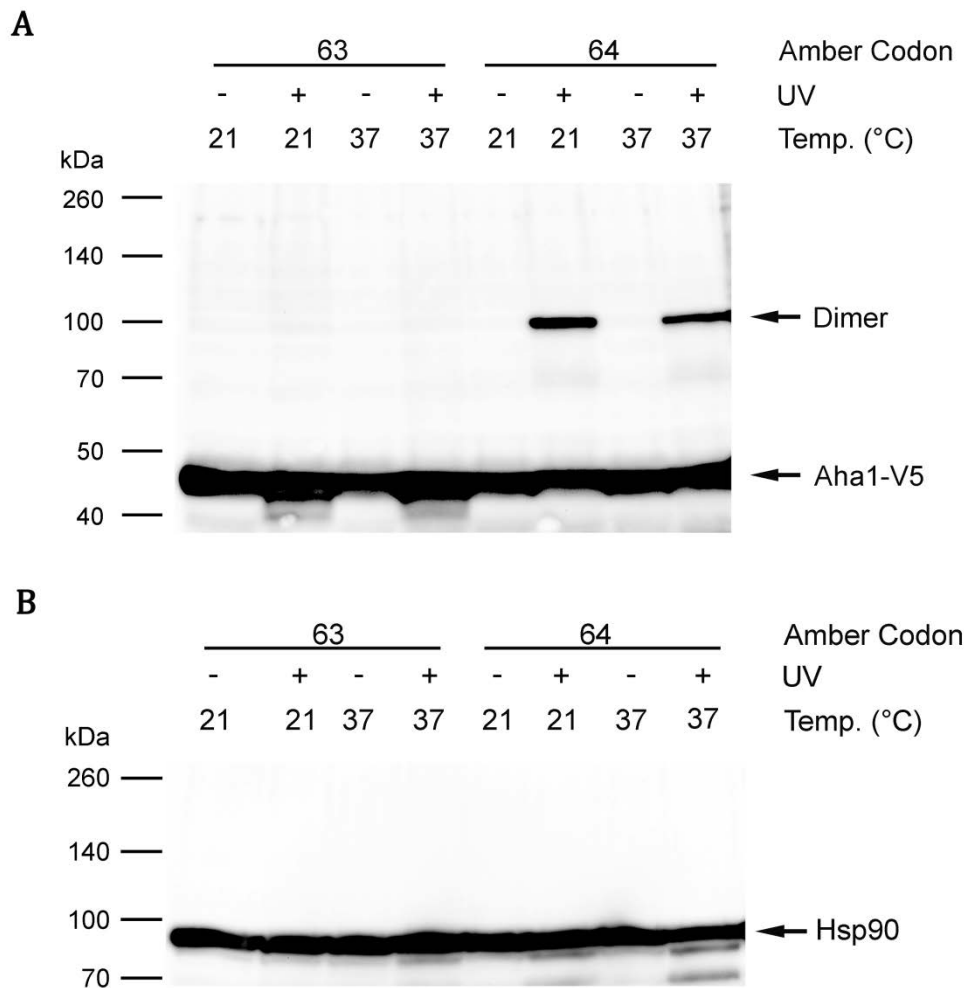


Abbildung 18: Hsp90 unabhängige Quervernetzung

Stämme 2YA6,63C1 und 2YA6,64C1 wurden bei 21 °C und 37 °C kultiviert und nach 24 h wurde mit UV-Licht die Quervernetzung induziert. Die Proteinlysate wurden im Western Blot mittels anti-V5 (A) bzw. anti-Hsp90 Antikörper (B) ausgewertet. Der Stamm 2YA6,63C1 diente als Negativkontrolle.

A: Sowohl bei 21 °C wie auch 37 °C wurde das bisher beobachtete Dimer auf der Höhe von 100 kDa detektiert. Eine zusätzliche Dimerbande konnte unter keiner Bedingung detektiert werden.

B: Hsp90 wurde unter allen Bedingungen gleich stark exprimiert. Eine zusätzliche Dimerbande konnte unter keiner Bedingung detektiert werden.

Eine Auswertung der gleichen Proben im Western Blot mit anti-Hsp90 Antikörpern zeigte keine zusätzlichen Proteinbanden oberhalb von Hsp90, nach Belichtung mit UV-Licht (**Abbildung 18B**). Damit konnte gezeigt werden, dass kein Proteindimer bestehend aus Aha1 I64X und Hsp90 quervernetzt werden konnte. Zudem konnten keine temperaturabhängigen Unterschiede im Proteinlevel für Hsp90 ausgemacht werden.

1.6.1 Charakterisierung des quervernetzten Dimers mittels 2D-Gelelektrophorese

Das quervernetzte Proteindimer ist mit seinen 100 kDa etwa doppelt so groß, wie Aha1 I64X. Zudem kann aufgrund von immunologischen Nachweisversuchen (siehe Kapitel 1.6) weitgehend ausgeschlossen werden, dass sich bei dem quervernetzten Interaktionspartner von Aha1 I64X um das Hsp90 Protein handelt. Um das Proteindimer weiter zu charakterisieren, wurde es mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese zweidimensional aufgetrennt. Mit dieser Methode konnte der isoelektrische Punkt des Dimers mit dem des Aha1 I64X Monomers verglichen werden.

Dafür wurde Aha1 I64X exprimiert, die Quervernetzung induziert und über den V5-Tag immunpräzipitiert. Die dabei erhaltenen Eluate wurden zweidimensional aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das SDS-Polyacrylamidgel geblottet und mit anti-V5 Antikörper ausgewertet. Als Negativkontrolle wurde dieser Versuchsansatz für dieselbe Kultur ohne UV-Belichtung durchgeführt. Mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass das Proteindimer denselben isoelektrischen Punkt wie das Aha1 I64X Monomer aufweist, da das Signal exakt über dem Monomer läuft (**Abbildung 19**).

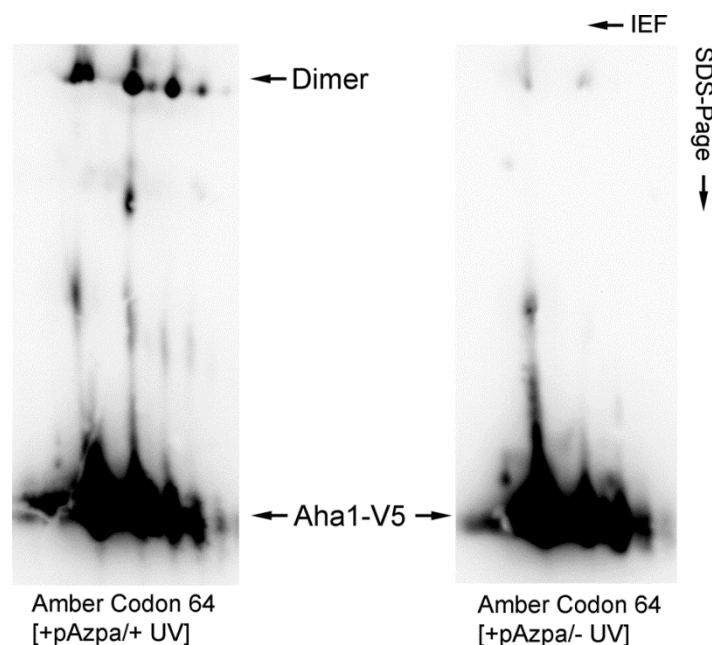


Abbildung 19: Charakterisierung des Dimers mittels 2D-Gelelektrophorese

Das Monomer und Dimer aus dem Stamm 2YA6,64C1 wurde immunologisch angereichert, zweidimensional aufgetrennt und anschließend über Western Blot mittels anti-V5 Antikörper ausgewertet. Als Kontrolle wurden nicht belichtete Zellen verwendet. Das Dimer zeigte gegenüber dem Monomer eine Übereinstimmung im isoelektrischen Punkt.

Das kann aber nur dann zustande kommen, wenn beide Proteine während der isoelektrischen Fokussierung, in der ersten Dimension, beim selben pH-Wert die Nettoladung null erreichen. Die Negativkontrolle bestätigte die Annahme, dass es sich bei dem oberen Signal um das Proteindimer handelt. Der aus der Aminosäuresequenz abgeleitete isoelektrische Punkt für Aha1 wt beträgt 8,12. Das Aha1-Monomer in der 2D-Gelelektrophorese liegt in einem pH-Bereich zwischen 7,5 und 8,5.

Das doppelte Molekulargewicht und der gleiche isoelektrische Punkt wie das des Aha1 I64X Monomers deuten darauf hin, dass es sich bei dem Dimer möglicherweise um ein Homodimer handelt. Jedoch sind in *S. cerevisiae* etwa 6.000 Proteine bekannt und nicht wenige dieser Proteine haben ein ähnliches Molekulargewicht sowie identischen isoelektrischen Punkt wie das Aha1 wt Protein. Daher ist die Massenspektrometrie die zielführendste Methode zur Identifizierung des Interaktionspartners von Aha1 I64X.

1.6.2 Massenspektrometrische Analyse des Monomers und des quervernetzten Dimers

Zur sicheren Identifizierung des Interaktionspartners von Aha1 I64X ist es nötig, das Proteindimer in ausreichenden Mengen für die massenspektrometrische Analyse anzureichern. Idealerweise kommen dafür chromatographische Methoden wie die Gelfiltration, Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie zum Einsatz. Bei der Entwicklung dieser Methode war es wichtig, die gewählte Anreicherungsverfahren so zu wählen, dass sie ohne komplexe Chromatographieschritte auskommt und in jedem gut ausgestatteten Labor möglich ist.

Das Aha1 I64X ist C-terminal, neben dem immunologisch detektierbaren V5-Epitop, auch mit einem 6 x His-Tag fusioniert. Die Eigenschaften des 6 x His-Tags können genutzt werden, um das Fusionsprotein über eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) anzureichern. Die isolierten Proteine werden auf eine Säule gegeben, deren Matrix immobilisierte, zweiwertige Nickel-Ionen (Ni^{2+}) enthält. Dabei wirken die Imidazolringe zweier benachbarter Histidine als Elektronendonoren und bilden mit einem Ni^{2+} eine Koordinationsbindung aus. Die Elution erfolgt mit Imidazol durch Konkurrenz [9]. Der Versuch das Proteindimer über den 6 x His-Tag unter nativen oder denaturierenden Bedingungen anzureichern, war allerdings nicht erfolgreich. Es konnten keine zufriedenstellenden Ausbeuten erzielt werden, obwohl das

ERGEBNISSE

Proteindimer im Western Blot mit anti-His Antikörper sehr gut detektierbar ist. Dagegen konnte das Aha1 I64X Monomer in großen Mengen angereichert werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem sich die IMAC-Methode als nicht praktikabel für das hier untersuchte Proteindimer erwiesen hat, wurde die Möglichkeit der immunologischen Anreicherung über das V5-Epitop in Erwägung gezogen. Dafür kam das *V5 tagged Protein Purification Kit* von MBL zum Einsatz. Hierbei wird das Proteindimer über einen monoklonalen anti-V5 Antikörper, welcher kovalent an Beads gekoppelt ist, angereichert. Die Elution erfolgte unspezifisch mit Laemmli-Puffer. Dafür wurde das Aha1 I64X exprimiert, mit dem Interaktionspartner quervernetzt und eine Immunpräzipitation durchgeführt. Das ganze Eluat wurde in einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit einer für die Massenspektrometrie geeigneten Silberfärbung gefärbt. Als Negativkontrolle diente Aha1 V63X. In der **Abbildung 20** ist das Ergebnis dieses Experiments zu sehen. Auf der Höhe von 100 kDa wurde für Aha1 I64X eine klare Bande detektiert, welche bei Aha1 V63X fehlte.

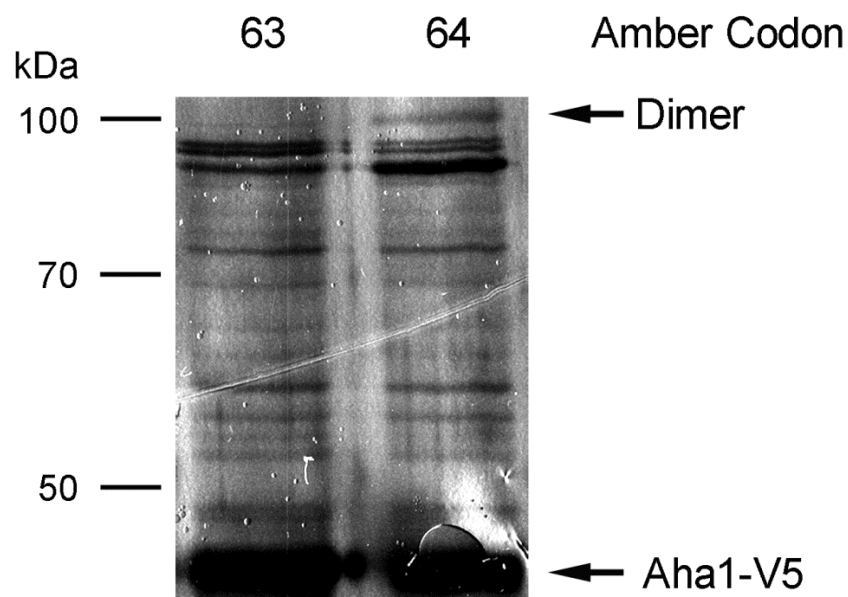


Abbildung 20: Silberfärbung der Eluate nach der Immunpräzipitation

Mit den Lysaten der Stämme 2YA6,64C1 und 2YA6,63C1 wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt, das Eluat im 8%igen SDS-Page aufgetrennt und die Proteine mit einer zur Massenspektrometrie kompatiblen Silberfärbung gefärbt. Auf der Höhe von 100 kDa ist für den Stamm 2YA6,64C1 eine Bande für das Dimer, verglichen mit Stamm 2YA6,63C1, der kein Dimer ausbildet, zu sehen. Das Aha1-Monomer wurde wie erwartet für beide Stämme stark angereichert.

Neben dem Proteindimer konnten für beide Proben das Monomer stark angereichert werden. In der **Abbildung 21A** ist das Massenspektrum für Aha1 I64X Monomer zu sehen. Für die Zuordnung der Massen zu einem bestimmten Protein wurde eine Fehlertoleranz von ± 100 ppm und das Auslassen von maximal einer Schnittstelle erlaubt. Alle gelb hinterlegten Massenpeaks konnten mit einer 76%igen Übereinstimmung dem Aha1 I64X eindeutig zugeordnet werden. Dabei wurden 76 % der Aha1-Sequenz einschließlich des C-terminale Tags bestehend aus V5-Epitop und 6 x His-Tag abgedeckt (**Abbildung 21C**). Das Peptid, welches die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa im Austausch für Isoleucin an der Position 64 enthält, konnte nicht detektiert werden (Position 64, in der **Abbildung 21C** grün markiert). Das liegt daran, dass die Proben zur Ausbildung des quervernetzten Dimers belichtet wurden. Photolyse und die anschließende Abreaktion der Azidogruppe mit zufällig in der Nähe sich aufhaltenden Molekülen würde zwangsläufig zu sehr vielen unterschiedlichen Massen für dieses eine Peptid führen. Das wiederum macht eine eindeutige Identifikation dieses Peptids unmöglich. Auch der *Probability Based Mowse Score* in der **Abbildung 21B** zeigte an, dass außer Aha1 I64X, mit einem Score von 277, kein anderes Protein von *S. cerevisiae* für dieses Massenspektrum in Frage kommt. Alle Proteine mit einem Score von kleiner 67 werden als nicht signifikant angesehen.

ERGEBNISSE

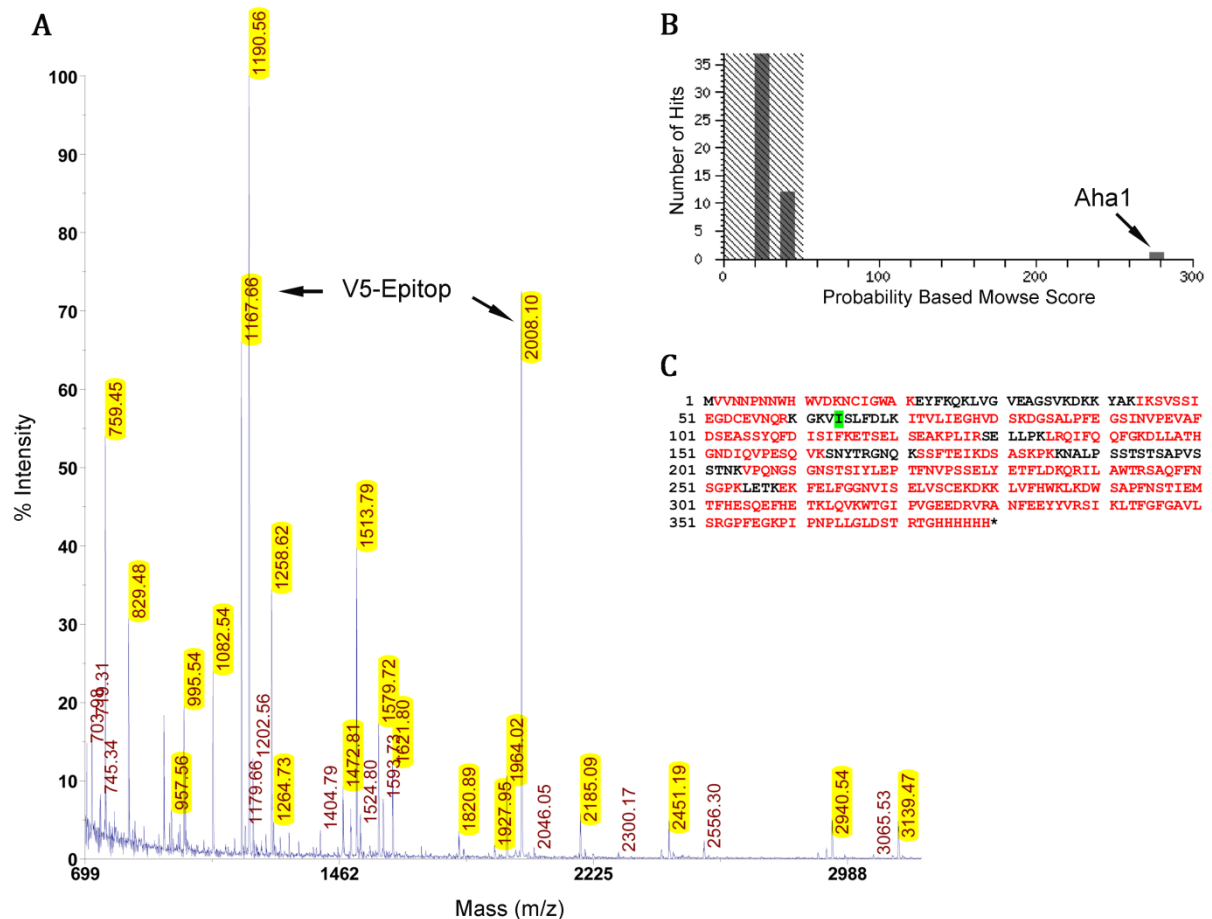


Abbildung 21: Massenspektrum für das Aha1 I64X Monomer

A: Gezeigt ist das Massenspektrogramm für das Aha1 I64X Monomer. Alle Peaks, die Aha1 I64X zugeordnet werden können, sind gelb markiert. Der C-terminalen Tag (V5-Epitop) wurde mit zwei Peptiden komplett abgedeckt.

B: Aus dem *Probability Based Mowse Score* geht hervor, dass bei dem Massenspektrum in **A** nur das Aha1 I64X detektiert wurde.

C: Gezeigt ist die Abdeckung der detektierten Massen über die Aha1 I64X Aminosäuresequenz. Rote Sequenzabschnitte konnten Massenpeaks zugeordnet werden. Das Peptid mit der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa (Position 64, grün markiert) wurde im Massenspektrum nicht gefunden.

Es hat sich gezeigt, dass die Ausbeute an Proteindimer aus einer Immunpräzipitation für die Identifizierung des Interaktionspartners über die Massenspektrometrie nicht ausreicht. Für eine größere Ausbeute an Dimer wurden zehn separate Immunpräzipitationen für Aha1 I64X durchgeführt, die resultierenden Eluate gepoolt, im 6%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Bande für das Proteindimer wie auch schon das Monomer massenspektrometrisch ausgewertet. Als Negativkontrolle für die Zuordnung der Proteindimerbande wurde Aha1 V63X, welcher kein Dimer ausbildet, verwendet. In der **Abbildung 22A** sind die detektierten Peptidmassen in einem

Massenspektrogramm zu sehen. Alle dominanten Massenpeaks konnten Aha1 zugeordnet werden und sind gelb markiert. Die Abdeckung der Aha1-Sequenz betrug 76 % (**Abbildung 22C**). Gleichzeitig hatte das Aha1 einen signifikanten *Probability Based Mowse Score* von 237 (**Abbildung 22B**). Im Falle eines Heterodimers müsste das Verhältnis von Aha1 I64X zum Interaktionspartner äquimolar sein. Das wiederum würde bedeuten, dass noch zusätzlich signifikante Massenpeaks, welche nicht Aha1 I64X zugeordnet werden können, vorhanden sein müssten. Das war in der analysierten Probe aber nicht der Fall. Auch ein weiteres Protein mit einem signifikanten Score von über 67 war im *Probability Based Mowse Score* nicht zu beobachten. Demnach ist die einzig logische Schlussfolgerung: Bei dem in Abhängigkeit von der nicht-kanonischen Aminosäure, Position und UV-Licht quervernetzten Proteindimer handelt es sich um einen Homodimer, bestehend aus zwei Aha1-Monomeren, von denen mindestens eins das Aha1 I64X Monomer ist.

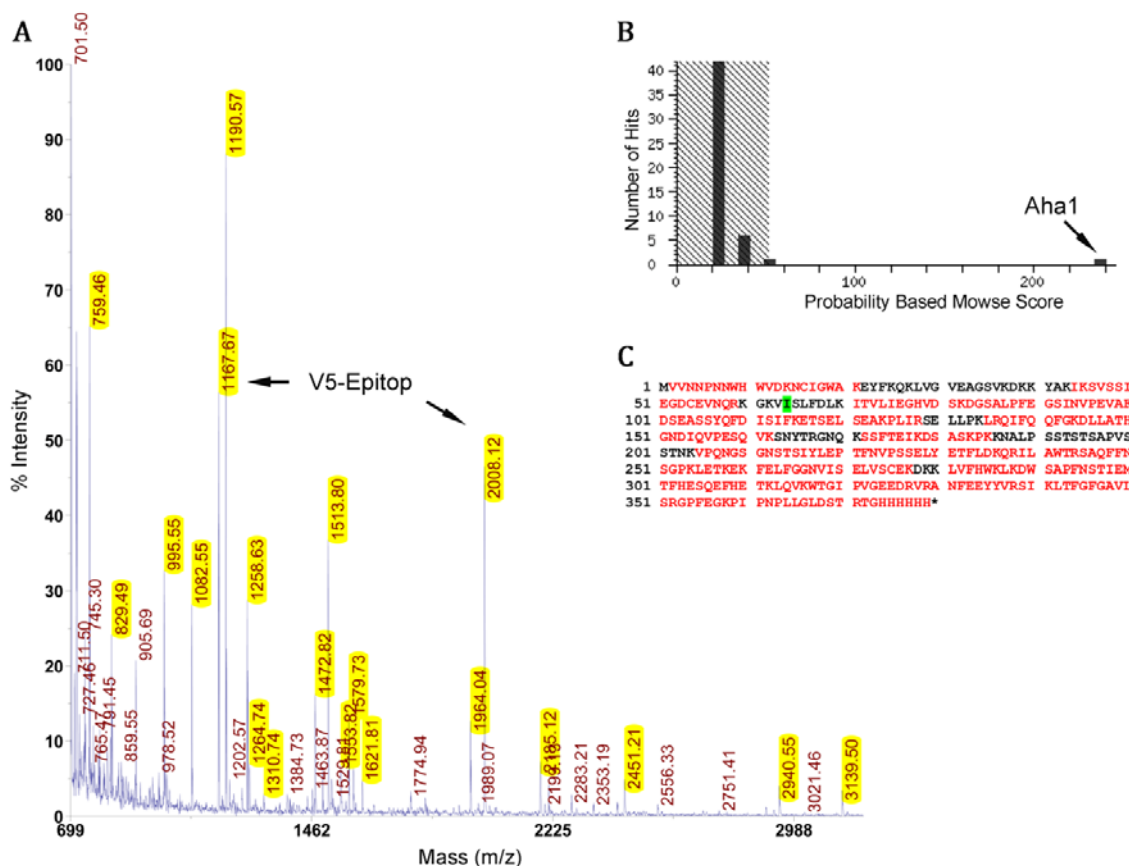


Abbildung 22: Massenspektrogramm für das Aha1 I64X Dimer

A: Gezeigt ist das Massenspektrogramm für das Aha1 I64X Dimer. Alle Peaks die dem Aha1 I64X zugeordnet werden konnten, sind gelb markiert. Der C-terminalen Tag (V5-Epitop) wurde mit zwei Peptiden komplett abgedeckt. Alle Peaks mit hoher Intensität, bis auf den Peak mit einer Masse von 905,69, konnten dem Aha1 I64X Monomer zugeordnet werden.

ERGEBNISSE

B: Aus dem *Probability Based Mowse Score* geht hervor, dass bei dem Massenspektrum in **A** nur Peptide von Aha1 I64X detektiert wurden.

C: Gezeigt ist die Abdeckung der detektierten Massen über die Aha1 I64X Aminosäuresequenz. Rote Sequenzabschnitte konnten Massenpeaks zugeordnet werden. Das Peptid mit der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa (Position 64, grün markiert) wurde im Massenspektrum nicht gefunden.

Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse ergab, dass es sich bei dem quervernetzten Proteindimer, um ein Homodimer handelt. Das wird durch die bereits gemachten Beobachtungen gestützt. Das Molekulargewicht des Dimer ist etwa doppelt so groß wie das Molekulargewicht des Monomers (Kapitel 1.5) und das Dimer hat denselben isoelektrischen Punkt (Kapitel 1.6.1).

Die Frage, ob es sich bei dem quervernetzten Proteindimer um zwei Aha1 I64X Proteine oder ein Aha1 I64X und ein endogen exprimiertes Aha1-Protein handelt, ist schwer zu beantworten. Nur an zwei Peptiden würde man bei einer massenspektrometrischen Analyse erkennen, dass es sich beim Interaktionspartner um das endogene Aha1-Protein handelt. Das eine Peptid würde bei einem tryptischen Verdau nach der Aminosäure 62 und 70 entstehen. Bei Aha1 I64X erfolgt hier der Einbau von pAzpa und das Peptid wäre nach der Quervernetzung nicht mehr detektierbar. Für das endogene Aha1 müsste das Peptid zu beobachten sein, wenn innerhalb dessen keine Quervernetzung stattfindet. Das andere Peptid entsteht nach dem tryptischen Verdau hinter der Aminosäure 341. Für das endogene Aha1 folgt bis zur letzte Aminosäure (350) keine weitere Schnittstelle, während für Aha1 I64X dieses Peptid durch eine Schnittstelle im C-terminalen Fusionspeptid verlängert wird. Das C-terminale Peptid des endogenen Aha1 enthält dagegen keine basischen Aminosäuren und wird deswegen vom Massenspektrometer schlecht detektiert.

1.7 Immunologischer Nachweis eines Homodimers

Mit der massenspektrometrischen Analyse konnte das Proteindimer als ein Homodimer identifiziert werden. Es war aber mit den beobachteten Massen nicht möglich zu bestimmen, ob eine Quervernetzung mit einem endogenem Aha1-Protein stattfindet. Um das herauszufinden, wurde ein immunologischer Ansatz gewählt. Das endogen exprimierte Aha1 wurde dabei mit einem HA-Epitop fusioniert. Wenn Aha1-HA und das mutagenisierte Aha1 miteinander interagieren und eine UV-abhängige Quervernetzung

induziert werden kann, müsste das Proteindimer sowohl mit dem anti-V5, wie auch dem anti-HA Antikörper nachweisbar sein.

Fusionierung des HA-Epitops an das endogene AHA1

Die Fusionierung der HA-Sequenz an die endogene *AHA1*-Sequenz erfolgte nach einem PCR basierten Protokoll [38]. Dabei wurde über homologe Rekombination an einer definierten Position im Genom, hier *AHA1*, eine Kasette integriert. Diese Kasette enthielt flankierend homologe Sequenzen, das HA-Epitop und einen Resistenzmarker für die Selektion von positiven Klonen. Sie wurde entweder N- oder C-terminal an das *AHA1* fusioniert. Die Fusionsproteine enthielten unterschiedliche Anzahl an HA-Epitopsequenzen. Durch die Verwendungen von mehreren Sequenzwiederholungen eines Epitops können selbst geringe Proteinkonzentrationen detektiert werden [38]. Zudem wurden die N-terminalen Fusionskonstrukte unter die Kontrolle von verschiedenen Promotoren gestellt. Nach der Integration in den *AHA1*-Locus wurde die Expression der unterschiedlichen Aha1-HA Fusionsproteine im Western Blot analysiert. Das Aha1-HA Fusionsprotein mit einfachem C-terminalen HA-Epitop im Stamm 2Y257 konnte gegenüber allen Varianten am besten exprimiert und detektiert werden (**Abbildung 23**).

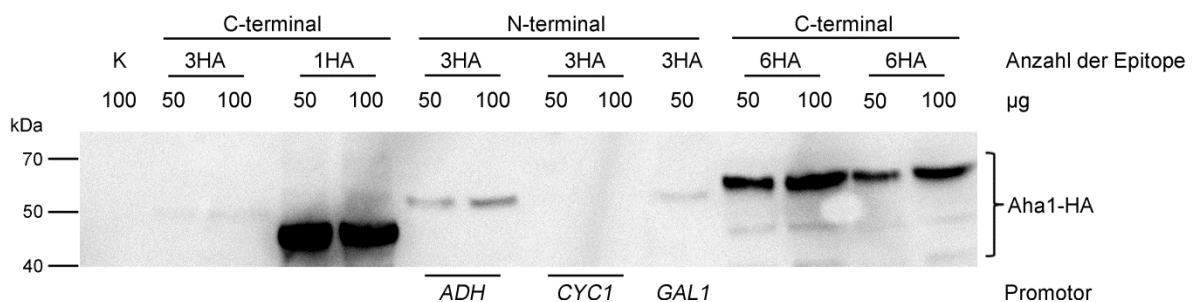


Abbildung 23: Fusion des endogenen Aha1 (wt) mit HA-Epitop

Endogenes Aha1 wurde C-terminal und N-terminal mit einer unterschiedlichen Anzahl an HA-Epitopen fusioniert, exprimiert und die Expression im Western Blot mittels anti-HA-Antikörper ausgewertet. Das beste Signal konnte für das C-terminal markierte Aha1-HA (wt) mit einem HA-Epitop detektiert werden.

Dieser Stamm wurde anschließend mit dem Plasmid C1 für das orthogonale Pärchen (nicht-kanonische Aminosäure pAzpa) und mit einem der Plasmide für eine der Aha1-Varianten (Leervektor, Aha1 wt, Aha1 R59X, Aha1 V63X und Aha1 I64X) transfiziert.

ERGEBNISSE

Folgende Stämme wurden für die Quervernetzungsexperimente generiert: 2Y257A0C1, 2Y257A6C1, 2Y257A6,59C1, 2Y257A6,63C1 und 2Y257A6,64C1.

Native Co-Immunpräzipitation

Vor den Quervernetzungsexperimenten wurde wie schon für Hsp90 gezeigt (Kapitel 1.4), eine native Co-Immunpräzipitation zum Nachweis einer Interaktion zwischen dem mutagenisierten Aha1 und Aha1-HA durchgeführt. Zellperlen der Stämme 2Y257A0C1, 2Y257A6C1, 2Y257A6,59C1, 2Y257A6,63C1 und 2Y257A6,64C1 wurden mit der Retschmühle aufgeschlossen und eine Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Die Elution erfolgte mit dem V5-Peptid (GKPIP NPLLGLDST) über Konkurrenz in einem 40 µl Volumen. Anschließend wurden die Eluate und Inputs (nach einer vorhergehenden Fällung) im Western Blot mit anti-V5 bzw. anti-HA Antikörper ausgewertet. Der Leervektor-Stamm 2Y257A0C1 diente als Negativkontrolle. Aha1-HA wurde exprimiert, konnte aber unter den gewählten Präzipitationsbedingungen in Verbindung mit einem der mutagenisierten Aha1-Proteine nicht co-angereichert werden (**Abbildung 24A**). Die Anreicherung der mutagenisierten Aha1-Proteine war sehr stark (**Abbildung 24B**).

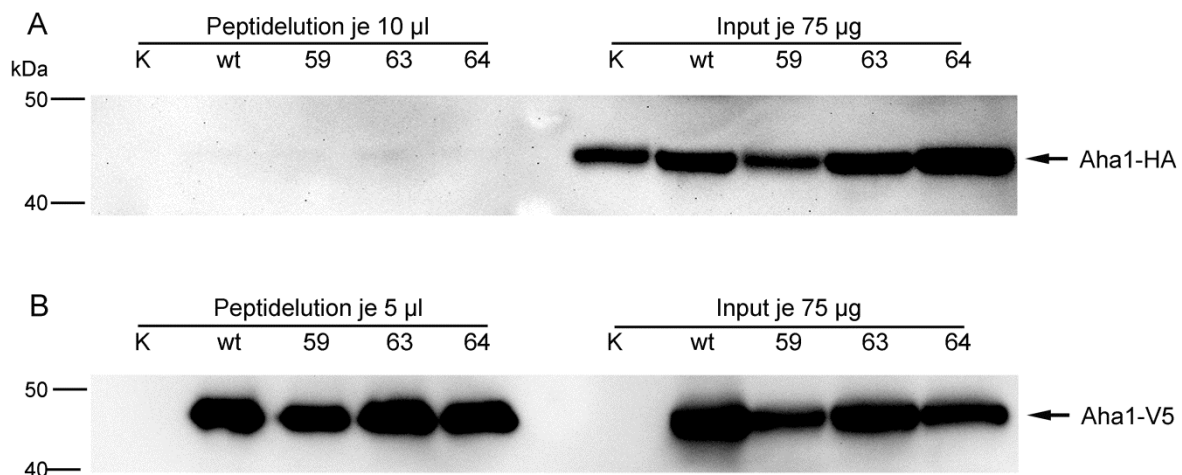


Abbildung 24: Native Co-Immunpräzipitation von Aha1-HA

A: Auswertung mit anti-HA Antikörper. Es konnte in keinem Ansatz das Aha1-HA co-präzipitiert werden. Im Input ist eine gute Expression von Aha1-HA zu sehen.

B: Auswertung der Eluate sowie der Proteinlysate mit anti-V5 Antikörper nach der Immunpräzipitation.

Quervernetzung von Aha1-V5 mit Aha1-HA

Nachdem mir der nativen Co-Immunpräzipitation unter den gewählten Präzipitationsbedingungen keine Interaktion zwischen Aha1-V5 und Aha1-HA gezeigt werden konnte, sollte die Interaktion mit Hilfe der Quervernetzung gezeigt werden. Um diese Fragestellung zu klären, wurde das Aha1 I64X, Aha1 R59X und Aha1 wt (Kontrolle) exprimiert und die Quervernetzung mit UV-Licht induziert. Die Proteindimere wurden anschließend über das *V5 tagged protein Purification Kit* angereichert. Von jedem Eluat wurden im Western Blot 5 µl mit anti-V5 und 39 µl mit anti-HA Antikörper ausgewertet. Für Aha1 R59X konnte ein Proteindimer präzipitiert werden, welches sowohl mit anti-V5 (**Abbildung 25A**) wie auch mit anti-HA Antikörper (**Abbildung 25B**) detektiert wurde. Dagegen konnte für das Aha1 I64X trotz vergleichbarer Proteindimerausbeute kein Proteindimer mit anti-HA Antikörper detektiert werden. Die Kontrolle Aha1 wt zeigt kein Dimer, unabhängig von dem Antikörper, mit dem ausgewertet wurde.

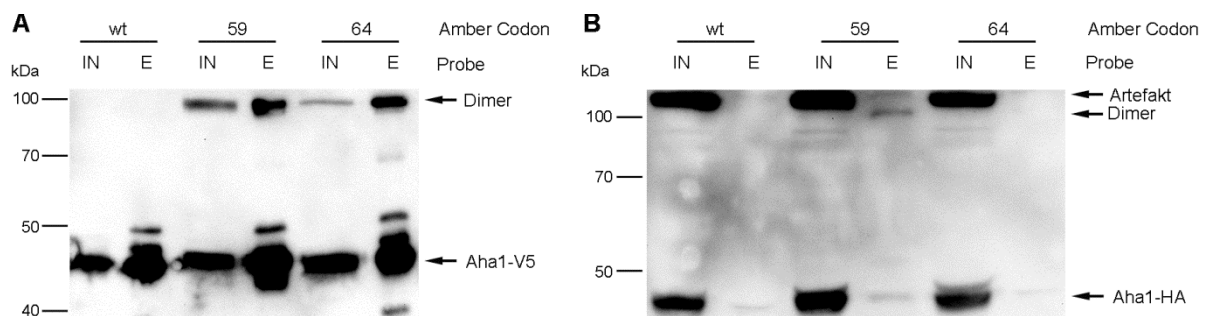


Abbildung 25: Quervernetzung von mutagenisiertem Aha1 und Aha1-HA

A: Die Kontrolle der Immunpräzipitation mit anti-V5 Antikörper zeigt, dass für Aha1 R59X und Aha1 I64X das quervernetzte Dimer angereichert werden konnte.

B: Für Aha1 R59X konnte ein Dimer mit anti-HA Antikörper im Eluat detektiert werden. Für Aha1 I64X wurde dagegen kein Heterodimer detektiert. Im Input ist jeweils eine starke Expression von Aha1-HA zu sehen.

Die Quervernetzungsexperimente haben für Aha1 R59X gezeigt, dass eine Interaktion zum Aha1-HA stattfindet und eine Quervernetzung dieser Interaktion möglich ist. Dass für Aha1 I64X und die nativen Co-Immunpräzipitation keine Interaktion gezeigt werden konnte, könnte daran liegen, dass die Interaktion zweier getaggtter Aha1-Moleküle transient oder von geringer Affinität ist.

1.8 Einfluss des 6 x His-Tags auf die Ausbildung des Dimers

Die wohl am häufigsten verwendete, affinitätschromatographische Methode ist die Immobilisierung von 6 x His-Tag-Fusionsproteinen an eine Ni²⁺-NTA Matrix. Sie erlaubt eine effiziente Anreicherung großer Proteinmengen. Die klaren Vorteile in der Verwendung führen leider häufig dazu, dass die Nachteile dieser Methode unerwähnt bleiben. So können manche 6 x His-getaggte Fusionsproteine über ihre 6 x His-Tags miteinander dimerisieren. Diese Dimerisierung wird durch die in der Zelle vorliegenden zweiwertigen Zink-Ionen (Zn²⁺) induziert [151,152]. Aufgrund der realistischen Möglichkeit, dass die Dimerisierungseigenschaften des Zielproteins gegenüber dem wildtypischen Protein verändert sein könnten, ist die Verwendung des 6 x His-Tags bei der Studie von Protein-Protein-Interaktionen, trotz seiner Vorteile, ungünstig.

In diesem Kapitel soll daher geklärt werden, ob das quervernetzte Homodimer auf eine falsch positive Interaktion, hervorgerufen durch den 6 x His-Tag, zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurde der 6 x His-Tag entfernt und Aha1 nur an das V5-Epitop fusioniert und Quervernetzungsexperimente durchgeführt. Sowohl für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa an die Position 59 sowie 64 konnte das Homodimer mit einem Molekulargewicht von 100 kDa weiterhin in Abhängigkeit von UV-Licht und pAzpa quervernetzt werden (**Abbildung 26**).

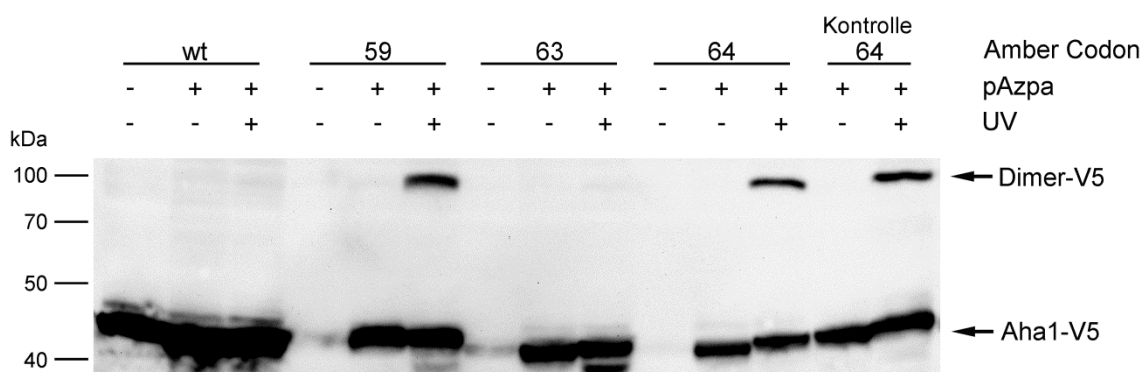


Abbildung 26: Quervernetzung von Aha1-V5 ohne den 6 x His-Tag

Auswertung der Stämme 2YA21C1, 2YA21,59C1, 2YA21,63C1 und 2YA21,64C1 im Hinblick auf die Ausbildung des Homodimers in Abhängigkeit von der Position, UV-Licht und Aminosäure. Im Western Blot wurden jeweils 75 µg Gesamtprotein mit anti-V5 Antikörper ausgewertet. Als Positivkontrolle diente der Stamm 2YA6,64C1, in dem Aha1 mit dem Tandem-Tag (V5-Epitop und 6 x His-Tag) exprimiert wird. Für die Position 59 und 64 konnte ein Signal für das Dimer detektiert werden, welches wie in der Positivkontrolle auf der Höhe von 100 kDa läuft.

Der 6 x His-Tag hat somit kein Einfluss auf die Ausbildung des Homodimers. Als Positivkontrolle wurde das bisher analysierte Homodimer, quervernetzt über die Position 64, aufgetragen. Für die beiden Negativkontrollen (wt und 63) konnten wie bisher auch keine Proteindimere beobachtet werden.

Um auszuschließen, dass bei der Dimerisierung das V5-Epitop eine Rolle spielt, wurde das V5-Epitop (GKPIPPLLGLDST) durch das HA-Epitop (YPYDVPDYA) bzw. das FLAG-Epitop (DYKDDDDK) ersetzt. Die Linkersequenz zwischen der Aha1-Sequenz und der ersten Aminosäure der Epitopsequenz wurde gleich belassen. Dabei konnte das Ergebnis aus der **Abbildung 26** sowohl für das HA-Epitop (**Abbildung 27A**) wie auch für das FLAG-Epitop (**Abbildung 27B**) reproduziert werden.

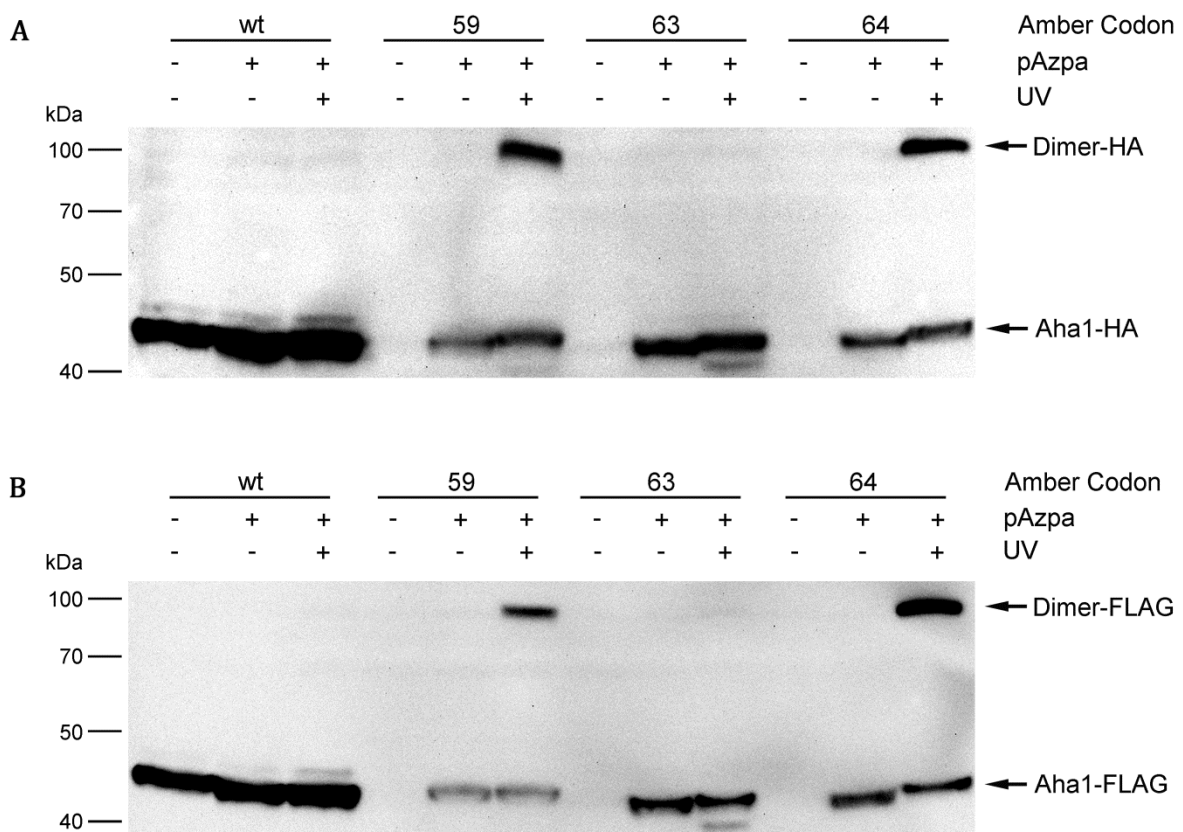


Abbildung 27: Quervernetzung von Aha1-HA und des Aha1-FLAG

A: Auswertung der Stämme 2YA31C1, 2YA31,59C1, 2YA31,63C1 und 2YA31,64C1 im Hinblick auf die Ausbildung des Homodimers in Abhängigkeit von der Position, UV-Licht und Aminosäure mittels anti-HA Antikörper. Für Aha1-HA mit pAzpa an den Position 59 und 64 konnte ein Signal für das Dimer detektiert werden, welches auf der Höhe von 100 kDa läuft.

B: Auswertung der Stämme 2YA41C1, 2YA41,59C1, 2YA41,63C1 und 2YA41,64C1 im Hinblick auf die Ausbildung des Homodimers in Abhängigkeit von der Position, UV-Licht und Aminosäure mittels anti-FLAG Antikörper. Für Aha1-FLAG mit pAzpa an den Position 59 und 64 wurde ein Signal für das Dimer detektiert, welches auf der Höhe von 100 kDa läuft.

Durch den Austausch des C-terminalen Epitops konnte gezeigt werden, dass die identifizierte Dimerisierung von zwei Aha1-Proteinen zu einem Homodimer nicht durch das Epitop des Fusionsproteins hervorgerufen wird.

1.9 Experimente zur Charakterisierung der Methode zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Neben der Identifizierung von Interaktionspartnern wurde die angewandte Methode zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen auch allgemein charakterisiert. Unter anderem sollte geklärt werden, inwiefern sich das orthogonale Paar und die nicht-kanonischen Aminosäuren auf das Wachstumsverhalten des Ausgangsstammes auswirken. Auch wurde die Rolle der Belichtungszeit, Zeitpunkt der Quervernetzung nach der Induktion der Expression und die Konzentration der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa im Medium untersucht. Alle Experimente wurden am Beispiel von Aha1 I64X durchgeführt.

1.9.1 Einfluss des orthogonalen Pärchens und der nicht-kanonischen Aminosäure auf das Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae*

Eine nicht-kanonische Aminosäure kann sich aufgrund von strukturellen Ähnlichkeiten zu kanonischen Aminosäuren auf einen Organismus negativ bis hin zu toxisch auswirken [153,154]. Aus diesem Grund wurde der Effekt von pAzpa und pBzpa auf den einen in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stamm YPH501 überprüft. Dafür wurde der Stamm 2Y aus einer Vorkultur (OD₆₀₀ = 2,3) mit einem Volumen von 5 µl in 40 ml frischem YPD-Medium angeimpft. Unterschiedliche Konzentrationen der Aminosäure pAzpa und pBzpa wurden zu den einzelnen 40 ml Ansätzen dazugegeben. Als Kontrollen wurden Kulturen ohne Aminosäurezugabe und solche, denen für die Lösung der Aminosäure entsprechende Menge an 1 M NaOH zugegeben wurde, verwendet. Die Zugabe von 1 mM pAzpa zum Medium führt zu einem deutlich abgeschwächten Wachstumsverhalten (siehe **Abbildung 28A**). Nach 24 h Inkubation war kein Wachstum zu beobachten. Die Kontrollstämme erreichten in diesem Zeitraum eine optische Dichte

von fast 2. Bei dieser OD600 gehen die Zellen im SC-Medium in die stationäre Phase über. Erst nach weitere 24 h haben die Stämme mit pAzpa die optische Dichte der Kontrollstämme erreicht. Die Aminosäure pBzpa hat anders als pAzpa keine so hohe Löslichkeit in 1 M NaOH. Für sie liegt die Löslichkeit bei 0,2 mol/l. Deswegen wurde bei den Arbeiten mit pBzpa dem Wachstumsmedium immer größere Mengen an 1 M NaOH dazugegeben. Für den Stamm 2Y wurde eine Wachstumsverzögerung beobachtet, welche auf die zugegebene Menge NaOH zurückzuführen war. Inwiefern pBzpa selbst einen Effekt auf die Zellen zeigt, konnte hier nicht geklärt werden. Nach 48 h wurde aber auch hier die stationäre Phase der Kontrollstämme erreicht (**Abbildung 28B**).

Als nächstes wurde die Auswirkung der Aminosäure und des orthogonalen Pärchens auf das Wachstumsverhalten untersucht. Diese Versuche wurden exemplarisch mit dem Stamm 2YA6,64C1 (enthält das orthogonale Pärchen für pAzpa) und 2YA6,64C2 (enthält das orthogonale Pärchen für pBzpa) durchgeführt. Der Versuchsaufbau war derselbe, wie schon oben für den Stamm 2Y beschrieben. Kultivierung erfolgte im SC-TRP/URA-Glukosemedium. In diesem Medium findet keine Expression von Aha1 I64X statt. Dagegen ist das orthogonale Pärchen konstitutiv exprimiert. Ohne Zugabe von pAzpa erreichte der Stamm 2YA6,64C1 nach 48 h eine optische Dichte von 2 und ging in die stationäre Phase über (siehe **Abbildung 28C**). Wenn dem Medium 1 mM pAzpa zugegeben wurde, war selbst nach 72 h keine Zunahme in der optischen Dichte zu beobachten. Nach weiteren 24 h und in der Summe 96 h wurde nur eine OD600 von 0,7 gemessen. Bei geringeren pAzpa-Konzentrationen konnte eine Verbesserung im Wachstumsverhalten beobachtet werden. Dennoch wurde der Wert der Kontrollkultur selbst mit einer Konzentration von 0,25 mM pAzpa im Medium nicht erreicht. Bei dieser Konzentration wuchsen die Stämme nach 72 h auf eine OD600 von 1,3 und gingen dann in die stationäre Phase über. Vergleicht man nun die Ergebnisse aus **Abb. 28A** und **28C**, so können die in **28C** beobachteten dramatischen Wachstumsdefizite nicht alleine auf die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa zurückgeführt werden. Aus diesem Grund wurde für den Stamm 2YA6,64C1 derselbe Versuch nochmal durchgeführt, mit dem Unterschied, dass pBzpa anstatt pAzpa in unterschiedlichen Konzentrationen dazugegeben wurde. Damit ließ sich die Fragestellung beantworten, inwiefern die Kombination aus dem orthogonalen Pärchen und der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa zu dem beobachteten Wachstumsverhalten führte. Da das orthogonale Pärchen konstitutiv exprimiert wird, werden auch die natürlich vorkommenden Amber-Stopp-Codons supprimiert, wenn zugleich pAzpa im Medium vorliegt. Das kann sowohl zu

ERGEBNISSE

toxischen Nebenprodukten, wie auch zu einem Dosiseffekt für manche Proteine führen. Das Ergebnis für diesen Versuch ist in der **Abb. 28D** gezeigt. Gegenüber der Kontrolle ohne jegliche Zugabe, zeigten die Kulturen mit Zugabe von pBzpa nur die Wachstumsverzögerung hervorgerufen durch die Zugabe von 5 mM NaOH. Die nicht-kanonische Aminosäure pBzpa ist somit kein Substrat für die p-Azidophenylalanyl-tRNA-Synthetase. Offensichtlich werden natürlich vorkommende Amber-Stopp-Codons mit pAzpa supprimiert, was sich sichtlich negativ auf das Zellwachstum auswirkt (**Abb. 28C**).

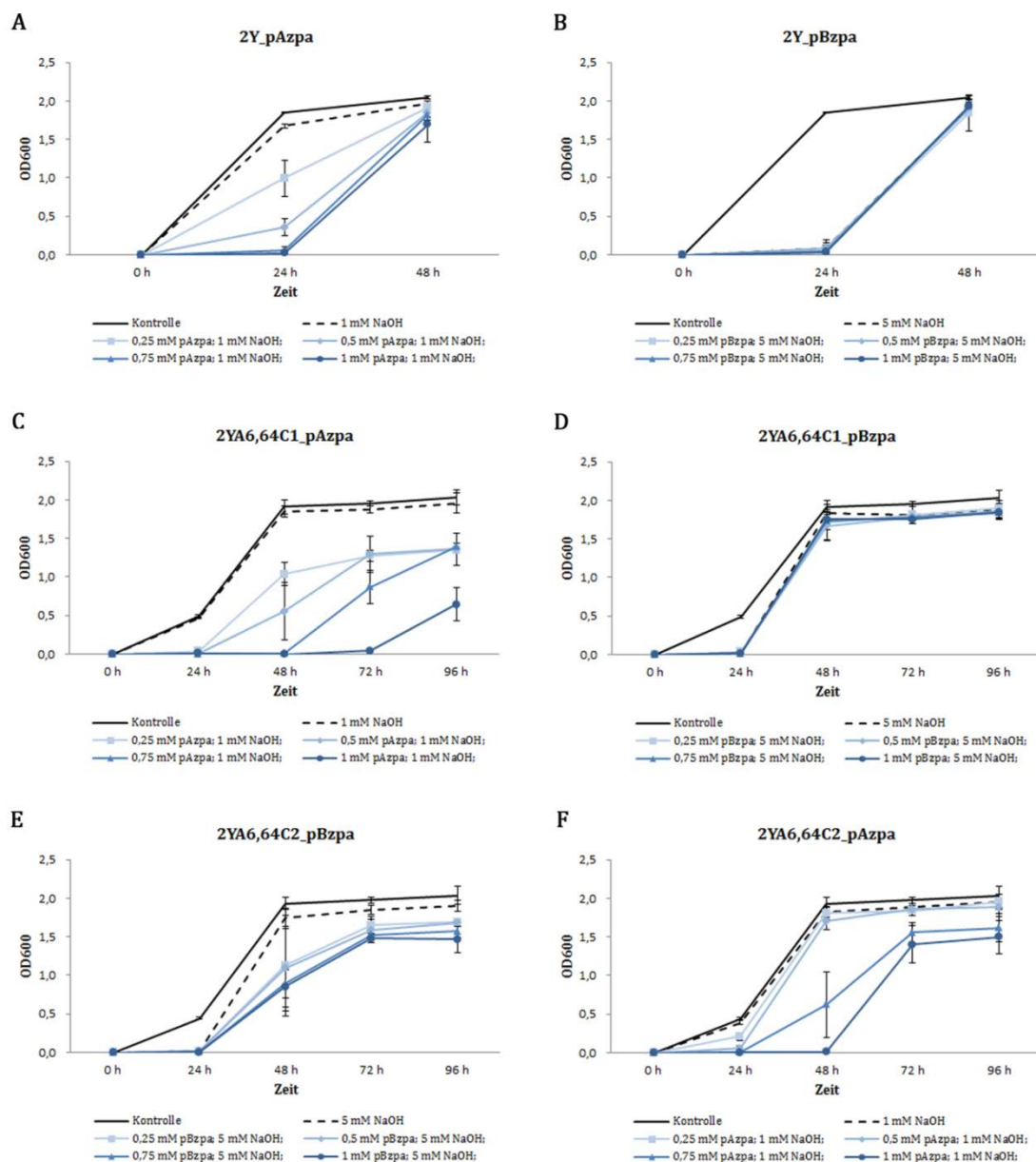


Abbildung 28: Wachstumsverhalten von *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von den nicht-kanonischen Aminosäuren und des orthogonalen Pärchens

A: Gezeigt ist das Wachstumsverhalten für den Ausgangsstamm 2Y in Gegenwart von unterschiedlichen pAzpa-Konzentrationen im SC-Glukosemedium. Das Wachstum war mit steigender pAzpa-Konzentration um bis zu 24 h verzögert. Nach 48 h erreichten aber alle Stämme eine ähnliche optische Dichte.

B: Dasselbe Experiment wie in **A** nur mit der nicht-kanonischen Aminosäure pBzpa. Hier zeigte die Aminosäure selbst keinen Effekt auf das Wachstumsverhalten. Die Wachstumsverzögerung, die hier beobachtet werden konnte, war auf die NaOH-Zugabe zurückzuführen.

C: Zu sehen ist das Wachstumsverhalten für den 2YA6,64C1-Stamm. Dieser Stamm exprimiert konstitutiv die p-Azidophenylalanyl-tRNA-Synthetase. Mit steigender pAzpa-Konzentration im Medium verzögerte sich das Wachstum des Stammes drastisch. Diese drastische Verzögerung wurde auf die Kombination aus pAzpa und des orthogonalen Pärchens zurückgeführt. Bestätigt wurde der Effekt durch das Experiment in der Abbildung **D**. Wird dem Medium statt pAzpa die nicht-kanonische Aminosäure pBzpa dazugegeben, wuchs der Stamm vergleichbar zum Wildtyp in **B**.

E: Wachstumsverhalten für den Stamm 2YA6,64C2 in Abhängigkeit der pBzpa-Konzentration. Dieser Stamm exprimiert konstitutiv die p-Benzoylphenylalanyl-tRNA-Synthetase. Die Zugabe von pBzpa zum Medium bewirkte ein verlangsamtes Wachstum, welches nur eine leichte Konzentrationsabhängigkeit. Wenn statt pBzpa die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa zugegeben wurde (**F**), konnte ein vermindertes Wachstum für die Konzentrationen 0,75 und 1 mM beobachtet werden.

Nach demselben Versuchsaufbau wurde auch der Stamm 2YA6,64C2 auf sein Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von den nicht-kanonischen Aminosäuren analysiert (**Abbildung 28E** und **28F**). Auch für die p-Benzoylphenylalanyl-tRNA-Synthetase war ein gehemmt und konzentrationsabhängiges Wachstumsverhalten für die Kulturen zu beobachten, denen die nicht-kanonische Aminosäure pBzpa zugesetzt wurde (**Abbildung 28E**). Dieses war aber nicht so ausgeprägt wie für den Stamm 2YA6,64C1 und pAzpa (**Abbildung 28C**). Die optische Dichte der Kontrollkultur wurde auch hier nicht erreicht. Wenn statt pBzpa die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurde, war für die Konzentrationen 0,75 mM und 1 mM eine drastischere Wachstumsverzögerung wie bei der Zugabe gleicher Konzentrationen pBzpa zu beobachten (**Abbildung 28F**).

1.9.2 Quervernetzung in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer

Die Quervernetzung zweier Interaktionspartner mittels nicht-kanonischer Aminosäure wird durch UV-Licht induziert. Welche Rolle dabei die Belichtungsdauer spielt, zeigt die **Abbildung 29**. Die Zellen wurden nach 24 stündiger Induktion der Aha1 I64X Expression aufgeteilt und unterschiedlich lange mit UV-Licht belichtet. Je länger die Zellen mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm belichtet wurden, desto größer war auch die Dimerausbeute. Die maximale Belichtungsdauer betrug 120 min, längere

ERGEBNISSE

Belichtungszeiten wurden nicht getestet. Dieses Experiment zeigt, dass nach der Belichtung mit UV-Licht p-Azpa nicht schlagartig sondern vielmehr kontinuierlich abreagiert und somit eine längere Belichtung stets zu mehr Dimerausbeute führt.

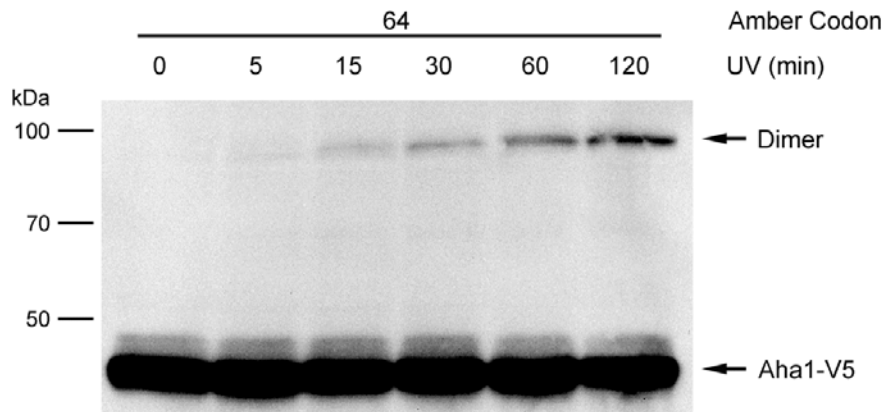


Abbildung 29: Quervernetzung in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer

Stamm 2YA6,64C1 wurde unterschiedlich lange mit UV-Licht (365 nm) belichtet, Gesamtprotein isoliert und im Western Blot mittels anti-V5 Antikörper ausgewertet.

Durch die längere Belichtungszeit konnten keine zusätzlichen Dimere weder im Gesamtproteinlysat, noch nach der Anreicherung mittels V5-Tag beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

1.9.3 Quervernetzung in Abhängigkeit von dem Belichtungszeitpunkt nach Induktion der Expression

AHA1 steht unter der Kontrolle des starken *GAL1*-Promotors. Wie stark das Transkriptionslevel und damit auch das Proteinlevel nach der Induktion mit Galaktose anstieg und ab welchem Zeitpunkt nach der Induktion die ersten quervernetzten Dimere ausgebildet werden konnten, zeigt die **Abbildung 30**. Zum Vergleich wurde die Probe nach 24 h Induktion aufgetragen, zu diesem Zeitpunkt wurden alle in dieser Arbeit beschriebenen Quervernetzungsexperimente durchgeführt.

Die Expression von Aha1 I64X wurde in SC-Galaktosemedium induziert, zu definierten Zeitpunkten wurden Zellen der Kultur entnommen und 2 h mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm belichtet. Die gewonnen Gesamtproteinlysate wurden im Western Blot mit anti-V5 Antikörper ausgewertet. Bereits nach 2 h Induktion konnte Aha1 I64X im Western Blot detektiert werden. Eine detektierbare Menge an quervernetztem Dimer

wurde erst nach 5 h detektiert. Die Menge an Dimer stieg dabei kontinuierlich bis 11 h nach Induktion an und hatte zu diesem Zeitpunkt eine vergleichbare Intensität wie nach 24 h. Somit ist eine Belichtung bereits nach 11 h Induktion mit ähnlichen Proteindimerausbeuten durchführbar.

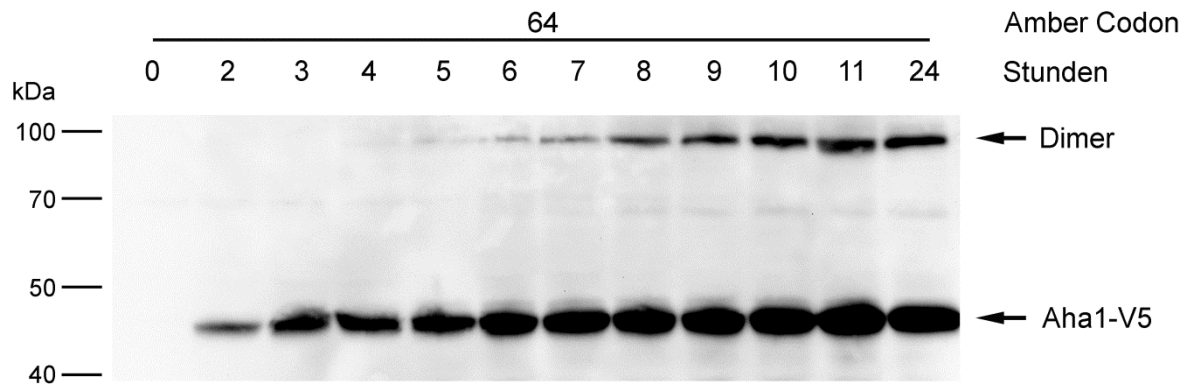


Abbildung 30: Quervernetzung in Abhängigkeit von dem Belichtungszeitpunkt nach der Induktion der Aha1 I64X Expression

Die Expression von Aha1 I64X wurde in SC-Galaktosemedium mit 1 mM pAzpa induziert, Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion 2 h belichtet, Proteine isoliert und im Western Blot mittels anti-V5 Antikörper ausgewertet. Sowohl die Menge an Aha1 I64X wie auch an quervernetztem Dimer steigt über die Zeit an. Eine detektierbare Menge an Dimer in 75 µg Gesamtprotein konnte bereits 5 h nach der Induktion beobachtet werden.

1.9.4 Quervernetzung in Abhängigkeit von der Konzentration der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa

Über den Wachstumsverlauf wurde gezeigt (Kapitel 1.9.1), dass in Abhängigkeit von der Konzentration der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa im Medium und gleichzeitiger Expression des orthogonalen Pärchens, Wachstumsdefizite auftreten. In diesem Kapitel soll geklärt werden, ob die Ausbeute an quervernetzten Dimer mit der pAzpa Konzentration im Induktionsmedium korreliert.

Dafür wurde die Expression von Aha1 I64X mit unterschiedlichen pAzpa Konzentrationen (0; 0,25; 0,5; und 1 mM) induziert, nach 24 h die Quervernetzung mit UV-Licht durchgeführt und Gesamtproteinlysate im Western Blot ausgewertet. Es konnte gezeigt werden, dass die Dimerausbeute in Abhängigkeit zu der pAzpa Konzentration im Medium steht (**Abbildung 31**). Für die 1 mM pAzpa Konzentration konnte bedeutend mehr Dimer ausgebildet werden. Was das Monomer betrifft, so kann

ERGEBNISSE

bei einer Beladung von 75 µg Gesamtprotein kein Unterschied in der Expressionsrate ausgemacht werden.

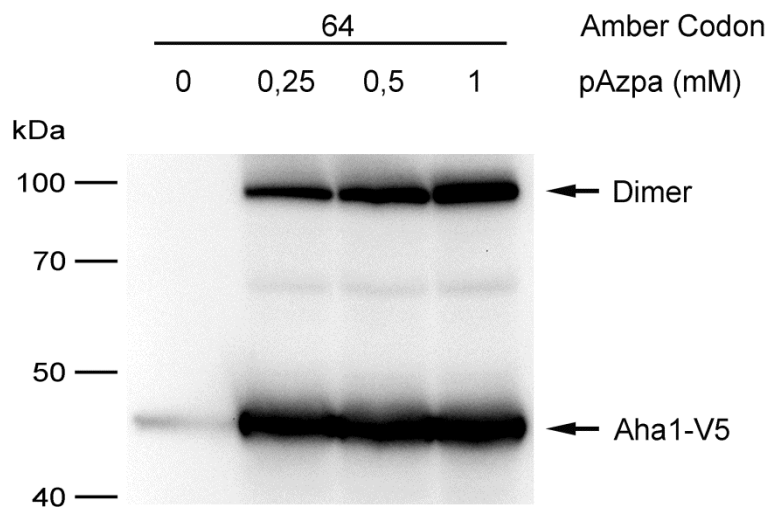


Abbildung 31: Quervernetzung in Abhängigkeit von unterschiedlichen pAzpa-Konzentrationen

Die Expression von Aha1 I64X im Stamm 2YA6,64C1 wurde in SC-Galaktosemedium mit unterschiedlichen Konzentrationen pAzpa induziert, die Zellen mit UV-Licht belichtet, Gesamtprotein isoliert und im Western Blot mittels anti-V5 Antikörper ausgewertet. Es ist zu beobachten, dass mit einer höheren Konzentration die Ausbeute an quervernetztem Dimer steigt.

Unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes konnte eine *in vivo* Methode zur Studie von Protein-Protein Wechselwirkungen in *S. cerevisiae* etabliert werden. Dabei wurde für das Modellprotein Aha1 gezeigt, dass die *in vitro* beschriebene Domäne anders als erwartet *in vivo* eine Rolle zur Ausbildung eines Aha1 Homodimers spielt.

2. Etablierung einer Methode zur Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen

Für das Verständnis der Rolle von Transkriptionsfaktoren in der zell- und gewebsspezifischen Genexpression, sind Methoden zur globalen Identifizierung von DNA-Bindestellen *in vivo* unerlässlich. Mit Methoden wie ChIP-on-chip oder ChIP-sequencing konnte bereits für viele Zielproteine die Bindestelle auf der DNA lokalisiert werden. Ein Nachteil beider Methoden ist jedoch die unspezifische Quervernetzung mit Formaldehyd. Hierbei werden alle in räumlicher Nähe zueinander stehenden Proteine und DNA-Abschnitte quervernetzt. Dadurch kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob es sich beim Zielprotein um ein direkt an die DNA-bindendes Protein handelt oder nicht. Außerdem führt Formaldehyd zur unspezifischen Kreuzvernetzung der Zielproteine mit nahgelegenen nicht an der Bindung beteiligten DNA-Abschnitten und somit zu einem signifikanten Ausmaß an falsch positiven Ergebnissen. Weitere *in vitro* Methoden, wie die DNA-Footprint-Analyse, sind anschließend für eine genauere Charakterisierung der Bindestellen notwendig. In dieser Arbeit soll daher unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes und der nicht-kanonischen Aminosäure *p*-Azidophenylalanin (pAzpa) eine spezifische Methode zur Lokalisation von DNA-bindenden Proteinen *in vivo* am Beispiel des Transkriptionsfaktors Gal4 etabliert werden.

Das Prinzip der zu etablierenden Methode zur genomweiten Kartierung von DNA-Bindestellen beliebiger DNA-bindender Transkriptionsfaktoren ist in der **Abbildung 32** dargestellt. Zuerst wird mit Hilfe des erweiterten genetischen Codes in *S. cerevisiae* pAzpa an eine zuvor definierte Position in der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 eingebaut. Dieses mutagenisierte Gal4 bildet mit einem wildtypischen, endogen exprimierten oder einem mutagenisierten Gal4 ein Homodimer aus. Dieses Dimer gelangt in den Zellkern und bindet an seine spezifische DNA-Konsensussequenz im Promotorbereich von Genen, welche für den Galaktosemetabolismus wichtig sind. Zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Induktion der Expression werden die Zellen mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm belichtet. Dadurch wird die Photolyse der Azidogruppe im Gal4-Protein induziert. Wenn sich das entstandene Radikal in räumlicher Nähe zur DNA befindet, wird eine kovalente Bindung zwischen Gal4 und der DNA ausgebildet.

ERGEBNISSE

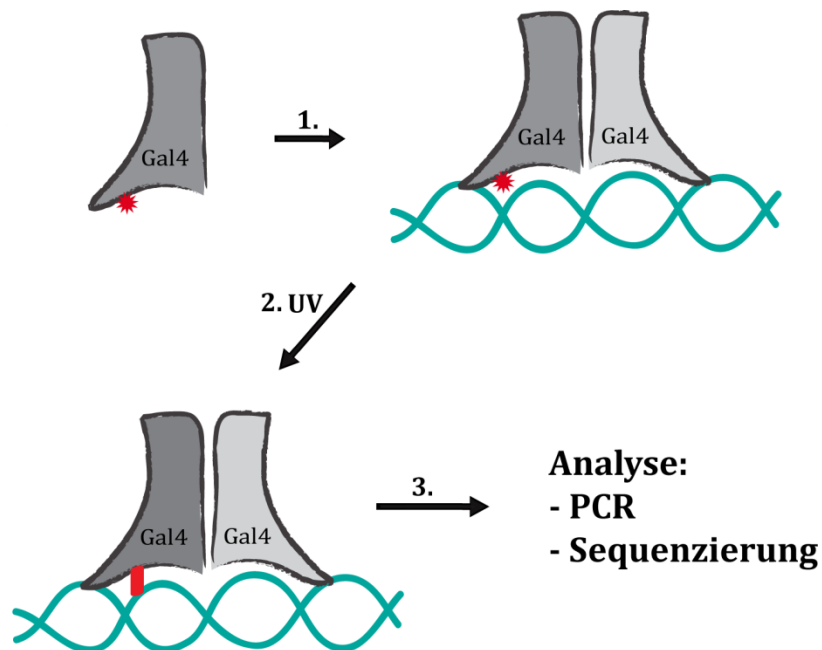


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Strategie zur Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen

1. Unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes wird das Gal4-Protein in *S. cerevisiae* mit pAzpa (roter Stern) an einer definierten Position innerhalb der DNA-Bindedomäne exprimiert. Dieses Gal4-Protein verhält sich *in vivo* wildtypisch und bindet als Homodimer an eine spezifische Konsensussequenz im Promotor von Genen, die für den Galaktosemetabolismus wichtig sind. 2. Nach UV-Belichtung entsteht eine kovalente Bindung (roter Strich) zwischen Gal4-Protein und der DNA-Konsensussequenz. 3. Nach der Isolation und Fragmentierung der DNA wird eine klassische ChIP durchgeführt und die so präzipitierten DNA-Fragmente analysiert.

Die DNA wird anschließend isoliert, mit Restriktionsenzymen oder Ultraschall fragmentiert und eine klassische Chromatinimmunpräzipitation durchgeführt. Die angereicherten DNA-Fragmente sollen daraufhin durch PCR auf eine Anreicherung der für Gal4 erwarteten DNA-Sequenzen gegenüber Negativkontrollen überprüft werden. Im Gegensatz zu der klassischen ChIP sollen mit diesem Ansatz die DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren spezifisch mit der DNA-Sequenz, an die sie zum Zeitpunkt der Belichtung gebunden sind, quervernetzt werden. Auch sollen aufgrund der schnellen Abreaktion der photoreaktiven Gruppe entweder zu einer kovalenten Bindung mit der DNA oder mit einem kleinen Molekül in der Nähe falsch positive Signale reduziert werden.

2.1 GAL4-Mutagenese

Für die Auswahl der Positionen zum Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa in die DNA-Bindedomäne von Gal4 wurde eine Kristallstruktur zur Hilfe genommen (**Abbildung 33** und **Abbildung 39** im Anhang). Sie wird unter dem Namen 1D66 auf PDB geführt und zeigt die Gal4-DNA-Bindedomäne (Aminosäuren 8 - 64) als ein an die DNA-Konsensussequenz (CGGNNNNNNNNNNCCG) gebundenes Homodimer. Folgende Kriterien für die Auswahl der Positionen zur Mutagenese wurden festgelegt: Die für pAzpa auszutauschende Aminosäure darf nicht an einer direkten Bindung mit der DNA beteiligt sein und die auszutauschende Aminosäure sollte sich möglichst in räumlicher Nähe zur DNA befinden, um die Wahrscheinlichkeit einer Quervernetzung mit der DNA zu erhöhen.

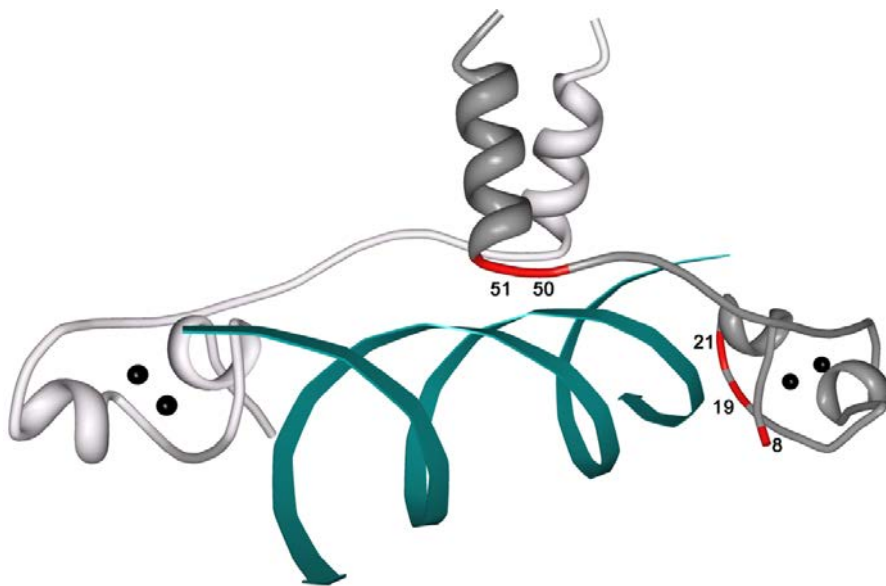


Abbildung 33: Kristallstruktur des Gal4/DNA-Komplexes

Dargestellt ist die Kristallstruktur der Gal4-DNA-Bindedomäne (Aminosäuren 8 - 64), die als Homodimer an die DNA-Konsensussequenz gebunden ist. Die DNA-Bindedomäne von Gal4 hat ein Zink-Finger-Motiv. Von jeder DNA-Bindedomäne werden zwei Zinkionen (schwarz) komplexiert [121]. Die Positionen für den Einbau von pAzpa sind rot dargestellt und nummeriert. Die Kristallstruktur wird auf PDB unter dem Namen 1D66 geführt.

Mit diesen Kriterien wurden die Positionen 8, 19, 21, 50 und 51 ausgewählt und das korrespondierende Codon in der *GAL4*-Sequenz im pYES2/CT-Vektor zum Stopp-Codon TAG mutagenisiert. Zusätzlich wurden die Gal4-Varianten C-terminal an ein V5-Epitop fusioniert, um sie immunologisch nachweisen oder präzipitieren zu können.

2.2 Expression des Gal4-Fusionsproteins

Die Induktion der Expression der Gal4-Varianten in *S. cerevisiae* erfolgte in SC-Galaktosemedium, welches mit pAzpa auf eine Endkonzentration von 1 mM supplementiert wurde. Die Inkubation in diesem Medium betrug vier Stunden. Danach wurden die Zellen aufgeschlossen und die Proteine isoliert. In der **Abbildung 34** ist das Ergebnis für die Suppression des Stopp-Codons TAG in An- und Abwesenheit der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa in einem Western Blot gezeigt. Alle Gal4-Varianten konnten in Anwesenheit von pAzpa deutlich exprimiert werden. Ohne die Zugabe von pAzpa wurde zu einem geringen Maß eine Suppression des Stopp-Codons mit kanonischen Aminosäuren beobachtet. Auch wurde eine Abhängigkeit von der Position des Stopp-Codons in der Sequenz auf das Proteinlevel in der Zelle festgestellt. Das wildtypische Gal4-Protein ohne Stopp-Codon konnte unabhängig von pAzpa exprimiert werden.

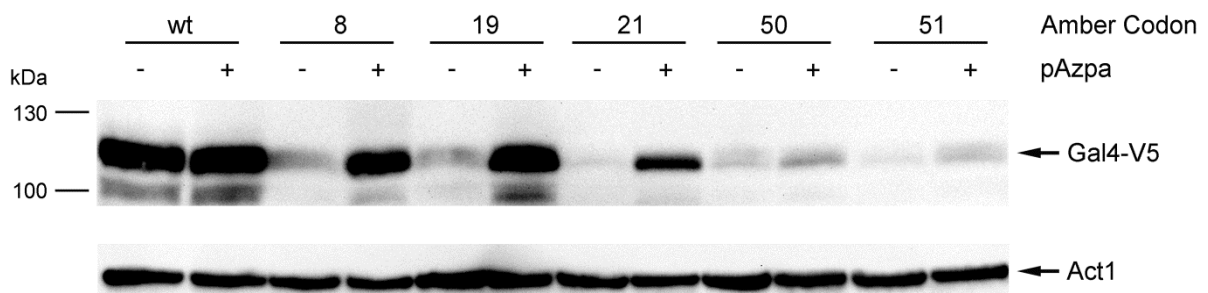


Abbildung 34: Expression der Gal4-Varianten in Abhängigkeit von pAzpa

Detektion der pAzpa abhängigen Gal4-Expression im Western Blot mittels anti-V5 Antikörper. Die Zugabe der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa zum Medium führte zur Suppression des Stopp-Codons TAG und der damit verbundenen Expression des mutagenisierten Gal4-Proteins. Das Proteinlevel war für die einzelnen Positionen sehr unterschiedlich. Ohne die Zugabe von pAzpa konnte nur eine schwache Hintergrundsuppression mit natürlichen Aminosäuren beobachtet werden. Das wildtypische an das V5-Epitop fusionierte Gal4 diente als Kontrolle und wurde unabhängig von pAzpa exprimiert. Das von der Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht dieses wildtypischen Gal4 beträgt ca. 104 kDa. Act1 diente als Ladekontrolle und wurde mittels anti-Act1 Antikörper detektiert.

2.3 Auswertung der Quervernetzungsexperimente

Nachdem gezeigt wurde, dass die Gal4-Varianten in Abhängigkeit von pAzpa exprimiert werden konnten, wurden Quervernetzungsexperimente durchgeführt. Nach einer 4-

stündigen Induktion der Expression von Gal4 E8X und Gal4 L19X in SC-Galaktosemedium mit pA_{Zpa} wurden die Zellen 5 min mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm belichtet. Die DNA wurde isoliert, fragmentiert und eine Chromatinimmunpräzipitation mit anti-V5 Antikörper durchgeführt. Gal4 hat zwei Bindestellen im Promotorbereich von *GAL7*. Die Anreicherung dieser Sequenz gegenüber DNA-Sequenzen, die über keine Konsensussequenz für das Gal4-Protein verfügen, wurde als Maß für die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Gal4 und DNA verwendet.

Um positive Stämme, bei denen es zur Quervernetzung von Gal4 mit der DNA nach UV-Belichtung kam, schnell selektionieren zu können, wurde ein Slot-Blot Verfahren angewandt. Dabei wurde die isolierte DNA auf eine Nitrocellulosemembran mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm übertragen und kovalent mit dieser quervernetzt. Die Detektion von an die DNA quervernetzten Gal4 erfolgte mit monoklonalem anti-V5 Antikörper.

Die Tatsache, dass Gal4 L19X gegenüber Gal4 E8X gebunden immunologisch auf der Membran detektiert wurde, ist ein Hinweis auf dessen Bindung an die DNA (**Abbildung 35**).

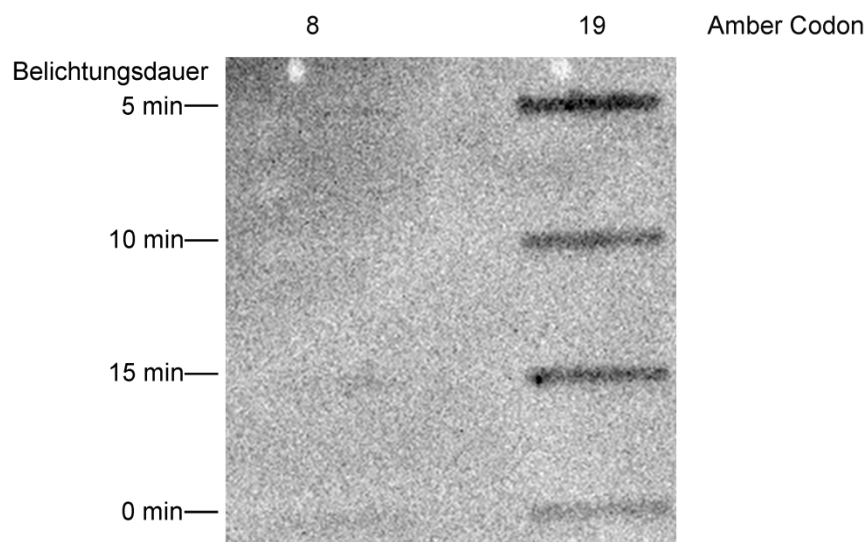


Abbildung 35: Slot Blot-Analyse zur Detektion von Quervernetzungsereignissen

Slot Blot-Analyse mittels anti-V5 Antikörper. Die Expression von Gal4 E8X und Gal4 L19X wurde induziert, anschließend die Zellen mit UV-Licht belichtet, DNA isoliert, restriktionsverdaut und auf Nitrocellulose gebロットet. Gal4 L19X konnte gegenüber Gal4 E8X in Verbindung mit der DNA isoliert und detektiert werden. Neben der Positionsabhängigkeit konnte auch eine UV-Abhängigkeit der Signalstärke beobachtet werden.

ERGEBNISSE

Dabei zeigten die belichteten Proben für Gal4 L19X gegenüber der Negativkontrolle (ohne Belichtung) ein deutlich stärkeres Signal, was auf eine Belichtungszeit abhängige Quervernetzung hindeutet. Oder anders ausgedrückt, wenn die Zellen zuvor mit UV-Licht belichtet wurden, dann wurde mehr Gal4 L19X gebunden an die DNA isoliert. Während Gal4 E8X, obwohl es ähnlich stark in Abhängigkeit von pAzpa wie das Gal4 L19X exprimiert werden konnte (siehe **Abbildung 34**), dagegen nicht mit der DNA quervernetzt und angereichert wurde.

Die folgenden Chromatin-Immünpräzipitations (ChIP)-Experimente wurden mit dem Gal4 L19X durchgeführt.

Spezifische und unspezifische Chromatin-Immünpräzipitation

Nach der Induktion von Gal4 L19X wurden die Zellen 5 min mit UV belichtet, die DNA isoliert und ca. 1,6 mg der isolierten DNA mit Ultraschall fragmentiert. Diese DNA wurde auf zwei Ansätze verteilt. Im ersten Ansatz wurde eine spezifische ChIP mit anti-V5, im zweiten Ansatz eine unspezifische mit anti-cMyc Antikörper durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einer 1%igen SDS-Lösung. Anschließend wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt und die Amplikons nach verschiedenen Zyklenzahl im 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Die spezifische *GAL7*-Promotorsequenz konnte gegenüber der unspezifischen *ACT1*-Sequenz mit dem anti-V5 Antikörper angereichert werden (**Abbildung 36**).

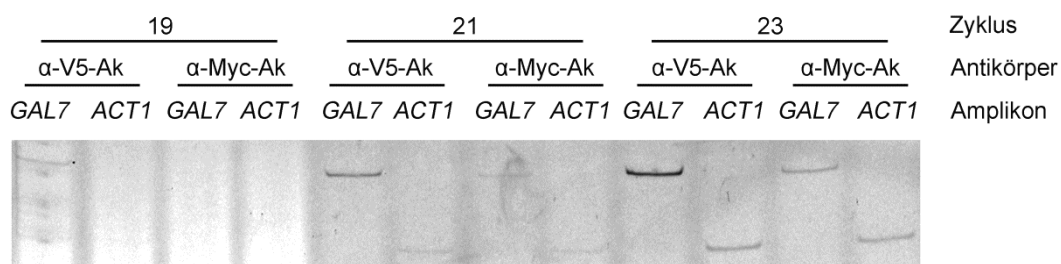


Abbildung 36: Spezifische Präzipitation der *GAL7*-Promotorsequenz

Nach der Chromatin-Immünpräzipitation wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Bei der spezifischen Präzipitation mit anti-V5 Antikörper wurde die spezifische *GAL7*-Promotorsequenz gegenüber der *ACT1*-Sequenz (Negativkontrolle) angereichert und in einem früheren PCR-Zyklus (19) gegenüber der Negativkontrolle (21) detektiert. In der unspezifischen Präzipitation mit anti-Myc-Antikörper konnte die *GAL7*-Promotorsequenz gegenüber der *ACT1*-Sequenz nicht angereichert werden

Die *GAL7*-Sequenz wurde bereits im 19. PCR-Zyklus deutlich als Amplicon detektiert.

Dagegen wurde das *ACT1*-Amplicon erst im 21. PCR-Zyklus schwach detektiert. Dass es sich hierbei um ein unspezifisches Hintergrundsignal handelte, wurde durch die Analyse mit dem anti-cMyc Antikörper, welche als Negativkontrolle diente, deutlich. Hier zeigten sich beide Amplicons zum ersten Mal im 21. PCR-Zyklus und waren von ihrer Signalintensität gleich stark wie die *ACT1*-Amplicon aus der anti-V5 Chromatin-Immunpräzipitation.

Als nächstes wurde eine spezifische Elution mit V5-Peptid mit einer unspezifischen Elution durch Protease K verglichen. Dafür wurde der Stamm 2YA1,19C1 nach der Induktion von Gal4 L19X, 5 min belichtet, DNA isoliert, ca. 300 µg der isolierten DNA mit *RsaI* fragmentiert und anschließend eine CHIP mit anti-V5 Antikörper durchgeführt. Die eine Hälfte der Beads wurde mit V5-Peptid und die andere mit Protease K eluiert. Die präzipitierten *GAL7*- und *ACT1*-Fragmente wurden mit einer semiquantitativen PCR amplifiziert und im 8%igen Polyacrylamidgel ausgewertet.

Mit der spezifischen Elution wurde in den PCR-Zyklen 23 und 25 nur das spezifische *GAL7*-Amplicon detektiert (**Abbildung 37**). Das unspezifische *ACT1*-Amplicon konnte erst in den späteren Zyklen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurde wie erwartet mit der unspezifischen Elution durch Protease K die Elution der unspezifischen *ACT1*-Sequenz begünstigt. Dieses Ergebnis zeigte eindeutig, dass die *GAL7*-Promotorsequenz aufgrund des kovalent an die Sequenz quervernetzten Gal4 L19X angereichert wurde.



Abbildung 37: Vergleich von spezifischer und unspezifischer Elution

Nach der Chromatin-Immunpräzipitation mit anti-V5 Antikörper wurde ein Ansatz mit V5-Peptid und der andere mit Protease K eluiert. Anschließend wurde eine semiquantitative PCR durchgeführt. Die *GAL7*-Promotorsequenz konnte gegenüber der *ACT1*-Sequenz (Negativkontrolle) mit V5-Peptid spezifisch eluiert werden. Mit Protease K wurden die unspezifischen *ACT1*-Sequenzen wie erwartet stärker eluiert. Dennoch war auch mit der unspezifischen Elution eine Anreicherung der *GAL7*-Promotorsequenz deutlich zu sehen.

ERGEBNISSE

Um auszuschließen, dass es sich bei dem Vergleich zwischen *GAL7*- und *ACT1*-Sequenz um ein falsch-positives Ergebnis handelt, welches auf unterschiedliche Primereffizienzen zurückzuführen wäre, wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. Dafür wurde der Stamm 2YA1,19C1 nach der Induktion von Gal4 L19X, 5 min belichtet, DNA wurde isoliert, ca. 300 µg der isolierten DNA wurde mit *RsaI* fragmentiert und anschließend eine ChIP mit anti-V5 Antikörper durchgeführt. Die Elution erfolgte spezifisch mit V5-Peptid. In den PCR-Reaktionsansatz wurden neben den Primern für die Amplifikation der spezifischen *GAL7*-Sequenz auch die Primer für die Amplifikation von zwei Negativkontrollsequenzen (*ACT1* und *GAL7neg*) dazugegeben. Die *GAL7neg*-Sequenz ist das nächste „downstream“ von der *GAL7*-Sequenz gelegene *RsaI*-Restriktionsfragment, welches zudem gleich groß ist. Als Kontrolle für die Primereffizienz wurde eine Multiplex-PCR mit 2 ng *RsaI* fragmentierter genomischer DNA als Template durchgeführt.

Die *GAL7*-Promotorsequenz wurde gegenüber den beiden Negativkontrollsequenzen *ACT1*- und *GAL7neg* deutlich angereichert (**Abbildung 38**). Der Unterschied in der Signalintensität war in jedem Zyklus deutlich zu sehen. Die Amplicons für die beiden Negativkontrollsequenzen konnten erst 4 PCR-Zyklen später detektiert werden und waren in ihrer Intensität nahezu identisch. Die Multiplex-PCR mit der 2 ng *RsaI* fragmentierter DNA zeigte, dass die Primereffizienz der verwendeten Primerpaare ähnlich war.

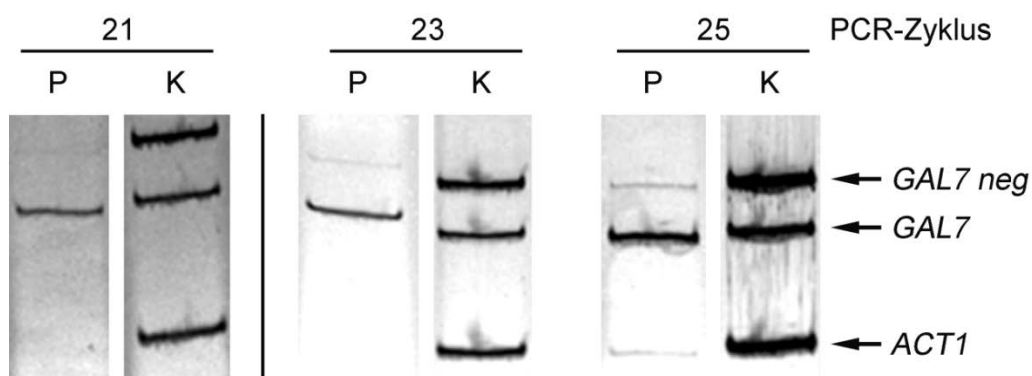


Abbildung 38: Multiplex-PCR mit präzipitierten DNA-Fragmenten

Nach der Chromatin-Immünpräzipitation mit anti-V5 Antikörper und spezifischer Elution mit V5-Peptid wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. Die spezifische *GAL7*-Promotorsequenz wurde gegenüber den beiden Negativkontrollen deutlich angereichert. Die Multiplex-PCR mit den 2 ng *RsaI* fragmentierter DNA zeigte, dass die Primereffizienz für alle drei Sequenzen vergleichbar war.

P = Probe, **K** = Kontrolle, 23+25 im selben Gel aufgetrennt.

Mit diesem in der **Abbildung 38** und den zuvor gezeigten Ergebnissen konnte eindeutig die Anreicherung der für Gal4 spezifischen *GAL7*-Promotorsequenz belegt werden. Die Anreicherung dieser Sequenz zeigt auch gleichzeitig, dass eine kovalente Quervernetzung des Transkriptionsfaktors in Abhängigkeit von der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa und UV-Licht mit der DNA-Konsensussequenz *in vivo* möglich ist.

DISKUSSION

Die Nukleinsäure-Analytik hat in den letzten Jahren gewaltige Fortschritte gemacht. Vor allem die Methode, die unter dem Namen Next Generation Sequencing bekannt geworden ist, hat die Genetik, Evolutionsbiologie und Medizin revolutioniert. Noch nie war es so kostengünstig und zeitsparend möglich ganze Genome, Transkriptome und selbst epigenetische Veränderungen mit der Sequenziertechnologie zu analysieren [155-157]. Auch bei der Suche nach Biomarkern hat diese Technologie die Nukleinsäuren stark in den Focus gerückt. So sind viele genomweite Assoziationsstudien ins Leben gerufen worden, bei denen es darum geht, genetische Unterschiede zu identifizieren und mit einem bestimmten Phänotyp, wie z.B. einem Krankheitsbild zu assoziieren [158]. Bemerkenswert ist, dass sich die Sequenziertechnologie ohne das Potenzial richtig ausgeschöpft zu haben, erneut revolutioniert und in die nächste Generation geht. So verspricht die Sequenzierung durch eine Nanopore noch bessere Daten in kürzerer Zeit und einem Bruchteil der jetzigen Kosten zu generieren [159]. Auch die proteomweite Suche nach Biomarkern hat einen hohen Stellenwert. Zu den Hochdurchsatzmethoden in diesem Feld gehört die LC-MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung). Hierbei werden die Proteine zuerst mithilfe der Flüssigchromatographie aufgetrennt und anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert. Um auch schwach abundante Proteine zu identifizieren, können die stark abundanten Proteine im Vorfeld immunologisch abgereichert werden [160].

Es ist festzustellen, dass Hochdurchsatzmethoden im Sinne der personalisierten Medizin immer stärker in den Focus der Wissenschaft rücken werde. Auch, dass dabei viele neue Biomarker für die Diagnose und Früherkennung von Krankheiten identifiziert werden, ist unbestritten. Es wäre ein Fehler, wenn dabei übersehen werden würde, dass ein *de novo* identifizierter Biomarker nichts anderes als ein Faktor ist, welcher den einen Zustand von einem anderen unterscheidet. Um eine Krankheit behandeln zu können, ist seine molekulare Charakterisierung für die Entwicklung verbesserte oder auch neuartiger Therapieansätze unumgänglich. Deswegen ist es von enormer Bedeutung, dass neben den Hochdurchsatzmethoden auch gleichzeitig neue Methoden zur Charakterisierung der Biomarker entwickelt werden. Diese Arbeit soll mit der Entwicklung von neuen *in vivo* Methoden zur Studie von Protein-DNA- und Protein-Protein-Wechselwirkungen dazu beitragen, Proteine in ihrem natürlichen Kontext

besser zu verstehen.

1. **Wie orthogonal ist der erweiterte genetische Code in *S. cerevisiae*?**

Um den genetischen Code eines Organismus zu erweitern wurden die Prinzipien der Proteinbiosynthese angewandt. Dafür wird eine Aminosäure benötigt, welche von außen aufgenommen oder biosynthetisiert werden kann, ein mit kanonischen Aminosäuren nicht in Konflikt stehendes Codon, eine spezifische tRNA und eine spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS). Bei der Etablierung eines solchen Systems wurden mehrere Voraussetzungen postuliert. Erstens, die nicht-kanonische Aminosäure muss metabolisch stabil sein, in ausreichender Menge in die Zelle aufgenommen sowie vom Ribosom und den Elongationsfaktoren toleriert werden. Zusätzlich darf sie kein Substrat für eine der endogenen aaRS sein. Zweitens, das Codon für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure darf nicht von den endogenen tRNAs supprimiert werden. Drittens, das Pärchen bestehend aus aaRS und der tRNA ist sowohl spezifisch für die nicht-kanonische Aminosäure als auch funktionell im Wirtsorganismus und muss orthogonal gegenüber den endogenen aaRS und tRNAs sein [53]. In *Escherichia coli* wurde der genetische Code zuerst erweitert. Hier wurde auch der Begriff „Orthogonalität“ im Zusammenhang mit dem erweiterten genetischen Code definiert [56]. Demnach spricht man von einer orthogonalen tRNA, wenn sie nicht von den endogenen aaRS erkannt wird, sie funktionell bei der Translation ist und keines der für kanonische Aminosäuren kodierenden Codons erkennt. Eine orthogonale aaRS erkennt nur die orthogonale tRNA und belädt sie ausschließlich mit der nicht-kanonischen Aminosäure. Nach dieser Definition wären die nicht-kanonischen Aminosäuren und das Amber-Stopp-Codon von der Orthogonalität ausgeschlossen. Der Begriff „Orthogonalität“ kann auch breiter, wie durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) geschehen, ausgelegt werden. In ihrer Stellungnahme zur Synthetischen Biologie wird der Begriff wie folgt definiert: *„Bei der Konstruktion neuartiger Biosysteme spielt die Komplexität eine zentrale Rolle: Neu eingebrachte Moleküle oder Schaltkreise interagieren mit dem bestehenden System. Um möglichst unabhängig voneinander funktionierende Bausteine zu integrieren, verfolgt man das Konzept orthogonaler Biosysteme. Ein möglicher Ertrag ist eine Verbesserung der biologischen Sicherheit. Orthogonalität*

DISKUSSION

bedeutet in diesem Zusammenhang die freie Kombinierbarkeit unabhängiger Bauteile und ist ein technikwissenschaftliches Konstruktionsprinzip, das unter anderem in der Informatik eine wichtige Rolle spielt. Die mit Orthogonalität verbundene Strategie hat zum Ziel, Teilsysteme zu verändern, ohne gleichzeitig andere Teilsysteme erheblich zu stören. Die Verwirklichung von Orthogonalität in biologischen Systemen wird als Voraussetzung für eine Synthetische Biologie im Sinne gezielter Eingriffe gesehen, die über den rein empirischen Ansatz hinausgehen und die nicht in der zellulären Komplexität gefangen sind. Um unabhängig voneinander funktionieren zu können, sollten orthogonale Teilsysteme möglichst „unsichtbar“ für den Rest der Zelle sein, also deren Wechselwirkung mit den natürlichen (Teil-)Systemen minimal beeinflussen“ [161]. Hiernach sollte oder muss jedes in das natürliche Biosystem integrierte „Bauteil“ oder „Teilsystem“ dem Begriff Orthogonalität gerecht werden. Für den erweiterten genetischen Code bedeutet das, dass neben der tRNA und der aaRS auch die nicht-kanonischen Aminosäuren und das mit ihnen supprimierte Codon orthogonal sein sollten.

In diesem Kapitel soll die Orthogonalität und die Verträglichkeit der einzelnen Komponenten des erweiterten genetischen Codes in *S. cerevisiae* diskutiert werden.

1.1 Der Einfluss der nicht-kanonischen Aminosäure

Viele nicht-kanonische Aminosäuren sind toxisch. Sie können aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit kanonischen Aminosäuren als Aminosäureantagonisten wirken und zu Stoffwechselstörungen führen. So kann die Arginyl-tRNA-Synthetasen die natürlich vorkommende nicht-kanonische Aminosäure Canavanin nicht von Arginin unterscheiden. Der Einbau in Proteine führt zur Falschfaltung und Verlust der Proteinfunktion [154]. Ein weiteres Beispiel für eine natürlich vorkommende nicht-kanonische Aminosäure ist Azaserin. Sie ist ein Glutamin-Analog und kann kompetitiv die Stoffwechselwege inhibieren, in denen Glutamin metabolisiert wird [153].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *p*-Azidophenylalanin konzentrationsabhängig einen negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten des YPH501 *S. cerevisiae*-Ausgangsstammes (*MATa/α*) hat (**Abbildung 28A**). Während die Kontrollen (ohne Zugabe oder mit Zugabe von 1 mM NaOH) bereits nach 24 h die stationäre Phase fast vollständig erreicht hatten, waren für die Kulturen, denen unterschiedliche *pAzpa*-Konzentrationen zugegeben wurden, eine konzentrations-

abhängige Hemmung der Zellteilung und somit geringere Zelldichten zu verzeichnen. Für die in der Literatur empfohlene Konzentration von 1 mM pAzpa [77] war dieser Effekt am stärksten ausgeprägt. Eine ähnliche Zelldichte wie die der Kontrollen wurde erst nach 48 h erreicht. Dagegen konnte ein konzentrationsabhängiger Unterschied in der Morphologie (Daten nicht gezeigt) und der Expression der Aha1-Varianten (**Abbildung 10**) nicht beobachtet werden. pBzpa musste aufgrund seiner schlechteren Löslichkeit in einem größeren 1 M NaOH-Volumen wie pAzpa zum Medium dazugegeben werden. Die höhere Zugabe an 1 M NaOH führte zu einem verzögerten Wachstumsverhalten der Zellen (siehe **Abbildung 28B**). Inwiefern pBzpa selbst einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Zellen zeigt, wurde nicht geprüft. Die Morphologie der Zellen im Medium mit pBzpa war wie schon für pAzpa unauffällig (Daten nicht gezeigt). Die hier beobachteten Wachstumseffekte könnten Stamm bedingt sein, denn die Gruppe um Peter G. Schultz hat für den Stamm SCY4 (*MATa*) keine Effekte im Zusammenhang mit der nicht-kanonischen Aminosäuren beobachtet. Für unterschiedliche nicht-kanonische Aminosäuren, darunter auch pAzpa, sehen sie selbst eine Konzentration von 3 – 5 mM als nicht bedenklich an [77]. Folgende Unterschiede können herausgearbeitet werden. Der SCY4-Stamm ist haploid und wurde genetisch verändert (Ausgangsstamm MJY125), wodurch dieser Stamm ein chimäres Protein exprimiert, infolgedessen verstärkt S-Adenosylmethionin und Methionin akkumuliert wird [162-164]. Auch wurde das Medium mit der nicht-kanonischen Aminosäure auf eine OD600 von 0,2 angeimpft. Dagegen ist der YPH501-Stamm diploid, enthält keine genetischen Manipulationen ausgenommen der Auxotrophiemarker und wurde im Medium mit der nicht-kanonischen Aminosäure in einer geringen Zellzahl, welche in etwa dem Animpfen aus einer Dauerkultur entspricht, angeimpft. Im Zusammenhang mit dem Modellprotein Gal4 wurde der Stamm INVSc1 verwendet. Auch für diesen Stamm wurden Wachstumsdefizite zurückzuführen auf das orthogonale System festgestellt. Ob nun verschiedene *S. cerevisiae*-Stämme unterschiedlich auf das orthogonale System reagieren oder der Effekt auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen ist, wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht genau geklärt. Dafür wäre der direkte Vergleich zu SCY4 notwendig gewesen. Da in dieser Arbeit neue Methoden zur Studie von Wechselwirkungen etabliert werden sollten, wurde bewusst wildtypische und weitverbreitete Laborstämme wie YPH501 und INVSc1 verwendet.

Für weitere Arbeiten mit dem Stamm YPH501 ist folgendes experimentelles Vorgehen für die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa denkbar. Die ersten Expressions- und

DISKUSSION

Quervernetzungsversuche für ein Zielprotein in *S. cerevisiae* sollten bei einer pAzpa-Konzentration von 0,25 mM durchgeführt werden. Das hat den Vorteil, dass die Zellen einem geringeren Stress ausgesetzt werden. Zu hoher Zellstress kann zur Störung von natürlichen Teilsystemen führen bzw. neue Teilsysteme aktivieren, wodurch sich die untersuchte *in vivo* Situation verändert kann. Wird ein quervernetztes Dimer beobachtet, so kann zum Zwecke eine größere Ausbeute die pAzpa-Konzentration erhöht werden. Eine stufenweise Erhöhung der pAzpa-Konzentration macht auch dann Sinn, wenn mit 0,25 mM pAzpa kein Dimer detektiert wird. Bei der Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen bietet sich eine Reduktion der pAzpa-Konzentration, aufgrund der zahlenmäßig begrenzten Anzahl der DNA-Konsensussequenzen eines bestimmten Transkriptionsfaktors an. Zudem kommt als Vorteil hinzu, dass die präzipitierten DNA-Sequenzen amplifiziert werden können.

In diesem Zusammenhang soll auch die Studie von Liu et al. erwähnt werden. Diese Gruppe hat sich mit der Fragestellung beschäftigt wie hohe Ausbeuten eines Zielproteins mit einem gleichzeitig möglichst geringen Einsatz der nicht-kanonischen Aminosäure in *E. coli* erreicht werden können. Sie haben entdeckt, dass durch eine Aufkonzentrierung der Zellen auf eine 10 - 25-fach höhere Dichte, vor der Zugabe der nicht-kanonischen Aminosäure, zu deutlich höheren Ausbeuten des Zielproteins führt. Gemessen an der Ausbeute konnten für dieselbe Menge an Zielprotein bis zu 93 % der nicht-kanonischen Aminosäure eingespart werden [165]. Der für *E. coli* vorgestellter Ansatz wäre auch für ein eukaryontischen System wie *S. cerevisiae* zur Herstellung von großen Mengen rekombinanter Proteinen für eine biotechnologische Nutzung denkbar.

1.2 *E. coli* Tyrosin-tRNA_{CUA}

Für alle in dieser Arbeit generierten *S. cerevisiae*-Stämme konnte die Expression des Zielproteins in Abhängigkeit der nicht-kanonischen Aminosäure gezeigt werden. Genauso konnte für alle Positionen eine Suppression mit einer kanonischen Aminosäure detektiert werden (siehe **Abbildung 10**). Dabei war kein Unterschied in der Fehlsuppression zwischen dem orthogonalen Pärchen für pBzpa und pAzpa zu verzeichnen (Daten nicht gezeigt).

Das hier verwendete orthogonale Pärchen besteht aus der *E. coli* Tyrosyl-tRNA-Synthetase und der dazugehörigen Tyrosin-tRNA_{CUA}. Sowohl die Aminosäurespezifität

der Synthetase wie auch das Anticodon der tRNA wurden bei der Etablierung des erweiterten genetischen Codes in *S. cerevisiae* verändert. In *S. cerevisiae* wird dieses Pärchen bei der Verwendung von einem „*multicopy*“ 2 μ Plasmid überexprimiert. Helen Edwards konnte in ihren Studien für die *E. coli* Tyrosin-tRNA_{CUA} zeigen, dass ihre Überexpression in *S. cerevisiae* zu einer spezifischen Aminoacylierung dieser tRNA durch die endogene Leucyl-tRNA-Synthetase mit Leucin zur Folge hat. Das beruht auf strukturelle Ähnlichkeiten der *E. coli* Tyrosin-tRNA_{CUA} zu der endogenen Leucin-tRNA in *S. cerevisiae* [166]. Die beobachtete Suppression des Stopp-Codons TAG mit einer kanonischen Aminosäure könnte auf den von Helen Edwards beschriebenen Effekt zurückgeführt werden. Dieser Zusammenhang wird auch von der Gruppe um Peter G. Schultz über massenspektrometrische Analysen bestätigt. Zusätzlich konnten sie auch zeigen, dass neben Leucin auch Tryptophan auf die orthogonale tRNA fehlbeladen wird. Interessanterweise konnten sie Unterschiede zwischen den orthogonalen Pärchen feststellen. Ein bestimmtes Amber Stopp-Codon an einer definierten Position im Protein wurde zu 96 % richtig mit pAzpa und nur zu 62 % mit pBzpa supprimiert [77].

1.3 Das Amber Stopp-Codon

Für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure in Proteine wurde das Amber Stopp-Codon TAG gewählt. Das Amber Stopp-Codon ist eines von drei vorkommenden Stopp-Codons und wird als dieses am seltensten in *S. cerevisiae* verwendet (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). In Werten ausgedrückt, wird in *S. cerevisiae* zur Termination der Translation das Stopp-Codon TAA in 47,1 %, TGA in 30,3 % und TAG in 22,6 % der Fälle benutzt. Etwa jedes fünfte Gen wird also mit TAG terminiert. Das bedeutet, dass wenn das orthogonale Pärchen in einem Organismus exprimiert wird, kann es neben der Suppression des Amber Stopp-Codons im Zielprotein auch zur Suppression des Amber Stopp-Codons in natürlich vorkommenden Transkripten mit der nicht-kanonischen Aminosäure kommen. Inwiefern das einen negativen Effekt auf den Organismus hat, wurde in dieser Arbeit untersucht. Dafür wurde der Stamm 2YA6,64C1, welcher konstitutiv das orthogonale Pärchen für pAzpa exprimiert, in SC-Glukosemedium mit unterschiedlichen pAzpa-Konzentrationen angeimpft. Ohne die Zugabe von pAzpa wuchs der Stamm an und erreichte die stationäre Phase (OD600 von 2) nach 48 h. Die Zugabe von pAzpa führte dazu, dass die Stämme in starker

DISKUSSION

Abhängigkeit von der pAzpa-Konzentration, schlechter anwachsen und selbst nach 96 h nicht den OD-Wert der Kontrollkulturen erreichten (**Abbildung 28C**). Für die 1 mM pAzpa-Konzentration wurde nach 96 h eine OD₆₀₀ von 0,7 detektiert. Die in Kapitel 1.9.1 diskutierte hemmende Wirkung von pAzpa kann diesen Effekt alleine nicht erklären. Auch zeigte das orthogonale Pärchen ohne die Zugabe der spezifischen nicht-kanonische Aminosäure (pAzpa) oder bei Zugabe einer für dieses orthogonale Pärchen unspezifischen nicht-kanonischen Aminosäure (pBzpa) keinen negativen Effekt (siehe **Abbildung 28C** und **28D**). Der negative Effekt trat erst auf, wenn sowohl das orthogonale Pärchen als auch pAzpa gleichzeitig vorhanden waren und war umso ausgeprägter, je höher die pAzpa-Konzentration im Medium war. Die am nächsten liegende Schlussfolgerung daraus ist: Bei der Translation werden möglicherweise die natürlich vorkommenden Amber Stopp-Codons supprimiert. Das wiederum führt dazu, dass wildtypische Proteine artifiziell C-terminal verlängert werden. Eine Akkumulation der defekten Proteine könnte dabei zu Wachstumsstörungen führen. Höhere pAzpa-Konzentrationen begünstigen diesen Effekt. Eine mögliche Hypothese warum nach einer bestimmten Zeit das Zellwachstum wieder eingeschränkt möglich ist, könnte die Degradation von pAzpa sein. Dies zeigt sich darin, dass in einem Quervernetzungsexperiment nach 96 h nur noch eine geringe Aha1 I64X Expression beobachtet wurde und es konnten keine Dimere mehr quervernetzt werden (Daten nicht gezeigt).

Für die nicht-kanonische Aminosäure pBzpa konnte ein ähnlicher Effekt in Kombination mit dem orthogonalen Pärchen, wenn auch nicht so ausgeprägt, gezeigt werden (**Abbildung 28E**). Interessanterweise zeigte die Zugabe von pAzpa in Konzentrationen von 0,75 und 1 mM zur Benzoylphenylalanyl-tRNA-Synthetase auch einen negativen Wachstumseffekt, welcher nicht alleine auf pAzpa selbst zurückgeführt werden kann (**Abbildung 28F**). Möglicherweise kann die Benzoylphenylalanyl-tRNA-Synthetase in einem gewissen Umfang die tRNA_{CUA} mit pAzpa aminoacylieren. Denn bei der Etablierung des erweiterten genetischen Codes wurde die Beladung mit anderen nicht-kanonischen Aminosäuren nicht ausgeschlossen [54].

1.4 Alternativen zu dem in dieser Arbeit verwendeten erweiterten genetischen Code

Wenn der Begriff „Orthogonalität“ streng ausgelegt wird, so sind die in dieser Arbeit verwendeten orthogonalen Pärchen und die nicht-kanonischen Aminosäuren aufgrund der folgenden Gründe nicht vollständig orthogonal. Erstens, beide hier verwendeten nicht-kanonischen Aminosäuren wirken sich, direkt oder indirekt durch das Lösungsmittel, auf das Zellwachstum negativ aus. Zweitens, die *E. coli* Tyrosyl-tRNA_{CUA} wird durch endogene aaRS mit kanonischen Aminosäuren beladen. Drittens, das für die Suppression mit der nicht-kanonischen Aminosäure verwendete Amber Stopp-Codon ist nicht einzigartig. Seine Suppression in natürlich vorkommenden Transkripten kann zu gravierenden Störungen im Wachstumsverhalten führen. Welche alternativen Methoden zur Verfügung stehen, um nicht-kanonische Aminosäuren *in vivo* in Proteine an definierte Positionen einzubauen, soll in diesem Kapitel diskutiert werden.

Neben dem klassischen genetischen Code, bei dem Triplet-Codons verwendet werden, kommen in der Natur auch tRNAs mit einer erweiterten Anticodonschleife zur Suppression von Quadruplett-Codons vor [167]. Ein orthogonales Pärchen bestehend aus einer tRNA und Aminoacyl-tRNA-Synthetase, welche das Quadruplett-Codon AGGA supprimiert, konnte bereits in *E. coli* etabliert werden [168]. Dieses System verwendet zwar nicht unbedingt ein Stopp-Codon, weist aber dieselben Limitationen wie der auf Amber Stopp-Codon basierende erweiterte genetische Code auf. Bei beiden Systemen ist eine unspezifische Suppression von Codons in natürlich vorkommenden Transkripten nicht vermeidbar.

Ein anderer Ansatz ist unter dem Namen Sense-Codons-Neuzuordnung bekannt. Hier wird die mangelnde Substratspezifität einiger aaRS ausgenutzt, um nicht-kanonische Aminosäuren, welche Strukturanalogue von kanonischen Aminosäuren sind, in die Proteine einzubauen. Hierbei werden für eine bestimmte Aminosäure auxotrophe Stämme angezogen und zu einem bestimmten Zeitpunkt wird die auxotrophe Aminosäure durch ein Strukturanalog ersetzt [49]. Damit ist ein gleichzeitiger Einbau von einer bestimmten nicht-kanonischen Aminosäure an unterschiedliche Positionen *in vivo* möglich. Das wiederum ist auch eine Limitation dieser Methode. Die nicht-kanonischen Aminosäure wird in alle exprimierten Proteine einer Zelle eingebaut. Eine gezielte Interaktionsstudie oder Funktionsstudien sind somit nur sehr eingeschränkt

DISKUSSION

möglich. Dagegen ist diese Methode für die Produktion von Proteinen oder Peptiden mit einer nicht-kanonischen Aminosäure an unterschiedlichen Positionen im großen Maßstab sehr gut geeignet.

Neben diesen bereits etablierten Methoden werden weitere sehr vielversprechende Ansätze verfolgt, welche dem Anspruch der Orthogonalität gerecht werden und den Einbau von mehreren nicht-kanonischen Aminosäuren in ein Protein erlauben. Einer dieser Ansätze ist die Schaffung von künstlichen Organismen mit einem Minimalgenom wie *Mycoplasma laboratorium* [169,170]. Ein anderer Ansatz ist der Austausch von bestimmten Sinn-Codons eines Organismus durch redundante Codons, welche für dieselbe Aminosäure kodieren. Für diesen Ansatz muss aber erst noch die Fragestellung geklärt werden, welche der seltenen Sinn-Codons aus dem genetischen Code eines Organismus wie *E. coli* oder *S. cerevisiae* entfernt werden können, ohne dass es zur mRNA-Falschfaltung und Translationsproblemen kommt [53,171-173]. Einer der wohl innovativsten Ansätze ist der Versuch, ein zusätzliches unnatürliches Basenpaar orthogonal neben den bestehenden Basenpaaren AT und CG in das Genom zu integrieren. Das würde die Anzahl der Triplet-Codons auf über 200 erweitern, wodurch die *in vivo* Expression von Proteinen bestehend aus nur nicht-kanonischen Aminosäuren theoretisch möglich wäre [53,174].

Abschließend lässt sich sagen, dass nicht viele etablierte Methoden für den *in vivo* Einbau von nicht-kanonischen Aminosäuren zur Verfügung stehen. Die neuen Ansätze sind zwar sehr vielversprechend, aber bei weitem noch nicht ausgeschöpft. Daher ist der erweiterte genetische Code momentan die Methode der Wahl, um nicht-kanonische Aminosäuren spezifisch in Proteine *in vivo* einzubauen und die Anwendbarkeit dieser für Interaktions-, Funktionsstudien sowie die biotechnologische Anwendung zu erforschen. Auch der Einbau von zwei unterschiedlichen nicht-kanonischen Aminosäuren in ein Protein wäre durch die gleichzeitige Verwendung von einem Quadruplett- und Stopp-Codon auf der Grundlage des erweiterten genetischen Codes möglich. Das Wissen, um den Einsatz und Verwendung der nicht-kanonischen Aminosäure wäre auf zukünftige Methoden übertragbar.

2. Anwendung des erweiterten genetischen Codes zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Die Erforschung von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Hilfe von positionsspezifisch, eingebauten Photocrosslinkern wie den beiden nicht-kanonischen Aminosäuren pAzpa und pBzpa hat gegenüber chemischen Verbindungen wie Formaldehyd zahlreiche Vorteile. Durch ihren positionsspezifischen Einbau kann jeder Bereich des Proteins spezifisch auf Interaktionen untersucht werden. Dagegen haben chemische Reagenzien oft keinen Zugang in das Innere der Proteine oder scheitern an Bereichen, welchen die reaktiven Gruppen für die Anbindung des Crosslinkers fehlen. Weitere Vorteile positionsspezifisch eingebauter nicht-kanonischer Aminosäuren sind die Minimierung von falsch-positiven Quervernetzungen, die sehr schnelle Abreaktion nach Induktion, wodurch auch transiente und schwache Interaktionen erfasst werden und dass der Austausch von nur einer Aminosäure der minimalmöglichen Veränderung am Protein entspricht. Ein weiterer Vorteil ist, dass selbst transiente Interaktionen eines Proteins zu einem bestimmten Zeitpunkt, *in vivo* in seiner natürlichen Umgebung erfasst werden.

Für die nicht-kanonische Aminosäure pBzpa wurden bereits mehrere Studien zur Erforschung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in unterschiedlichen Organismen wie *E. coli* [90,93,94,175], *S. cerevisiae* [95,176,177] und CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary) [61] veröffentlicht. In allen Studien wurden vorhandene Kristallstrukturen für den positionsspezifischen Einbau von pBzpa benutzt. In zwei der drei *S. cerevisiae* Studien wurde pBzpa in die Aktivierungsdomäne von Gal4 eingebaut. Dabei wurde kein *full length* Gal4 verwendet, sondern die Aktivierungsdomäne an die LexA DNA-Bindedomäne fusioniert [95,176]. In der Studie von Chen et al. wurde pBzpa in den Transkriptionsfaktor IIB eingebaut. Anschließend wurden Zellkernextrakte hergestellt, Präinitiationskomplexe auf einer immobilisierten DNA ausgebildet und *in vitro* die Quervernetzung durchgeführt [177].

Für die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa wurde bisher die Ausbildung von Quervernetzungen basierend auf der Azidogruppe am Beispiel von GST in *E. coli* [76] und am Beispiel von HEK293-Zellen, in welchen das *E. coli* GST [79] exprimiert wurde, als *Proof of Principle* gezeigt. Studien, die mehr als eine bekannte Quervernetzung basierend auf den erweiterten genetischen Code und die nicht-kanonische Aminosäure

DISKUSSION

pAzpa zeigen, sind nicht bekannt. In *S. cerevisiae* hat pAzpa bislang noch keine Anwendung gefunden. Dabei hat pAzpa gegenüber pBzpa mehrere Vorteile. Die Azidogruppe kann mit einer Vielzahl von Gruppen eine kovalente Bindung ausbilden, während die Ketogruppe von pBzpa nur mit CH-Gruppen abreagiert (siehe Anhang **Abbildung 46** und **47**). Sie ist zudem gegenüber pBzpa deutlich kleiner. Nach Aktivierung mit UV-Licht reagiert sie sofort entweder mit den Gruppen des Interaktionspartners oder mit H₂O Molekülen ab. Während die Ketogruppe von pBzpa bei nicht Abreagieren mit einer nahegelegener CH-Gruppe regeneriert. In dieser Zeit könnten unspezifische Quervernetzungen entstehen.

Bislang sind keine Studien in *S. cerevisiae* bekannt, die das volle Potenzial des erweiterten genetischen Codes und der beiden nicht-kanonischen Aminosäuren pAzpa und pBzpa nutzen und dabei Protein-Protein-Wechselwirkungen an *full length* Proteinen im natürlichen Kontext *in vivo* einschließen. Daher wurde in dieser Arbeit erfolgreich eine Methode zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Verwendung des erweiterten genetischen Codes und der beiden nicht-kanonischen Aminosäure, am Beispiel des Aha1-Proteins in *S. cerevisiae* etabliert und charakterisiert. Diese Methode ist geeignet Wechselwirkungen zwischen zwei Proteinen ohne großen technischen Aufwand studieren zu können. Bei der Etablierung wurden folgende Erkenntnisse gewonnen.

Die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa wie auch pBzpa konnten an beliebig definierte Positionen in der Proteinsequenz von Aha1 eingebaut werden. Mit einer native Co-Immunpräzipitationen wurde gezeigt, dass die Aha1-Varianten (bis auf Aha1 S65X) ungeachtet der Mutation, in der Lage waren einen Komplex mit Hsp90 auszubilden (siehe Ergebnisse Kapitel 2.5). Die Tatsache, dass für Aha1 S65X die Interaktion zu Hsp90 verloren geht, könnte auf eine fehlerhafte Faltung, verursacht durch den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure pAzpa an diese Position zurückzuführen sein. Diese Beobachtung unterstreicht die Notwendigkeit der Überprüfung der Funktionalität von mutagenisierten Proteinen.

Für die Quervernetzung der Interaktionspartner wurden zwei UV-induzierbare nicht-kanonische Aminosäuren *p*-Azidophenylalanin und *p*-Benzoylphenylalanin verwendet. Bei der UV abhängigen Ausbildung des quervernetzten Dimers wurde eine Positionsabhängigkeit beobachtet. Von acht Positionen konnte für vier Positionen ein Dimer mit UV-Licht ausgebildet werden. Dabei wurden zweimal eine basische und zweimal eine hydrophobe Aminosäure ausgetauscht. An den Positionen, die zu keinem

Dimer führten, wurde einmal eine basische, einmal eine hydrophobe und zweimal eine polare Aminosäure ausgetauscht. Die Induktion der Quervernetzung konnte sowohl mit der Wellenlänge 312 nm wie auch 365 nm induziert werden. Die Ausbeuten an Homodimer waren für die beiden Wellenlängen bei gleicher Belichtungsdauer vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Mit steigender Belichtungsdauer stieg auch die Ausbeute an quervernetzten Homodimer. Neben dem Homodimer konnten keine weiteren Dimere oder Artefakte beobachtet werden. Zudem wurde eine Unabhängigkeit von der nicht-kanonischen Aminosäure auf die Ausbildung eines quervernetzten Homodimers gezeigt. Diese Unabhängigkeit von der Photocrosslink Aminosäure wurde auch im Zusammenhang mit der Quervernetzung eines Gal4-Homodimers gezeigt (Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang muss die Studie von Grunbeck et al. erwähnt werden. Hier wurde ein Rezeptor in HEK293T Zellen mit pBzpa oder pAzpa an einer definierten Position exprimiert und wurde durch die Zugabe des Liganden zum Medium, mit diesem quervernetzt. Dabei wurde für pAzpa eine UV-Licht unabhängige Quervernetzung beobachtet [178]. In dieser hier vorliegenden Arbeit konnte keine Quervernetzung ohne vorherige UV-Belichtung für pAzpa beobachtet werden.

Bei der Anreicherung des quervernetzten Homodimers war es wichtig, dass diese Methode auch unter einfachen Laborbedingungen ohne einen großen technischen Aufwand möglich ist. Dafür wurde der 6 x His-Tag an Aha1 fusioniert. In Zusammenhang mit diesem Homodimer hat sich dieser Tag als nicht geeignet für die Anreicherung herausgestellt (Daten nicht gezeigt). Deswegen erfolgte die Anreicherung des Homodimers immunologisch. Dafür wurde das kommerzielle *V5 tagged protein Purification Kit* von MBL verwendet. Das Monomer konnte mit einem Ansatz in ausreichenden Mengen für die Massenspektrometrie angereichert werden. Für das Homodimer waren zehn Ansätze nötig. Die zehn Ansätze wurden anschließend gepoolt und massenspektrometrisch ausgewertet. Dabei konnte eindeutig Aha1 I64X identifiziert werden. Es wurden keine weiteren Proteine signifikant detektiert. Die Massen für Aha1 I64X konnten allerdings keinen Aufschluss darüber geben, ob auch das wildtypische Aha1 als Interaktionspartner mit Aha1 I64X quervernetzt wurde. Das wildtypische Aha1 kann in einem Massenspektrum nur durch zwei Peptidmassen von dem mutagenisierten diskriminiert werden. Bei dem einen handelt es sich um das Peptid, in welchen der Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure erfolgt. Dieses hat eine günstige Aminosäurezusammensetzung für eine Identifizierung, es sei denn, die Quervernetzung erfolgt in diesem Bereich. Bei dem anderen Peptid handelt es sich um

DISKUSSION

das letzte C-terminale Peptid vor dem Tag. Im Falle des mutagenisierten Aha1 ist es um zwei Aminosäuren aus der Tag-Sequenz länger. Ohne diese zwei Aminosäuren ist dieses Peptid, aufgrund des Fehlens von basischen Aminosäuren schlecht ionisierbar und deswegen für eine massenspektrometrische Identifizierung ungeeignet.

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode ist gut geeignet, um Heterodimere in einer ähnlichen Ausbeute wie das Aha1-Homodimer zu identifizieren. Um Homodimere besser identifizieren zu können, wären größere Dimerausbeuten notwendig. Dafür sind chromatographische Methoden wie zum Beispiel die Ionenaustauschchromatographie kombiniert mit einer Gelfiltration geeignet. Die größeren Mengen könnten dazu genutzt werden das Dimer auch mit anderen Proteasen für die Massenspektroskopie zu verdauen. Unterschiedliche Massenspektren würden zu einer besseren Abdeckung der Proteinsequenz führen.

Nachdem massenspektrometrisch das Dimer als ein Homodimer und nicht wie erwartet als ein Heterodimer bestehend aus Aha1 und Hsp90 charakterisiert wurde, stellte sich die Frage, inwiefern der C-terminale Tag für eine artifizielle Dimerisierung zweier Aha1-Monomere verantwortlich sein kann. Für den 6 x His-Tag ist bereits bekannt, dass er eine Dimerisierung zweier His-getaggtter Proteine induzieren kann [151,152]. Zu diesem Zweck wurde der 6 x His-Tag entfernt und das Fusionsprotein nur mit einem V5-Epitop exprimiert. Das Homodimer konnte weiterhin quervernetzt werden und auch eine Abnahme in der Ausbeute wurde nicht detektiert. Um auch die Dimerisierung über das V5-Epitop auszuschließen (Hinweise in der Literatur auf eine mögliche Dimerisierung gibt es nicht), wurde es durch das HA- bzw. FLAG-Epitop ersetzt. Auch hier konnte kein Einfluss auf die bisher beschriebenen Ergebnisse beobachtet werden. Diese Ergebnisse und die aus der nativen Co-Immunpräzipitation zeigen deutlich, dass der hier C-terminal verwendete Tag bestehend aus einem 6 x His-Tag und einem V5-Epitop sowohl keinen Einfluss auf die Dimerisierung zwischen Aha1 und Hsp90 als auch die Dimerisierung von zwei Aha1-Monomeren hatte. Demzufolge und unter Berücksichtigung der bereits beschriebenen Ergebnisse handelt es sich bei dem Homodimer um eine echte *in vivo* Wechselwirkung.

3. Bildet Aha1 *in vivo* Homodimere aus?

Das Aha1-Protein wurde bereits in den ersten Studien als Interaktionspartner und Cofaktor von Hsp90 beschrieben [102,103]. Es dauerte nicht lange, bis diese Interaktion und die daran beteiligten Aminosäuren anhand einer Kristallstruktur aufgeklärt wurden [96]. Diese Interaktion konnte durch eine andere Gruppe 2010 weiter charakterisiert werden [97]. Die Aminosäuren an den Positionen 64 und 66 im Aha1 wurden dabei als die interagierenden Aminosäuren mit Hsp90 beschrieben. Ausgehend von diesen Studien wurden die Positionen 59 - 66 in Aha1 für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure zur kovalenten Quervernetzung zu Hsp90 ausgesucht. Anders als erwartet konnte aber kein Heterodimer bestehend aus Aha1 und Hsp90 quervernetzt werden. Stattdessen wurde ein Homodimer, bestehend aus zwei Aha1-Monomeren, identifiziert. Dieser Homodimer wurde in Abhängigkeit von UV-Licht, der Position und der nicht-kanonischen Aminosäure ausgebildet. Dabei war es nicht wichtig, welche der UV-induzierbaren Aminosäuren oder welches C-terminale Epitop benutzt wurde. Auch konnte für die Positionen, für die eine Quervernetzung möglich war, mit einer nativen Co-Immunpräzipitation gezeigt werden, dass trotz des Einbaus von pAzpa die Wechselwirkung mit Hsp90 weiterhin stattfand.

Wie können diese Ergebnisse in Bezug auf die Literatur gesehen werden? Unumstritten ist, dass Aha1 mit Hsp90 *in vivo* interagiert und seine ATPase-Aktivität positiv beeinflusst [179]. Seine Interaktion mit Hsp90 wurde bereits in vielen Studien unter Verwendung von unterschiedlichen Methoden belegt [97,102,112]. Auch in dieser Arbeit konnte diese Wechselwirkung bestätigt werden. Dabei wurde zum ersten Mal der Komplex ausgehend von Aha1 in einer Co-Immunpräzipitation angereichert. Auch wenn Kristallisationsexperimente eine sehr hohe Aussagekraft besitzen, darf nicht außer Acht gelassen werden, dass sie fehleranfällig sind und zu falschen Aussagen führen können. Folgende Limitationen sind bei der Aha1/Hsp90-Kristallstruktur anzumerken. Erstens, es wurden nicht „full length“ Proteine, sondern bestimmte Sequenzabschnitte (Aha1 1-153 und Hsp90 273-530) kristallisiert. Für Aha1 entsprach der Sequenzabschnitt ca. 44 % und für Hsp90 ca. 36 % der vollständigen Sequenz. Sequenzverlust bedeutet immer auch Informationsverlust, dass sich dadurch eine Wechselwirkung verändern kann, ist nicht auszuschließen. Zweitens, die beiden *S. cerevisiae* Proteine wurden in *E. coli* rekombinant überexprimiert, angereichert und kristallisiert. Bakterielle Expressions-

DISKUSSION

systeme haben allerdings den Nachteil, dass die Proteine nicht wie in Eukaryonten posttranslational modifiziert werden. Für das Hsp90-Protein sind posttranslationale Modifizierungen beschrieben, welche zudem für seine Funktion als Chaperon wichtig sind [180]. Aha1 zeigt im SDS-Gel ein Laufverhalten, welches auf ein höheres Molekulargewicht als das aus der Aminosäuresequenz berechnete schließen lässt. Auch hier ist eine posttranslationale Modifizierung nicht unwahrscheinlich. Drittens, die Kristallisation findet *in vitro* unter Einsatz großer Proteinmengen statt. Dadurch können bestimmte nicht in der Natur vorkommende Wechselwirkungen erzwungen werden. Anbetracht der beschriebenen Einschränkungen bleibt zu sagen, dass *in vitro* Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden müssen und weniger Aussagekraft als *in vivo* Ergebnisse besitzen. Zudem gibt es bereits Studien, die eindrucksvoll zeigen, dass *in vivo* gegenüber *in vitro* Methoden durchaus ein anderes Bild für ein bestimmtes Protein und seiner Interaktionen in der Zelle aufzeigen können [181].

Die in dieser Arbeit etablierte und charakterisierte Methode zur Studie von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* zeigt eindeutig, dass Aha1-Proteine in der Zelle Homodimere über die analysierte Domäne ausbilden. Dabei findet die Wechselwirkung eines Monomers mit dem anderen zwischen den Aminosäuren 59 – 66 statt. Nachdem gezeigt wurde, dass das mutagenisierte Aha1 mit Hsp90 copräzipitiert werden kann, ist nicht ausgeschlossen, dass Aha1 als Homodimer an das Hsp90-Homodimer bindet.

4. Nächste Schritte zur Etablierung einer Methode zur Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen

Für die Etablierung der Methode zur Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen wurde der Transkriptionsfaktor Gal4 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die *GAL7*-Promotorsequenz nach den Quervernetzungsexperimenten spezifisch eluiert und gegenüber den beiden Negativkontrollen angereichert werden konnte (**Abbildung 38**).

Allerdings hat es sich herausgestellt, dass die Überexpression von Gal4, unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors auf einem 2 μ Plasmid, sich toxisch auf die Zellen auswirkt und daher bedingt geeignet für einen „*Proof of Principle*“ ist. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zellen nach 24-stündiger Expression abstarben und keine DNA-Isolation mehr möglich war. Deswegen wurden die Quervernetzungsexperimente nach 4 h Induktion durchgeführt. Die negative Wirkung von Gal4 konnte auch in einer

groß angelegten Überexpressions- und Deletionsstudie gezeigt werden [106]. Ein Hinweis, warum es bei der Überexpression von Gal4 zur Hemmung im Zellwachstum kommt, ist in der Studie von Lodi et al. zu finden. Sie haben beobachtet, dass das Wachstum auf Galaktose zu einer Hemmung in der Expression von zwei mitochondrialen Enzymen führt, was wiederum eine Störung in der Atmungskette zur Folge hat. Als eine mögliche Hypothese wird die Überexpression von Gal4 genannt [182].

In unseren Experimenten konnte das mutagenisierte *GAL4* in SC-Galaktosemedium stark induziert werden. Dagegen wurde im SC-Glukosemedium keine Expression im Western Blot beobachtet (Daten nicht gezeigt). Das endogene *GAL4* wird in beiden Medien, wenn auch auf unterschiedlichen Expressionsleveln, exprimiert [183,184]. Dies wiederum führt dazu, dass die Gal4-Bindestellen bereits im SC-Glukosemedium von wildtypischem und endogen exprimiertem Gal4 besetzt sind. Das heißt, dass das mutagenisierte Gal4 nach der Induktion nur dann an die entsprechende Bindestelle binden kann, wenn das bereits gebundene wildtypische Gal4-Homodimer sie verlässt. Wie oft so ein Wechsel stattfindet, ist nicht klar. Aber selbst dann steht das mutante Gal4 weiterhin mit wildtypischem Gal4 in Konkurrenz um die Bindestellen.

Weiterhin kann eine Punktmutation mit einem Wechsel der Aminosäure zur Folge, aber auch ein fusioniertes Epitop, zu einer Fehlfaltung und damit verbunden zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Das trifft auch für den Einbau einer nicht-kanonischen Aminosäure im Austausch für eine kanonische zu. Um einen Funktionsverlust ausschließen zu können, wäre die Deletion der beiden wildtypischen *GAL4*-Allele und die Überexpression der Gal4-Varianten in Kombination mit einem Reporter gen zur Überprüfung der Gal4-Funktionalität vom Vorteil.

Trotz der beschriebenen Limitationen konnte jedoch gezeigt werden, dass eine kovalente Quervernetzung von einem Transkriptionsfaktor mit der DNA-Bindestelle in Abhängigkeit von der Position, der nicht-kanonischen Aminosäure und UV-Licht möglich ist. Für die weitere Etablierung der Methode wäre folgendes Vorgehen denkbar. DNA-bindende Transkriptionsfaktoren werden in der Regel schwach abundant exprimiert. Deswegen können zusätzliche, endogene Kopien im Hinblick auf die begrenzte Anzahl an DNA-Bindestellen von Nachteil sein. Daher würde in einem idealen System das endogene Gen deletiert und durch das mutagenisierte Gen ersetzt werden. Dabei wachsen die Zellen immer in Anwesenheit von der nicht-kanonischen Aminosäure. Die Quervernetzung wird mit UV-Licht zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert. Dieses

DISKUSSION

optimierte System lässt sich allerdings nicht problemlos verwirklichen. Denn wie schon beschrieben und diskutiert, zeigt die nicht-kanonische Aminosäure pAzpa selbst, aber noch gravierender in Kombination mit der aaRS sehr starke negative Effekte auf das Zellwachstum von *S. cerevisiae*. Bis das hier verwendete System allen Kriterien der Orthogonalität gerecht wird, werden noch weitere Studien und Optimierungen notwendig sein. Deswegen wäre eine Etablierung der Methode zur Studie von Protein-DNA Wechselwirkungen basierend auf einem orthogonalen Transkriptionsfaktor sinnvoll. Hierzu könnte beispielsweise das verbesserte Tet-On-System auf einem Plasmid in *S. cerevisiae* Verwendung finden. Der Transkriptionsfaktor bindet nicht im Genom und seine Bindung an einen spezifischen Promotor verbunden mit der Expression eines Reportergens kann zeitlich gesteuert werden [185,186]. Eine Quervernetzung durch UV-Licht im Promotorbereich des Reportergens könnte induziert und ein Vorgehen sowohl für die Anreicherung wie auch Sequenzierung der Fragmente etabliert werden. Die so entwickelte Methode wäre auf andere Transkriptionsfaktoren übertragbar.

5. Ausblick: Weitere Anwendungsbereiche für die nicht-kanonische Aminosäure *p*-Azidophenylalanin

Nicht-kanonische Aminosäuren und deren positionsspezifischer Einbau in Proteine *in vivo* haben unbestritten ein großes biotechnologisches und molekularbiologisches Potenzial. Dabei werden dem Protein einzigartige und über das natürliche Spektrum hinausgehende Eigenschaften verliehen wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Quervernetzung, Photoaktivierbarkeit oder die Möglichkeit einer selektiven, posttranslationalen Modifizierung.

Neben der Photoaktivierbarkeit der Azidogruppe zur Quervernetzung von Proteinen oder von Proteinen mit DNA kann diese Gruppe auch chemisch unter definierten Bedingungen über die Staudingerligation [69] wie auch Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition abreagieren [73]. So wurde bereits in mehreren Studien gezeigt, dass über eine in Proteine eingebaute Azidogruppe möglich ist Fluoreszenzfarbstoffe an aufgereinigte Proteine oder Phagen zu koppeln [80-82,187]. In dieser Arbeit wurden beide Reaktionen verwendet, um den Einbau von pAzpa und die vorhandene Reaktivität

der Azidogruppe durch Kopplung von Biotin oder eines Fluoreszenzfarbstoffs nachzuweisen (siehe Kapitel 1.3). Besonders hervorzuheben ist hierbei die Staudingerligation. Mit ihr war die selektive Kopplung des Fluoreszenzmoleküls an das Aha1 im rohen Zellysate möglich.

Eine zielgerichtete Kopplung von Biomolekülen an ein Protein ist zum Beispiel auch bei der Herstellung von rekombinanten Proteinen in *E. coli* vorstellbar. Bakterielle Systeme bieten den Vorteil, dass rekombinante Proteine in großen Ausbeuten und hoher Reinheit produziert werden können. Der Nachteil ist, dass viele eukaryotische Proteine für ihre Aktivität eine korrekte posttranslationale Modifizierung wie zum Beispiel eine Glykosylierung erfordern. Eine positionsspezifische und selektive Modifizierung kann mit Hilfe von pAzpa sehr gut realisiert werden. Solch eine Anwendung wurde bereits für ein pharmazeutisch interessantes Wachstumshormon mit der nicht-kanonischen Aminosäure p-Acetylphenylalanin gezeigt [67].

Auch ist die Anwendung von p-Azidophenylalanin zur zielgerichteten Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen interessant [84,188]. Gerade bei Enzymen bringt eine zielgerichtete Immobilisierung große Vorteile mit sich. So kann die katalytische Domäne optimal ausgerichtet werden und es wäre möglich, die Enzyme wiederzuverwenden. Im Laufe einer Reaktion können die immobilisierten Enzyme isoliert werden, um sie zu regenerieren, Reaktionsbedingungen anzupassen oder die bereits synthetisierten Produkte abzureichern. Gerade bei teuren Enzymen könnten damit die Kosten möglicherweise signifikant gesenkt werden.

Basierend auf dem erweiterten genetischen Code ist es möglich mehr als 70 nicht-kanonische Aminosäuren mit einzigartigen physikalisch-chemischen Eigenschaften in Proteine *in vivo* einzubauen. In dieser Arbeit wurde die nicht-kanonische Aminosäure p-Azidophenylalanin und p-Benzoylphenylalanin dazu verwendet, um *in vivo* Methoden zur Studie von molekulare Wechselwirkungen in *S. cerevisiae* zu entwickeln. Dabei wurde erfolgreich eine Methode zur Studie von Protein-Protein Wechselwirkungen an einem *full length* Protein *in vivo* etabliert und wichtige Grundlagen zur Studie von Protein-DNA Wechselwirkungen gelegt. Auch die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse zur Anwendung des erweiterten genetischen Codes in *S. cerevisiae* werden eine große Hilfe für weitere Arbeiten mit den hier beschriebenen aber auch weiteren nicht-kanonischen Aminosäuren sein.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
2. Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, et al. (2000) A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 403: 623-627.
3. Stynen B, Tourneu H, Tavernier J, Van Dijck P (2012) Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 331-382.
4. Koegl M, Uetz P (2007) Improving yeast two-hybrid screening systems. *Brief Funct Genomic Proteomic* 6: 302-312.
5. Sjobring U, Bjorck L, Kastern W (1991) Streptococcal protein G. Gene structure and protein binding properties. *J Biol Chem* 266: 399-405.
6. Graille M, Stura EA, Corper AL, Sutton BJ, Taussig MJ, et al. (2000) Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5399-5404.
7. Kaboord B, Perr M (2008) Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 424: 349-364.
8. Masters SC (2004) Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods Mol Biol* 261: 337-350.
9. Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 523-533.
10. Gavin AC, Aloy P, Grandi P, Krause R, Boesche M, et al. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440: 631-636.
11. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, et al. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737-741.
12. Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, et al. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24: 218-229.
13. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, et al. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17: 1030-1032.

14. Reeder RH, Roeder RG (1972) Ribosomal RNA synthesis in isolated nuclei. *J Mol Biol* 67: 433-441.
15. Young RA (1991) RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* 60: 689-715.
16. Lee TI, Young RA (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34: 77-137.
17. Ciliberto G, Raugei G, Costanzo F, Dente L, Cortese R (1983) Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase iii. *Cell* 32: 725-733.
18. Myer VE, Young RA (1998) RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J Biol Chem* 273: 27757-27760.
19. Knippers R (2001) *Molekulare Genetik*. 8. Auflage.
20. Latchman DS (1997) Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 1305-1312.
21. Cowell IG (1994) Repression versus activation in the control of gene transcription. *Trends Biochem Sci* 19: 38-42.
22. Luscombe NM, Austin SE, Berman HM, Thornton JM (2000) An overview of the structures of protein-DNA complexes. *Genome Biol* 1: REVIEWS001.
23. Hahn S, Young ET (2011) Transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: transcription factor regulation and function, mechanisms of initiation, and roles of activators and coactivators. *Genetics* 189: 705-736.
24. Johnston M (1987) A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 51: 458-476.
25. Cai YH, Huang H (2012) Advances in the study of protein-DNA interaction. *Amino Acids* 43: 1141-1146.
26. Li JJ, Herskowitz I (1993) Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science* 262: 1870-1874.
27. van Steensel B, Henikoff S (2000) Identification of in vivo DNA targets of chromatin proteins using tethered dam methyltransferase. *Nat Biotechnol* 18: 424-428.
28. Orlando V (2000) Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci* 25: 99-104.
29. Carey MF, Peterson CL, Smale ST (2012) Confirming the functional importance of a protein-DNA interaction. *Cold Spring Harb Protoc* 2012: 733-757.
30. Hecht A, Grunstein M (1999) Mapping DNA interaction sites of chromosomal proteins using immunoprecipitation and polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 304: 399-414.
31. Horak CE, Snyder M (2002) ChIP-chip: a genomic approach for identifying

LITERATURVERZEICHNIS

- transcription factor binding sites. *Methods Enzymol* 350: 469-483.
32. Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B (2007) Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* 316: 1497-1502.
 33. Fields S (2007) Molecular biology. Site-seeing by sequencing. *Science* 316: 1441-1442.
 34. Orian A, Abed M, Kenyagin-Karsenti D, Boico O (2009) DamID: a methylation-based chromatin profiling approach. *Methods Mol Biol* 567: 155-169.
 35. Greil F, Moorman C, van Steensel B (2006) DamID: mapping of in vivo protein-genome interactions using tethered DNA adenine methyltransferase. *Methods Enzymol* 410: 342-359.
 36. Cherry JM, Adler C, Ball C, Chervitz SA, Dwight SS, et al. (1998) SGD: Saccharomyces Genome Database. *Nucleic Acids Res* 26: 73-79.
 37. Gietz RD, Woods RA (2006) Yeast transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG method. *Methods Mol Biol* 313: 107-120.
 38. Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, et al. (2004) A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21: 947-962.
 39. Knop M, Siegers K, Pereira G, Zachariae W, Winsor B, et al. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15: 963-972.
 40. Sherman F (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350: 3-41.
 41. Sherman F (1998) An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Encyclopedia of the Molecular Biology and Molecular Medicine* 6: 302-325.
 42. Nirenberg MW, Matthaei JH (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 47: 1588-1602.
 43. Crick FH (1966) The genetic code--yesterday, today, and tomorrow. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31: 1-9.
 44. Ambrogelly A, Palioura S, Soll D (2007) Natural expansion of the genetic code. *Nat Chem Biol* 3: 29-35.
 45. Walsh CT (2005) Posttranslationale Proteinmodifikation: die Chemie der Proteomdiversifizierung. *Angew Chem Int Ed Engl*.
 46. Merrifield B (1985) Solid phase synthesis. Nobel lecture, 8 December 1984. *Biosci Rep* 5: 353-376.
 47. Budisa N, Minks C, Alefelder S, Wenger W, Dong F, et al. (1999) Toward the experimental codon reassignment in vivo: protein building with an expanded

- amino acid repertoire. *FASEB J* 13: 41-51.
48. Shimizu Y, Kuruma Y, Ying BW, Umekage S, Ueda T (2006) Cell-free translation systems for protein engineering. *FEBS J* 273: 4133-4140.
 49. Budisa N (2004) Prolegomena to future experimental efforts on genetic code engineering by expanding its amino acid repertoire. *Angew Chem Int Ed Engl* 43: 6426-6463.
 50. Budisa N, Karnbrock W, Steinbacher S, Humm A, Prade L, et al. (1997) Bioincorporation of telluromethionine into proteins: a promising new approach for X-ray structure analysis of proteins. *J Mol Biol* 270: 616-623.
 51. Cirino PC, Tang Y, Takahashi K, Tirrell DA, Arnold FH (2003) Global incorporation of norleucine in place of methionine in cytochrome P450 BM-3 heme domain increases peroxygenase activity. *Biotechnol Bioeng* 83: 729-734.
 52. Young TS, Schultz PG (2010) Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon. *J Biol Chem* 285: 11039-11044.
 53. Liu CC, Schultz PG (2010) Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annu Rev Biochem*.
 54. Chin JW, Cropp TA, Anderson JC, Mukherji M, Zhang Z, et al. (2003) An expanded eukaryotic genetic code. *Science* 301: 964-967.
 55. Chin JW, Cropp TA, Chu S, Meggers E, Schultz PG (2003) Progress toward an expanded eukaryotic genetic code. *Chem Biol* 10: 511-519.
 56. Wang L, Brock A, Herberich B, Schultz PG (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* 292: 498-500.
 57. Wang F, Robbins S, Guo J, Shen W, Schultz PG (2010) Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 5: e9354.
 58. Young TS, Ahmad I, Brock A, Schultz PG (2009) Expanding the genetic repertoire of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 48: 2643-2653.
 59. Sakamoto K, Hayashi A, Sakamoto A, Kiga D, Nakayama H, et al. (2002) Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 30: 4692-4699.
 60. Zhang Z, Alfonta L, Tian F, Bursulaya B, Uryu S, et al. (2004) Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8882-8887.
 61. Hino N, Okazaki Y, Kobayashi T, Hayashi A, Sakamoto K, et al. (2005) Protein photo-cross-linking in mammalian cells by site-specific incorporation of a photoreactive amino acid. *Nat Methods* 2: 201-206.
 62. Hino N, Hayashi A, Sakamoto K, Yokoyama S (2006) Site-specific incorporation of

LITERATURVERZEICHNIS

- non-natural amino acids into proteins in mammalian cells with an expanded genetic code. *Nat Protoc* 1: 2957-2962.
63. Mukai T, Kobayashi T, Hino N, Yanagisawa T, Sakamoto K, et al. (2008) Adding l-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 818-822.
 64. Xie J, Schultz PG (2006) A chemical toolkit for proteins--an expanded genetic code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 775-782.
 65. Peters FB, Brock A, Wang J, Schultz PG (2009) Photocleavage of the polypeptide backbone by 2-nitrophenylalanine. *Chem Biol* 16: 148-152.
 66. Lemke EA, Summerer D, Geierstanger BH, Brittain SM, Schultz PG (2007) Control of protein phosphorylation with a genetically encoded photocaged amino acid. *Nat Chem Biol* 3: 769-772.
 67. Cho H, Daniel T, Buechler YJ, Litzinger DC, Maio Z, et al. (2011) Optimized clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9060-9065.
 68. Berkel SSv, Eldijk MBv, Hest JCMv (2011) Staudinger-Ligation als Methode zur Biokonjugation. *Angewandte Chemie* 123: 8968-8989.
 69. Saxon E, Bertozzi CR (2000) Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science* 287: 2007-2010.
 70. Huisgen R (1963) 1,3-Dipolare Cycloadditionen.
 71. Tornøe CW, Christensen C, Meldal M (2002) Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J Org Chem* 67: 3057-3064.
 72. van Steenis DJ, David OR, van Strijdonck GP, van Maarseveen JH, Reek JN (2005) Click-chemistry as an efficient synthetic tool for the preparation of novel conjugated polymers. *Chem Commun (Camb)*: 4333-4335.
 73. Lallana E, Riguera R, Fernandez-Megia E (2011) Zuverlässige und effiziente Konjugation von Biomolekülen über Huisgen-Azid-Alkin-Cycloadditionen. *Angewandte Chemie* 123: 8956-8966.
 74. Schwyzer R, Caviezel M (1971) p-Azido-L-phenylalanine: a photo-affinity 'probe' related to tyrosine. *Helv Chim Acta* 54: 1395-1400.
 75. Dorman G, Prestwich GD (2000) Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol* 18: 64-77.
 76. Chin JW, Santoro SW, Martin AB, King DS, Wang L, et al. (2002) Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of *Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* 124: 9026-9027.
 77. Chen S, Schultz PG, Brock A (2007) An improved system for the generation and

- analysis of mutant proteins containing unnatural amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 371: 112-122.
78. Liu W, Brock A, Chen S, Schultz PG (2007) Genetic incorporation of unnatural amino acids into proteins in mammalian cells. *Nat Methods* 4: 239-244.
79. Takimoto JK, Adams KL, Xiang Z, Wang L (2009) Improving orthogonal tRNA-synthetase recognition for efficient unnatural amino acid incorporation and application in mammalian cells. *Mol Biosyst* 5: 931-934.
80. Deiters A, Cropp TA, Mukherji M, Chin JW, Anderson JC, et al. (2003) Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Chem Soc* 125: 11782-11783.
81. Deiters A, Cropp TA, Summerer D, Mukherji M, Schultz PG (2004) Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids. *Bioorg Med Chem Lett* 14: 5743-5745.
82. Tsao ML, Tian F, Schultz PG (2005) Selective Staudinger modification of proteins containing p-azidophenylalanine. *Chembiochem* 6: 2147-2149.
83. Grunbeck A, Huber T, Sachdev P, Sakmar TP (2011) Mapping the ligand-binding site on a G protein-coupled receptor (GPCR) using genetically encoded photocrosslinkers. *Biochemistry* 50: 3411-3413.
84. Zhang K, Diehl MR, Tirrell DA (2005) Artificial polypeptide scaffold for protein immobilization. *J Am Chem Soc* 127: 10136-10137.
85. Ye S, Zaitseva E, Caltabiano G, Schertler GF, Sakmar TP, et al. (2010) Tracking G-protein-coupled receptor activation using genetically encoded infrared probes. *Nature* 464: 1386-1389.
86. Wittelsberger A, Mierke DF, Rosenblatt M (2008) Mapping ligand-receptor interfaces: approaching the resolution limit of benzophenone-based photoaffinity scanning. *Chem Biol Drug Des* 71: 380-383.
87. Hermanson GT (1996) *Bioconjugate Techniques*. 163-165; 252-255;.
88. Wittelsberger A, Thomas BE, Mierke DF, Rosenblatt M (2006) Methionine acts as a "magnet" in photoaffinity crosslinking experiments. *FEBS Lett* 580: 1872-1876.
89. Son CD, Sargsyan H, Naider F, Becker JM (2004) Identification of ligand binding regions of the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-factor pheromone receptor by photoaffinity cross-linking. *Biochemistry* 43: 13193-13203.
90. Chin JW, Martin AB, King DS, Wang L, Schultz PG (2002) Addition of a photocrosslinking amino acid to the genetic code of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11020-11024.
91. Wang W, Takimoto JK, Louie GV, Baiga TJ, Noel JP, et al. (2007) Genetically encoding unnatural amino acids for cellular and neuronal studies. *Nat Neurosci* 10: 1063-1072.

LITERATURVERZEICHNIS

92. Shen B, Xiang Z, Miller B, Louie G, Wang W, et al. (2011) Genetically encoding unnatural amino acids in neural stem cells and optically reporting voltage-sensitive domain changes in differentiated neurons. *Stem Cells* 29: 1231-1240.
93. Mori H, Ito K (2006) Different modes of SecY-SecA interactions revealed by site-directed in vivo photo-cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16159-16164.
94. Das S, Oliver DB (2011) Mapping of the SecA.SecY and SecA.SecG interfaces by site-directed in vivo photocross-linking. *J Biol Chem* 286: 12371-12380.
95. Majmudar CY, Lee LW, Lancia JK, Nwokoye A, Wang Q, et al. (2009) Impact of nonnatural amino acid mutagenesis on the in vivo function and binding modes of a transcriptional activator. *J Am Chem Soc* 131: 14240-14242.
96. Meyer P, Prodromou C, Liao C, Hu B, Roe SM, et al. (2004) Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *Embo J* 23: 1402-1410.
97. Retzlaff M, Hagn F, Mitschke L, Hessling M, Gugel F, et al. (2010) Asymmetric activation of the hsp90 dimer by its cochaperone aha1. *Mol Cell* 37: 344-354.
98. Ali MM, Roe SM, Vaughan CK, Meyer P, Panaretou B, et al. (2006) Crystal structure of an Hsp90-nucleotide-p23/Sba1 closed chaperone complex. *Nature* 440: 1013-1017.
99. Mayer MP, Nikolay R, Bukau B (2002) Aha, another regulator for hsp90 chaperones. *Mol Cell* 10: 1255-1256.
100. Wandinger SK, Richter K, Buchner J (2008) The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* 283: 18473-18477.
101. Zuehlke A, Johnson JL (2010) Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* 93: 211-217.
102. Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, et al. (2002) Activation of the ATPase activity of hsp90 by the stress-regulated cochaperone aha1. *Mol Cell* 10: 1307-1318.
103. Lotz GP, Lin H, Harst A, Obermann WM (2003) Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *J Biol Chem* 278: 17228-17235.
104. Nathan DF, Vos MH, Lindquist S (1999) Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1409-1414.
105. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, et al. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* 11: 4241-4257.
106. Yoshikawa K, Tanaka T, Ida Y, Furusawa C, Hirasawa T, et al. (2011) Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression

- strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 28: 349-361.
107. Franzosa EA, Albanese V, Frydman J, Xia Y, McClellan AJ (2011) Heterozygous yeast deletion collection screens reveal essential targets of Hsp90. *PLoS One* 6: e28211.
 108. Mollapour M, Tsutsumi S, Truman AW, Xu W, Vaughan CK, et al. (2011) Threonine 22 phosphorylation attenuates Hsp90 interaction with cochaperones and affects its chaperone activity. *Mol Cell* 41: 672-681.
 109. Ran F, Gadura N, Michels CA (2010) Hsp90 cochaperone Aha1 is a negative regulator of the *Saccharomyces* MAL activator and acts early in the chaperone activation pathway. *J Biol Chem* 285: 13850-13862.
 110. Millson SH, Truman AW, Wolfram F, King V, Panaretou B, et al. (2004) Investigating the protein-protein interactions of the yeast Hsp90 chaperone system by two-hybrid analysis: potential uses and limitations of this approach. *Cell Stress Chaperones* 9: 359-368.
 111. Millson SH, Truman AW, King V, Prodromou C, Pearl LH, et al. (2005) A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slt2p (Mpk1p). *Eukaryot Cell* 4: 849-860.
 112. Mollapour M, Tsutsumi S, Donnelly AC, Beebe K, Tokita MJ, et al. (2010) Swe1Wee1-dependent tyrosine phosphorylation of Hsp90 regulates distinct facets of chaperone function. *Mol Cell* 37: 333-343.
 113. Hessling M, Richter K, Buchner J (2009) Dissection of the ATP-induced conformational cycle of the molecular chaperone Hsp90. *Nat Struct Mol Biol* 16: 287-293.
 114. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118: 401-415.
 115. Gietz RD, Triggs-Raine B, Robbins A, Graham KC, Woods RA (1997) Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Mol Cell Biochem* 172: 67-79.
 116. Bussey H, Storms RK, Ahmed A, Albermann K, Allen E, et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XVI. *Nature* 387: 103-105.
 117. Mortimer RK, Schild D, Contopoulou CR, Kans JA (1989) Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 10. *Yeast* 5: 321-403.
 118. Laughon A, Driscoll R, Wills N, Gesteland RF (1984) Identification of two proteins encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* GAL4 gene. *Mol Cell Biol* 4: 268-275.
 119. Laughon A, Gesteland RF (1982) Isolation and preliminary characterization of the GAL4 gene, a positive regulator of transcription in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6827-6831.
 120. Himmelfarb HJ, Pearlberg J, Last DH, Ptashne M (1990) GAL11P: a yeast mutation

LITERATURVERZEICHNIS

- that potentiates the effect of weak GAL4-derived activators. *Cell* 63: 1299-1309.
121. Marmorstein R, Carey M, Ptashne M, Harrison SC (1992) DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* 356: 408-414.
 122. Giniger E, Varnum SM, Ptashne M (1985) Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40: 767-774.
 123. Carey M, Kakidani H, Leatherwood J, Mostashari F, Ptashne M (1989) An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer. *J Mol Biol* 209: 423-432.
 124. Hidalgo P, Ansari AZ, Schmidt P, Hare B, Simkovich N, et al. (2001) Recruitment of the transcriptional machinery through GAL11P: structure and interactions of the GAL4 dimerization domain. *Genes Dev* 15: 1007-1020.
 125. Hong M, Fitzgerald MX, Harper S, Luo C, Speicher DW, et al. (2008) Structural basis for dimerization in DNA recognition by gal4. *Structure* 16: 1019-1026.
 126. Ma J, Ptashne M (1987) The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* 50: 137-142.
 127. Melcher K, Xu HE (2001) Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *Embo J* 20: 841-851.
 128. Kumar PR, Yu Y, Sternglanz R, Johnston SA, Joshua-Tor L (2008) NADP regulates the yeast GAL induction system. *Science* 319: 1090-1092.
 129. Suzuki-Fujimoto T, Fukuma M, Yano KI, Sakurai H, Vonika A, et al. (1996) Analysis of the galactose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: interaction between Gal3p and Gal80p. *Mol Cell Biol* 16: 2504-2508.
 130. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley & Sons.
 131. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
 132. Pluthero FG (1993) Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 21: 4850-4851.
 133. Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 2110-2114.
 134. Higa A, Mandel M (1970) Actinomycin sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 108: 41-46.
 135. Hoffman CS, Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-272.
 136. Ito H, Fukuda Y, Murata K, Kimura A (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153: 163-168.

137. Gietz RD, Schiestl RH (2007) Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* 2: 35-37.
138. Wessel D, Flugge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138: 141-143.
139. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
140. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
141. Tatusova TA, Madden TL (1999) BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 174: 247-250.
142. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
143. Altelaar AF, Munoz J, Heck AJ (2013) Next-generation proteomics: towards an integrative view of proteome dynamics. *Nat Rev Genet* 14: 35-48.
144. Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, et al. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4569-4574.
145. Gavin AC, Bosche M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, et al. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415: 141-147.
146. Michalowski A (2011) Eine Methode zur kreuzvernetzung interagierender Proteine *in vivo*. Universität Stuttgart.
147. Walter W (1991) *Lehrbuch der organischen Chemie*: S. Hirzel Verlag Stuttgart.
148. Zatkova A (2011) An update on molecular genetics of Alkaptonuria (AKU). *J Inherit Metab Dis* 34: 1127-1136.
149. Driscoll MC (2007) Sickle cell disease. *Pediatr Rev* 28: 259-268.
150. Geiler-Samerotte KA, Dion MF, Budnik BA, Wang SM, Hartl DL, et al. (2011) Misfolded proteins impose a dosage-dependent fitness cost and trigger a cytosolic unfolded protein response in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 680-685.
151. Evers TH, Appelhof MA, Meijer EW, Merckx M (2008) His-tags as Zn(II) binding motifs in a protein-based fluorescent sensor. *Protein Eng Des Sel* 21: 529-536.
152. Wu J, Filutowicz M (1999) Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochim Pol* 46: 591-599.
153. Evans ME, Jones DP, Ziegler TR (2005) Glutamine inhibits cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells via the pyrimidine pathway. *Am J*

LITERATURVERZEICHNIS

- Physiol Gastrointest Liver Physiol 289: G388-396.
154. Rosenthal GA, Dahlman DL, Janzen DH (1976) A novel means for dealing with L-canavanine, a toxic metabolite. *Science* 192: 256-258.
 155. Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, et al. (2008) The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature* 452: 872-876.
 156. Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10: 57-63.
 157. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, et al. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315-322.
 158. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449: 851-861.
 159. Clarke J, Wu HC, Jayasinghe L, Patel A, Reid S, et al. (2009) Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nat Nanotechnol* 4: 265-270.
 160. Hüsing B, Hartig J, Bührle B, Reiß T, Gaisser S (2008) Individualisierte Medizin und Gesundheitssystem. 126: 348.
 161. DFG, Acatech, Leopoldina (2009) Synthetische Biologie - Stellungnahme.
 162. Smolke C (2010) *The Metabolic Pathway Engineering Handbook: Fundamentals*.
 163. Chan SY, Appling DR (2003) Regulation of S-adenosylmethionine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 43051-43059.
 164. Roje S, Chan SY, Kaplan F, Raymond RK, Horne DW, et al. (2002) Metabolic engineering in yeast demonstrates that S-adenosylmethionine controls flux through the methylenetetrahydrofolate reductase reaction in vivo. *J Biol Chem* 277: 4056-4061.
 165. Liu J, Castaneda CA, Wilkins BJ, Fushman D, Cropp TA (2010) Condensed *E. coli* cultures for highly efficient production of proteins containing unnatural amino acids. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 5613-5616.
 166. Edwards H, Trezeguet V, Schimmel P (1991) An *Escherichia coli* tyrosine transfer RNA is a leucine-specific transfer RNA in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 1153-1156.
 167. Curran JF, Yarus M (1987) Reading frame selection and transfer RNA anticodon loop stacking. *Science* 238: 1545-1550.
 168. Anderson JC, Wu N, Santoro SW, Lakshman V, King DS, et al. (2004) An expanded genetic code with a functional quadruplet codon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7566-7571.

169. Glass JI, Assad-Garcia N, Alperovich N, Yooseph S, Lewis MR, et al. (2006) Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 425-430.
170. Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Baden-Tillson H, et al. (2008) Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science* 319: 1215-1220.
171. Kudla G, Murray AW, Tollervey D, Plotkin JB (2009) Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science* 324: 255-258.
172. Gurvich OL, Baranov PV, Gesteland RF, Atkins JF (2005) Expression levels influence ribosomal frameshifting at the tandem rare arginine codons AGG₂ and AGA₂ in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 4023-4032.
173. Chen D, Texada DE (2006) Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. *Gene Therapy and Molecular Biology* 10: 1-12.
174. Hirao I, Kimoto M (2012) Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 88: 345-367.
175. Forne I, Ludwigsen J, Imhof A, Becker PB, Mueller-Planitz F (2012) Probing the conformation of the ISWI ATPase domain with genetically encoded photoreactive crosslinkers and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 11: M111 012088.
176. Krishnamurthy M, Dugan A, Nwokoye A, Fung YH, Lancia JK, et al. (2011) Caught in the act: covalent cross-linking captures activator-coactivator interactions in vivo. *ACS Chem Biol* 6: 1321-1326.
177. Chen HT, Warfield L, Hahn S (2007) The positions of TFIIF and TFIIE in the RNA polymerase II transcription preinitiation complex. *Nat Struct Mol Biol* 14: 696-703.
178. Grunbeck A, Huber T, Abrol R, Trzaskowski B, Goddard WA, 3rd, et al. (2012) Genetically encoded photo-cross-linkers map the binding site of an allosteric drug on a G protein-coupled receptor. *ACS Chem Biol* 7: 967-972.
179. Tsutsumi S, Mollapour M, Prodromou C, Lee CT, Panaretou B, et al. (2012) Charged linker sequence modulates eukaryotic heat shock protein 90 (Hsp90) chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 2937-2942.
180. Schmid S, Hugel T (2011) Regulatory posttranslational modifications in hsp90 can be compensated by cochaperone aha1. *Mol Cell* 41: 619-620.
181. Pham ND, Parker RB, Kohler JJ (2012) Photocrosslinking approaches to interactome mapping. *Curr Opin Chem Biol*.
182. Lodi T, Donnini C, Ferrero I (1991) Catabolite repression by galactose in overexpressed GAL4 strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 137: 1039-1044.
183. Griggs DW, Johnston M (1991) Regulated expression of the GAL4 activator gene in

LITERATURVERZEICHNIS

- yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 8597-8601.
184. Griggs DW, Johnston M (1993) Promoter elements determining weak expression of the GAL4 regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 13: 4999-5009.
185. Urlinger S, Baron U, Thellmann M, Hasan MT, Bujard H, et al. (2000) Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A 97: 7963-7968.
186. Zhou X, Vink M, Klaver B, Berkhout B, Das AT (2006) Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. Gene Ther 13: 1382-1390.
187. Tian F, Tsao ML, Schultz PG (2004) A phage display system with unnatural amino acids. J Am Chem Soc 126: 15962-15963.
188. Seo MH, Han J, Jin Z, Lee DW, Park HS, et al. (2011) Controlled and oriented immobilization of protein by site-specific incorporation of unnatural amino acid. Anal Chem 83: 2841-2845.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Lebenszyklus von heterothallischen und homothallischen <i>S. cerevisiae</i> - Stämmen.....	- 21 -
Abbildung 2: Orthogonalität des Aminoacyl-tRNA-Synthetase/tRNA _{CUA} -Paares während der Translation.....	- 26 -
Abbildung 3: <i>p</i> -Azidophenylalanin und <i>p</i> -Benzoylphenylalanin	- 28 -
Abbildung 4: Hsp90-Domänen, ihre Funktionen und die interagierenden Co-Chaperone	- 30 -
Abbildung 5: 3D-Kristallstruktur des Komplexes zwischen Hsp90 und Aha1	- 32 -
Abbildung 6: Schematische Übersicht des Aktivierungsmechanismus des Hsp90 Homodimers durch ein Aha1-Protein.....	- 33 -
Abbildung 7: Kristallstruktur des Gal4/DNA-Komplexes	- 35 -
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Strategie zur Studie von Protein-Protein- Wechselwirkungen.....	- 81 -
Abbildung 9: Aha1/Hsp90 Kristallstruktur und die Region im Aha1-Protein für den Einbau von pAzpa.....	- 83 -
Abbildung 10: Expression der Aha1-Varianten in Abhängigkeit von pAzpa	- 84 -
Abbildung 11: p-Azpa-abhängige Biotinylierung von Aha1 an der Position 64.....	- 86 -
Abbildung 12: p-Azpa-abhängige Markierung von Aha1 an der Position 64 mit einem Fluoreszenzfarbstoff.....	- 88 -
Abbildung 13: Native Co-Immunpräzipitation des Hsp90-Proteins mit Aha1-Varianten als <i>Bait</i> -Protein	- 90 -
Abbildung 14: Aha1-Positionen, die ein kovalent quervernetzten Dimer ausbilden.....	- 91 -
Abbildung 15: Aha1-Positionen, die kein kovalent quervernetzten Dimer ausbilden	- 92 -
Abbildung 16: Aha1-Positionen nach UV-Belichtung.....	- 92 -
Abbildung 17: Reproduktion des Dimers mit der nicht-kanonischen Aminosäure pBzpa	- 93 -
Abbildung 18: Hsp90 unabhängige Quervernetzung.....	- 95 -
Abbildung 19: Charakterisierung des Dimers mittels 2D-Gelelektrophorese	- 96 -
Abbildung 20: Silberfärbung der Eluate nach der Immunpräzipitation.....	- 98 -
Abbildung 21: Massenspektrum für das Aha1 I64X Monomer	- 100 -
Abbildung 22: Massenspektrum für das Aha1 I64X Dimer	- 101 -
Abbildung 23: Fusion des endogenen Aha1 (wt) mit HA-Epitop	- 103 -
Abbildung 24: Native Co-Immunpräzipitation von Aha1-HA	- 104 -
Abbildung 25: Quervernetzung von mutagenisiertem Aha1 und Aha1-HA.....	- 105 -
Abbildung 26: Quervernetzung von Aha1-V5 ohne den 6 x His-Tag	- 106 -

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 27: Quervernetzung von Aha1-HA und des Aha1-FLAG	- 107 -
Abbildung 28: Wachstumsverhalten von <i>S. cerevisiae</i> in Abhängigkeit von den nicht-kanonischen Aminosäuren und des orthogonalen Pärchens	- 110 -
Abbildung 29: Quervernetzung in Abhängigkeit von der Belichtungsdauer	- 112 -
Abbildung 30: Quervernetzung in Abhängigkeit von dem Belichtungszeitpunkt nach der Induktion der Aha1 I64X Expression	- 113 -
Abbildung 31: Quervernetzung in Abhängigkeit von unterschiedlichen pAzpa-Konzentrationen	- 114 -
Abbildung 32: Schematische Darstellung der Strategie zur Studie von Protein-DNA-Wechselwirkungen	- 116 -
Abbildung 33: Kristallstruktur des Gal4/DNA-Komplexes	- 117 -
Abbildung 34: Expression der Gal4-Varianten in Abhängigkeit von pAzpa	- 118 -
Abbildung 35: Slot Blot-Analyse zur Detektion von Quervernetzungsereignissen	- 119 -
Abbildung 36: Spezifische Präzipitation der <i>GAL7</i> -Promotorsequenz	- 120 -
Abbildung 37: Vergleich von spezifischer und unspezifischer Elution	- 121 -
Abbildung 38: Multiplex-PCR mit präzipitierten DNA-Fragmenten	- 122 -
Abbildung 39: Karte der Gal4-Konsensussequenz und an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren	- 159 -
Abbildung 40: Gal4-Proteindomänen	- 160 -
Abbildung 41: Anzahl der DNA-Konsensussequenzen in unterschiedlichen durch Gal4 regulierten Genen	- 160 -
Abbildung 42: Vergleich der Aminosäuresequenz von Hsp82 mit Hsc82	- 161 -
Abbildung 43: Alignment der Aha1-Homologe	- 162 -
Abbildung 44: Selektionsschema für genetisch kodierte nicht-kanonische Aminosäuren in <i>S. cerevisiae</i>	- 163 -
Abbildung 45: Zusammenfassung posttranslationaler Seitenkettenmodifikationen	- 164 -
Abbildung 46: UV-abhängige Anregung der Azidogruppe und ihre Abreaktion	- 165 -
Abbildung 47: UV-abhängige Anregung der Benzoylgruppe und ihre Abreaktion	- 165 -
Abbildung 48: Plasmidkarte des für die Expression von <i>AHA1</i> und <i>GAL4</i> verwendeten Plasmids pYES2/CT von Invitrogen.	- 166 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Antibiotika und Antimykotika.....	- 37 -
Tabelle 2: Reaktions-Kitsysteme	- 38 -
Tabelle 3: Pufferlösungen.....	- 38 -
Tabelle 4: Kulturmedien für Bakterien und Hefen.....	- 39 -
Tabelle 5: Zusätze zu den Medien	- 39 -
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.....	- 40 -
Tabelle 7: Verwendete Enzyme.....	- 40 -
Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete Plasmide	- 41 -
Tabelle 9: Primer zur Amplifikation der genomischen <i>GAL4</i> -Sequenz für die anschließende Klonierung	- 43 -
Tabelle 10: Primer für die <i>GAL4</i> -Mutagenese (<i>QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis</i> Protokoll)	- 43 -
Tabelle 11: Primer für die <i>GAL4</i> -Sequenzierung.....	- 43 -
Tabelle 12: Primer für die semiquantitative PCR	- 43 -
Tabelle 13: Primer zur Amplifikation der genomischen <i>AHA1</i> -Sequenz für die Klonierung- 43	
-	
Tabelle 14: Primer für die <i>AHA1</i> -Mutagenese (<i>Phusion Site Directed Mutagenesis</i> Protokoll) .-	44 -
Tabelle 15: Primer für die <i>AHA1</i> -Sequenzierung.....	- 44 -
Tabelle 16: Primer für das PCR-Tagging Protokoll (N-terminal).....	- 44 -
Tabelle 17: Primer für das PCR-Tagging Protokoll (C-terminal).....	- 44 -
Tabelle 18: Epitopsequenzen.....	- 44 -
Tabelle 19: In dieser Arbeit hergestellte und verwendete <i>S. cerevisiae</i> -Stämme	- 45 -
Tabelle 20: Amplifikationsansatz (<i>QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis</i>).....	- 55 -
Tabelle 21: Amplifikationsprotokoll (<i>QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis</i>)	- 55 -
Tabelle 22: Phosphorylierungsansatz.....	- 57 -
Tabelle 23: Amplifikationsansatz (<i>Phusion Site-Directed Mutagenesis</i>)	- 57 -
Tabelle 24: Amplifikationsprotokoll (<i>Phusion Site-Directed Mutagenesis</i>).....	- 58 -
Tabelle 25: Ligationsansatz für die Zirkularisation der Vektoren.....	- 58 -
Tabelle 26: <i>DpnI</i> -Ansatz	- 58 -
Tabelle 27: Amplifikationsansatz mit einem Primerpaar (Semiquantitative PCR)	- 59 -
Tabelle 28: Amplifikationsprotokoll (Semiquantitative PCR)	- 59 -
Tabelle 29: Amplifikationsansatz (PCR-Tagging).....	- 60 -

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 30: Amplifikationsprotokoll (PCR-Tagging)	- 60 -
Tabelle 31: Pipettierschema für die Herstellung von zwei kleinen Trenngelen (5 cm x 8 cm x 1 mm).....	- 70 -
Tabelle 32: Pipettierschema für die Herstellung von zwei großen Trenngelen.....	- 70 -
(12 cm x 16 cm x 1 mm).....	- 70 -
Tabelle 33: Programm für die Auftrennung in der 1. Dimension.....	- 73 -

ANHANG

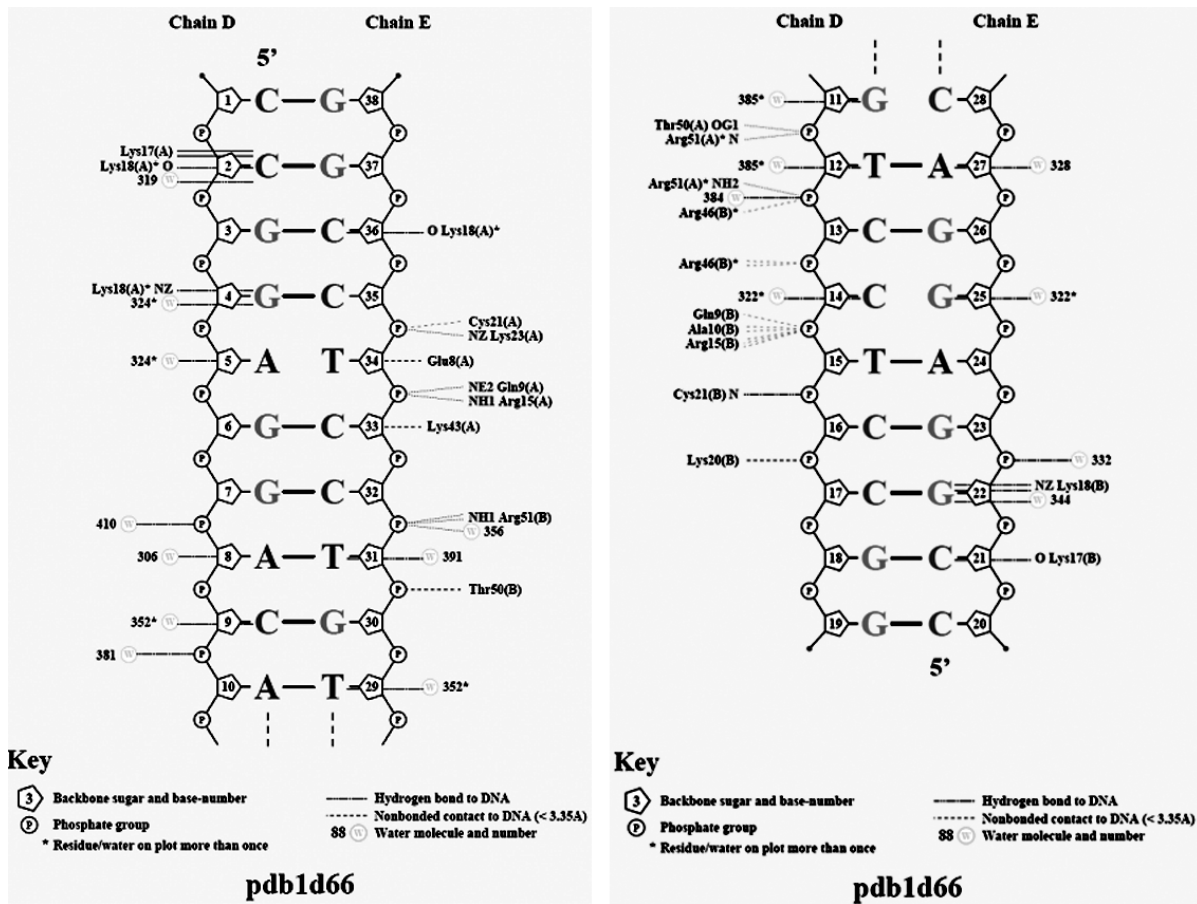


Abbildung 39: Karte der Gal4-Konsensussequenz und an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäuren

Zu sehen ist die DNA-Konsensussequenz (CGNNNNNNNNNNCCG) als Doppelstrang und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren (Name und Position in der Peptidsequenz). Auch die Aminosäuren, die räumlich bis auf 3,35 Å an die DNA herankommen, aber keine direkte Bindung zur DNA ausbilden, wurden dargestellt (gestrichelte Linie). Quelle: <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPS.pl?pdbcode=1d66&psfile=nucplot.ps&pdf=YES>

ANHANG

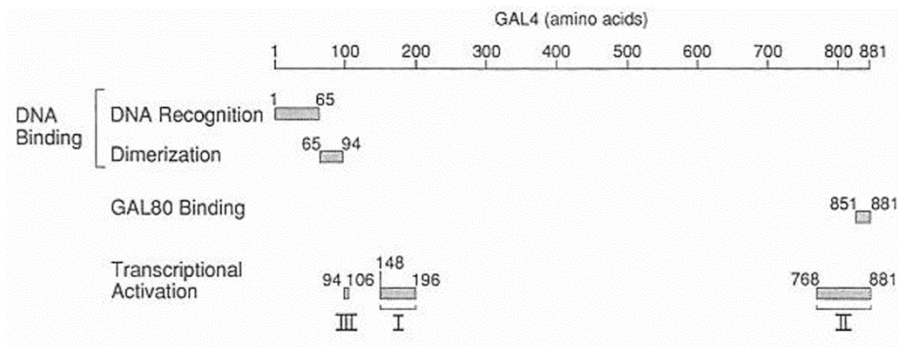


Abbildung 40: Gal4-Proteindomänen

Oben ist die Gal4-Aminosäuresequenz von Aminosäure 1 - 881 dargestellt. Darunter ist die Lokalisation der einzelnen Domänen im Protein zu sehen. Quelle: [22]

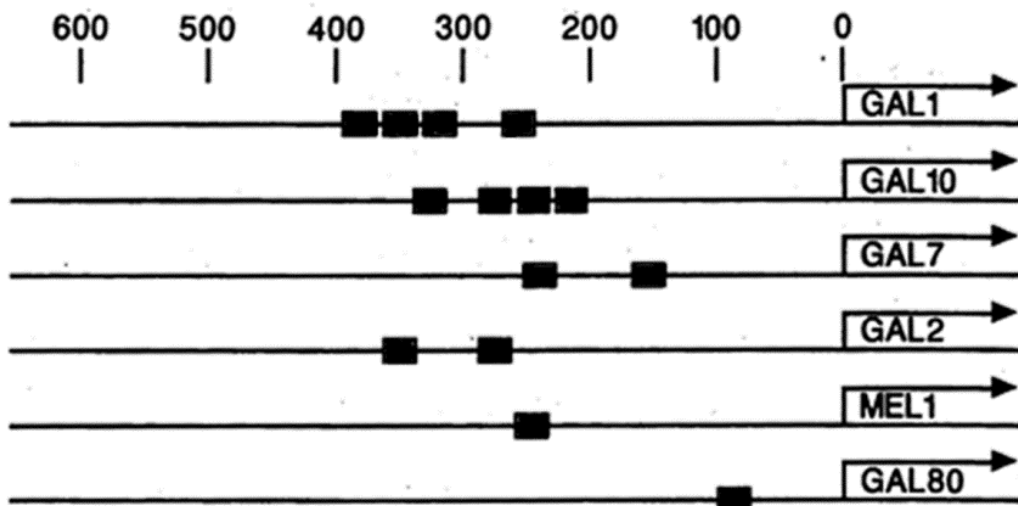


Abbildung 41: Anzahl der DNA-Konsensussequenzen in unterschiedlichen durch Gal4 regulierten Genen

DNA-Konsensussequenzen (schwarze Boxen) innerhalb des Promoter-Bereichs einiger durch Gal4 regulierter Gene. Quelle: [24]

>lcl|39831 YMR186W Chr 13
Length=706

Score = 1278 bits (3306), Expect = 0.0, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 681/710 (96%), Positives = 696/710 (98%), Gaps = 4/710 (1%)

Hsp82	1	MA S ETFEFQAEITQLMSLIINTVYSNKEIFLRELISNASDALDKIRY K SLSDPKQLETEP	60
Hsc82	1	MA ETFEFQAEITQLMSLIINTVYSNKEIFLRELISNASDALDKIRY ++ LSDPKQLETEP	60
Hsp82	61	DLFIRITPKPE Q KVLEIRDSGIGMTKAEIINNLTGIAKSGTKAFMEALSAGADVSMIGQF	120
Hsc82	61	DLFIRITPKPE + KVLEIRDSGIGMTKAEIINNLTGIAKSGTKAFMEALSAGADVSMIGQF	120
Hsp82	121	GVGFYSLFLVADRVQVISK S NDEQYIWESNAGGSFTVTLDEVNERIGRGT I LRLFLKDD	180
Hsc82	121	GVGFYSLFLVADRVQVISK ++ NDEQYIWESNAGGSFTVTLDEVNERIGRGT + LRLFLKDD	180
Hsp82	181	QLEYLEEKRIKEVIKRHSEFVAYPIQL V VTKEVEKEVPIPEEEKKDEEKKDE EKKDEDD K	240
Hsc82	181	QLEYLEEKRIKEVIKRHSEFVAYPIQL + VTKEVEKEVPIPEEEKKDEEKKDE + K K	236
Hsp82	241	KPKLEEV DEEEKKPKTKKVKEEVQ E I EELNKTPLWTRNPSDITQEEYNAFYKISNDW	300
Hsc82	237	PKLEEV DEEEKKPKTKKVKEEVQ LE EELNKTPLWTRNPSDITQEEYNAFYKISNDW	296
Hsp82	301	EDPLYVKHFSVEGQLEFRAILFIPKRAPFDLFESKKKKNNIKLYVRRVFITDEAEDLIPE	360
Hsc82	297	EDPLYVKHFSVEGQLEFRAILFIPKRAPFDLFESKKKKNNIKLYVRRVFITDEAEDLIPE	356
Hsp82	361	WLSFVKGVDSEDLPLNLSREMLQQNKIMKVIRKNI VKKLIEAFNEIAEDSEQ F EKFYSA	420
Hsc82	357	WLSFVKGVDSEDLPLNLSREMLQQNKIMKVIRKNI VKKLIEAFNEIAEDSEQ + KFYSA	416
Hsp82	421	F SKNIKLGVEDTQNRAALAKLLRYNSTKSVDELTS LTDYVTRMPEHQKNIYYITGESLK	480
Hsc82	417	F AKNIKLGVEDTQNRAALAKLLRYNSTKSVDELTS LTDYVTRMPEHQKNIYYITGESLK	476
Hsp82	481	AVEKSPFLDALKAKNFEVLF LTDPIDEYAFTQLKEFEGKTLVDITKDFELEETDEEKAER	540
Hsc82	477	AVEKSPFLDALKAKNFEVLF LTDPIDEYAFTQLKEFEGKTLVDITKDFELEETDEEKAER	536
Hsp82	541	EKEIKEYEPLTKALK E ILGDQVEKVVVSYKLLDAPAAIRTGQFGWSANMERIMKAQALRD	600
Hsc82	537	EKEIKEYEPLTKALK + ILGDQVEKVVVSYKLLDAPAAIRTGQFGWSANMERIMKAQALRD	596
Hsp82	601	SSMSSYMSSKKTFEISPKSPIIKELKRVDEGGAQDKTVKDLT KLLY ETALLTSGFSL DE	660
Hsc82	597	SSMSSYMSSKKTFEISPKSPIIKELKRVDEGGAQDKTVKDLT LL + ETALLTSGFSL + E	656
Hsp82	661	PTSFASRINRLISLGLNIDEDEETETAPEAST A APVEEVPADTEMEEVD* 710	
Hsc82	657	PTSFASRINRLISLGLNIDEDEETETAPEAST E APVEEVPADTEMEEVD* 706	

Abbildung 42: Vergleich der Aminosäuresequenz von Hsp82 mit Hsc82

Beide Proteine zeigen eine 96%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz. Abweichungen in der Aminosäuresequenz zwischen den beiden Proteinen ist hauptsächlich im Bereich der Aminosäuren 232 bis 249 zu sehen. Hsc82 fehlt das Aminosäuremotiv DEDD.

ANHANG

sp Q8BK64 AHSA1_MOUSE	MAKWGEGDPRWIVEERADATNVNNHHWTERDASNWSTEKLKTLFLAVRVE	50
sp O95433 AHSA1_HUMAN	MAKWGEGDPRWIVEERADATNVNNHHWTERDASNWSTDKLKTFLAVQVQ	50
tr Q9V9Q4 Q9V9Q4_DROME	MAKWGEGDPRWIVEERPDATNVNNHHWTEKNATPWSKDRLHQLFQDFKIG	50
tr Q9LHL7 Q9LHL7_ARATH	MAKFGEGDKRWIVEDRPDGTNVHNNHWSETNCLEWSRNFFTKQFSGVDIL	50
sp Q12449 AHA1_YEAST	-----MVVNNP-----NNHHWVDKNKCI GWAKEYYFKQKLVGVEAG	34
tr Q5ACP0 Q5ACP0_CANAL	-----MVVNNP-----NNHHWVDKNCLPWSVDYFKDKLINLKV	34
	: * : . . : : * * * * : : . : * : : : .	
sp Q8BK64 AHSA1_MOUSE	NEEG--KCEVTEVKNLDGEASINN RKGKLI FFYEWTIKLNWTG-----TS	93
sp O95433 AHSA1_HUMAN	NEEG--KCEVTEVSKLDGEASINN RKGKLI FFYEWVSKLNWTG-----TS	93
tr Q9V9Q4 Q9V9Q4_DROME	QSDI--ECAVDSVDKCSGEATVNN RKGKLI FFYEWELVLKWSGKL---LK	95
tr Q9LHL7 Q9LHL7_ARATH	SGEGLNFIKVSKIEKVEGEAYVNV RKGKLI PGYELNVSLSWEGEAKDSGD	100
sp Q12449 AHA1_YEAST	SVKDKKYAKIKSVSSIEGDCEVNV QKKGKVISL FDLKITVVLIEGHVD-SKD	83
tr Q5ACP0 Q5ACP0_CANAL	DGTNN--VHISEVSVSEGDVDV QKKGKVI SLFDIKIIVLTFKGNATA-KDD	81
	. : * : : . * * * * : * : : : *	
sp Q8BK64 AHSA1_MOUSE	KSGVQYKGHVEIPNLSDENSVDEVEISVSLAK--DEPDTNLVALMKEDGV	141
sp O95433 AHSA1_HUMAN	KSGVQYKGHVEIPNLSDENSVDEVEISVSLAK--DEPDTNLVALMKEEGV	141
tr Q9V9Q4 Q9V9Q4_DROME	NSKLIHKGKLTIPNLSSEENELADVEITVTIDESNDESET-LKQFMYNVGR	144
tr Q9LHL7 Q9LHL7_ARATH	KTLLKADGLVDMPIYISDENADEDPEIRFSVKD-EGPIGRTLKAMVKKGL	149
sp Q12449 AHA1_YEAST	GSALPFEGSINVPVAFDSEASSYQFDISIFK-ETSELSEAKPLIRSELL	132
tr Q5ACP0 Q5ACP0_CANAL	N----VSGSITPELTYDSEVDGLQFDISIYN-ETAENSGITDLIKQOLI	126
	* : * : * : : . : : . : . : . : .	
sp Q8BK64 AHSA1_MOUSE	KLLREAVGIYISTLKTEFTQGMILPTVNGES--VDPVG--QPALKTE---	184
sp O95433 AHSA1_HUMAN	KLLREAVGIYISTLKTEFTQGMILPTMNGES--VDPVG--QPALKTE---	184
tr Q9V9Q4 Q9V9Q4_DROME	DRVRQQLASYIRELKEEYSKNLILPKKGDEAGAGNTVANFKDANNTR---	191
tr Q9LHL7 Q9LHL7_ARATH	EIILEKVRVYVEAMARGGPCRDELESKKVAP-KSVAAGSATVAVEKS---	195
sp Q12449 AHA1_YEAST	PKLRQIFQQFGKDLLATHGNDIQVPESQVKSNYTRGNQKSSFTI IKD---	179
tr Q5ACP0 Q5ACP0_CANAL	PQLRTALMKFGPDLIEINSKDIQLSQDKVTSTYTKANQSSTIAATADHPK	176
	: . : : : : . : . : .	
sp Q8BK64 AHSA1_MOUSE	-----TCKAKSAPSKSQAKP-----VGVKIPTCKITLKETFLTSPE	220
sp O95433 AHSA1_HUMAN	-----ERKAKPAPSKTQARP-----VGVKIPTCKITLKETFLTSPE	220
tr Q9V9Q4 Q9V9Q4_DROME	-----NAAQNIALNSSVAAPRLKNSGIGCKLDVRTLSMTEEFHCSAN	233
tr Q9LHL7 Q9LHL7_ARATH	-----GAAPVVSAAAVESKVVKEKKKATKEGFKITMTKEKFNCRAR	237
sp Q12449 AHA1_YEAST	SASKP--KKNALPSTSTSAVSVSTNKVQPQNGSGNSTSIYLEPTFNVPS	227
tr Q5ACP0 Q5ACP0_CANAL	SESKPVEKKTETHSTSNIAARKVVSSEKDSSTVPKYNTTTLHLEPSFNTSAE	226
	: : : : : . : : : *	
sp Q8BK64 AHSA1_MOUSE	ELYRVFTTQELVQAFTHAPAALD---RGGKFHMVDGNVTGEFTDLVP	266
sp O95433 AHSA1_HUMAN	ELYRVFTTQELVQAFTHAPATLEAD---RGGKFHMVDGNVSGEFTDLVP	266
tr Q9V9Q4 Q9V9Q4_DROME	DLYNALTKEPMTVAFTRAPAKVDAV---RGGEFILYGGNVLGKFEELVP	279
tr Q9LHL7 Q9LHL7_ARATH	DLYETLMDENRWKGFQSNAKISKD---VNGPISVFDGSVTGMNLEEE	283
sp Q12449 AHA1_YEAST	ELYETFLDKQRILAWTRSAQFFNSGPKLETKEKFEFPGNVI SELVSCEK	277
tr Q5ACP0 Q5ACP0_CANAL	QIYLTLLDEARIGAWTRSAPVIEKFPKPEGSE-FKFFGGSVSGKFLKLV	275
	::* : : : : * : : . : . * . . .	
sp Q8BK64 AHSA1_MOUSE	EKHIAMKWRFKSWPEGHFATITLTFID-KN-GETELCMEGRGIP-----	308
sp O95433 AHSA1_HUMAN	EKHIVMWRFKSWPEGHFATITLTFID-KN-GETELCMEGRGIP-----	308
tr Q9V9Q4 Q9V9Q4_DROME	EKKIQQSWRLKNWTSGHYSNVVI ELEE-TS-SSTMMLKQGTGIP-----	321
tr Q9LHL7 Q9LHL7_ARATH	GKLIIVQKWRFGSWPDGLDSTVKIVFEEPQP-GVTIVNLTHTDVPEEDRYG	332
sp Q12449 AHA1_YEAST	DKKLVFHWKLDKWSAPFNSTIEMTFHESQEFHETKLQVQKWTGIP-----	321
tr Q5ACP0 Q5ACP0_CANAL	NEQIVELWRLLDDWKAGHFAQLDMKLVQSS--GETKLVVKFSGIP-----	317
	: : * : . * : : : : : * : : : . : *	
sp Q8BK64 AHSA1_MOUSE	-APEEERTRQGWQRYFFEGIKQTFYGARLF--- 338	
sp O95433 AHSA1_HUMAN	-APEEERTRQGWQRYFFEGIKQTFYGARLF--- 338	
tr Q9V9Q4 Q9V9Q4_DROME	-ASEFDAMKTNWRYYYWHSIKQTFGFGTSSDAL 354	
tr Q9LHL7 Q9LHL7_ARATH	NATVVENTERGWDRDLIFHRIRAVFGFGI----- 360	
sp Q12449 AHA1_YEAST	-VGEEEDRVANFEEYYVRSIKLTFGFGAVL---- 350	
tr Q5ACP0 Q5ACP0_CANAL	-IGEEERVKNNFEEERYIRSIKITFGFGAVL---- 346	
	: . : . : * : * * : *	

Abbildung 43: Alignment der Aha1-Homologe

Für das Alignment wurden Aha1-Homologe aus *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST), *Arabidopsis thaliana* (ARATH), *Drosophila melanogaster* (DROME), *Mus musculus* (MOUSE), *Homo sapiens* (HUMAN) und *Candida albicans* (CANAL) verwendet. Der in allen Spezies hochkonservierte und für diese Studie relevante Sequenzabschnitt ist in rot hervorgehoben. Die jeweils für *p*-Azidophenylalnin ausgetauschten Aminosäuren sind gelb markiert. Ein Asterisk (*) markiert vollständig konservierte Aminosäuren, ein Doppelpunkt (:) starke Konservierung der Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren und ein Punkt (.) markiert schwache Konservierung der Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren.

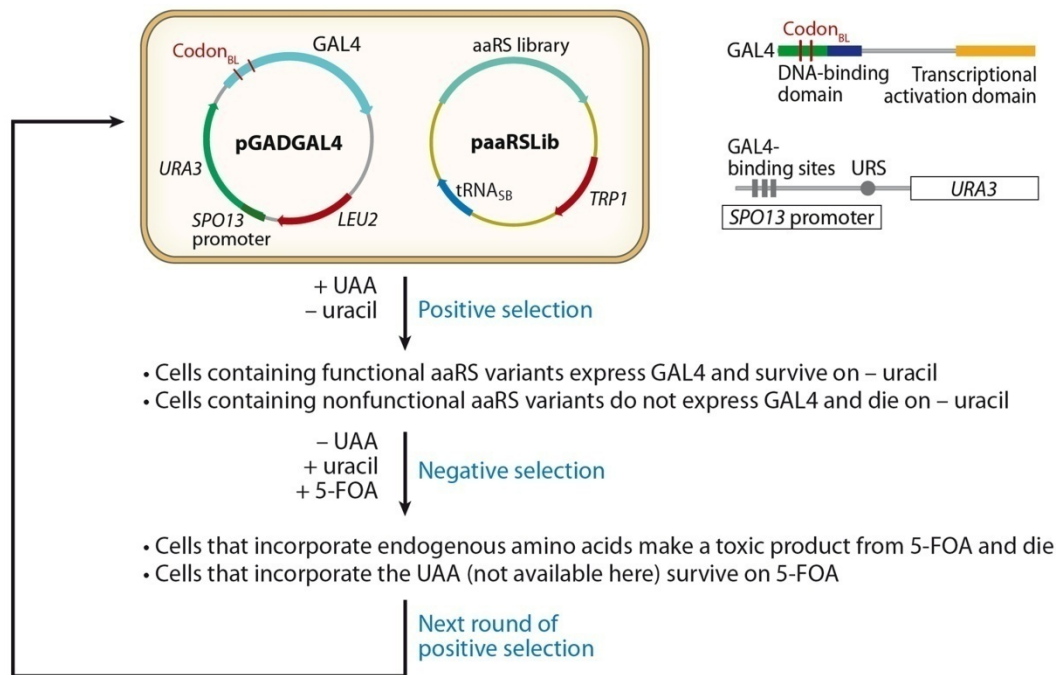


Abbildung 44: Selektionsschema für genetisch kodierte nicht-kanonische Aminosäuren in *S. cerevisiae*

Um das Aminosäure-Repertoire von *S. cerevisiae* um eine nicht-kanonische Aminosäure (UAA) zu erweitern, wurde eine Selektion mit zwei Schritten durchgeführt. *S. cerevisiae* wurde mit zwei Plasmiden transfiziert. Das eine Plasmid (paaRSLib) kodiert für eine zufällig mutagenisierte Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) und die jeweilige Amber-Suppressor-tRNA (tRNA_{SB}). Das andere Plasmid (pGADGAL4) kodiert für den Transkriptionsfaktor *GAL4* mit zwei Amber-Stopp-Codons in der DNA-Bindedomäne und den Auxotrophiemarker *URA3* unter der Kontrolle des *SPO13*-Promotors, welcher drei Gal4-Bindestellen besitzt. Zuerst folgt ein positiver Selektionsschritt, hier werden Zellen auf SC-Ura-Platten und der nicht-kanonischen Aminosäure kultiviert. Kann die entsprechende aaRS die tRNA_{SB} aminoacylieren und diese das Amber-Codon supprimieren, wird Gal4 exprimiert und die Zellen überleben. Als nächstes folgt ein negativer Selektionsschritt. Hier sollen die Klone ausselektiert werden, die die tRNA_{SB} mit kanonischen Aminosäuren aminoacylieren. Klone werden auf SC^{+Ura}-Platten mit 5-fluoroorotic acid (5-FOA) und ohne die Zugabe der nicht-kanonischen Aminosäure ausplattiert. Wird Ura3 exprimiert entsteht aus 5-FOA ein toxisches Produkt und die Zellen überleben nicht. Anschließend wird noch ein positiver Selektionsschritt nachgeschaltet. Abbildung aus [53].

Tabelle 1: Posttranslationale Proteinmodifikationen durch Modifikation der Seitenketten.^[a]

Aminosäurerest	Reaktion	Beispiel
Asp	Phosphorylierung	Proteintyrosinphosphatasen; Antwortregulatoren in Zweikomponentensystemen
Glu	Isomerisierung zu isoAsp	
	Methylierung	Chemotaxis-Rezeptorproteine
	Carboxylierung	Gla-Reste bei der Blutkoagulation
Ser	Polyglycinierung	Tubulin
	Polyglutamylierung	Tubulin
	Phosphorylierung	Proteinkinasen/-phosphatasen
	O-Glycosylierung	O-Glycosylierung des Notch-Rezeptors
Thr	Phosphopantetheinylierung	Fettsäuresynthase
	Selbstspaltungen	Bildung von Pyruvamid-Enzymen
	Phosphorylierung	Proteintreoninkinasen und -phosphatasen
Tyr	O-Glycosylierung	
	Phosphorylierung	Tyrosinkinasen und -phosphatasen
	Sulfatierung	Reifung des CCR5-Rezeptors
His	<i>ortho</i> -Nitrierung	Entzündungsreaktionen
	TOPA-Chinon	Reifung der Aminoxidase
	Phosphorylierung	Sensorproteinkinasen in regulatorischen Zweikomponentensystemen
	Aminocarboxypropylierung	Bildung von Diphthamid
Lys	N-Methylierung	Methyl-CoM-Reduktase
	N-Methylierung	Methylierung von Histon
	N-Acylierung durch Acetyl-, Biotinyl-, Lipoyl-, Ubiquitylgruppen	Acetylierung von Histon, prosthetische Gruppen am Schwingarm, Ubiquitin, Proteinmarkierung durch kleine Ubiquitin-ähnliche Marker (SUMOs)
	C-Hydroxylierung	Reifung von Collagen
Cys	S-Hydroxylierung (S-OH)	Sulfenatzwischenstufen
	Bildung von Disulfidbindungen	Proteine in oxidierenden Umgebungen
	Phosphorylierung	PTPasen
	S-Acylierung	Ras
	S-Prenylierung	Ras
Met	Proteinspleißen	Exzision von Intein
Arg	Oxidation zu Sulfoxid	Met-Sulfoxidreduktase
	N-Methylierung	Histone
Asn	N-ADP-Ribosylierung	G _{Sα}
	N-Glycosylierung	N-Glycoproteine
	N-ADP-Ribosylierung	eEF-2
Gln	Proteinspleißen	Stufe der Inteinexzision
	Transglutaminierung	Proteinvernetzung
Trp	C-Mannosylierung	Plasmamembranproteine
Pro	C-Hydroxylierung	Collagen, HIF-1α
Gly	C-Hydroxylierung	Bildung C-terminaler Amide

[a] Nicht bekannt sind Modifikationen an Leu, Ile, Val, Ala, Phe. Eine ausführlichere Liste findet sich in Lit. [3].

Abbildung 45: Zusammenfassung posttranslatiionaler Seitenkettenmodifikationen

An 15 der 20 kanonischen Aminosäuren können Seitenkettenmodifikationen stattfinden. Tabelle aus [45].

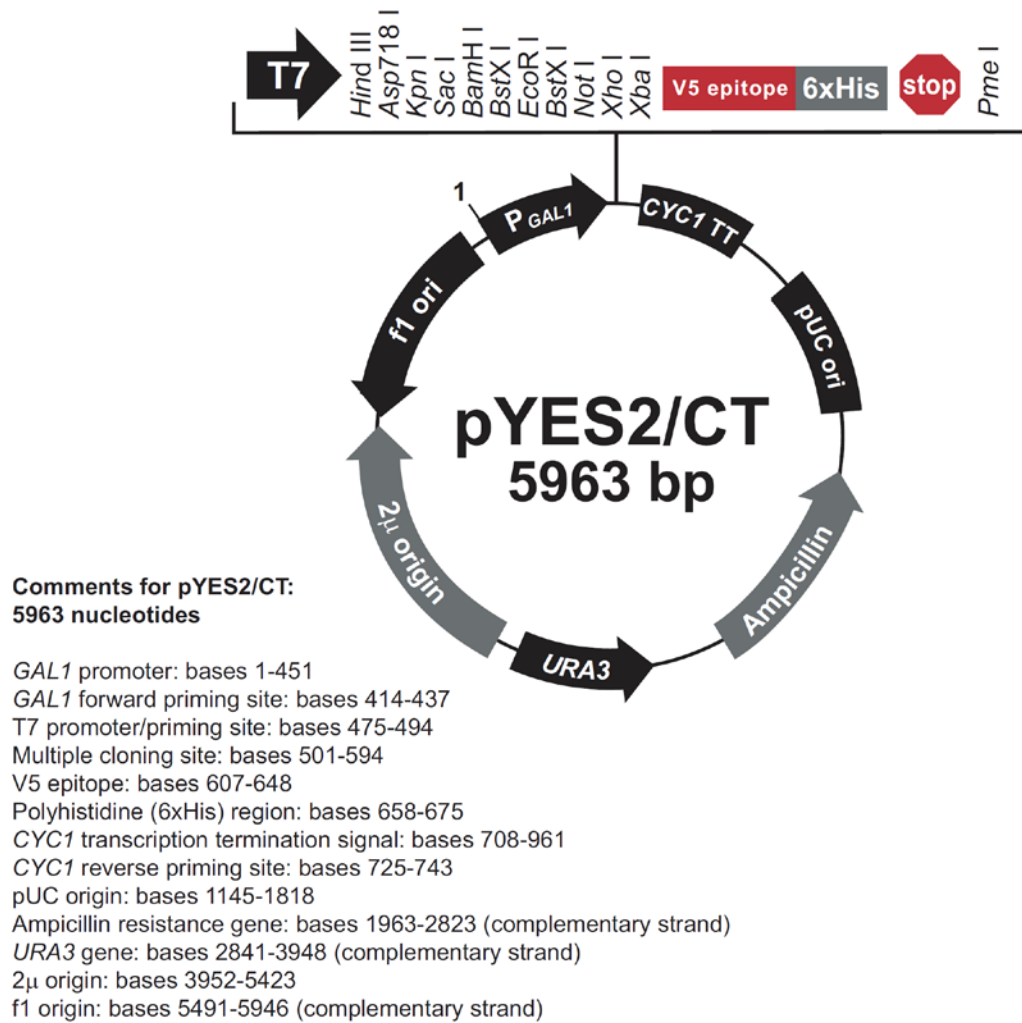


Abbildung 48: Plasmidkarte des für die Expression von *AHA1* und *GAL4* verwendeten Plasmids pYES2/CT von Invitrogen.

PUBLIKATIONEN

- 1. Silke Palzer, Yannick Bantel, Franziska Kazenwadel, Michael Berg, Steffen Rupp, Kai Sohn**

An Expanded Genetic Code in *Candida albicans* to study Protein-Protein Interactions *in vivo*

Manuskript eingereicht.

- 2. Michael Berg, Annette Michalowski, Marion Trinks, Silke Palzer, Steffen Rupp, Kai Sohn**

An *in vivo* photo-cross-linking approach reveals a homodimerization domain of Aha1 in *S. cerevisiae*

Manuskript in Vorbereitung

DANKSAGUNG

DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik und Plasmatechnologie (IGVP) der Universität Stuttgart möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Hirth** herzlich bedanken.

Mein Dank gilt auch **PD Dr. Steffen Rupp** für die Bereitschaft diese Arbeit als Hauptberichter zu prüfen und für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen, die in der Abteilung MBT am Fraunhofer IGB herrschen.

Dankeschön an **PD Dr. H. Rudolph** für die Übernahme des Koreferats.

Für eine erfolgreiche Promotion ist die Qualität der Betreuung entscheidend. Deshalb möchte ich **Dr. Kai Sohn** für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit ganz herzlich danken. Vielen Dank dir Kai für die Inspiration, Motivation, Unterstützung und Freundschaft!

Ein Dankeschön für den Fleiß und Ehrgeiz an **Annette Michalowski** und **Marion Trinks** bei der Durchführung der Diplom- und Studienarbeit.

Ein besonderes Dankeschön an die Gruppe **Functional Genomics** für das tolle Gruppenklima. Ganz besonders möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei meinen langjährigen Begleitern **Silke Palzer, Elena Lindemann, Stefan Lorenz und Christian Grumaz** für den Zusammenhalt und die Freundschaft bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau **Claudia Berg**. Für ihr Verständnis, Rückhalt, Motivation und vieles mehr.

Der Weg zur Promotion führt über schulische Leistung und das Studium. Ohne die Unterstützung meiner **Familie** und insbesondere meiner **Eltern** wäre dieser Weg so nicht möglich gewesen. Deshalb ist diese Arbeit meinen Eltern **Olga** und **Viktor Berg** gewidmet. Ihnen gebührt mein größter Dank!

LEBENS LAUF

von Michael Berg
 geboren am 03.04.1981
 in Duschanbe (Tadschikistan)

Derzeitige Beschäftigung

Mär 2009 – Mär 2013 Promotion am Institut für Grenzflächenverfahrenstechnik
 IGVT der Universität Stuttgart und dem Fraunhofer
 Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB
 (PD Dr. Steffen Rupp)

Wissenschaftlicher Angestellter:

Aug 2008 - Mär 2009 Am Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und
 Bioverfahrenstechnik IGB

Studium

Okt 2003 – Aug 2008 Studium: Biologie an der Universität Hohenheim
 Abschluss: Diplom-Biologe

Okt 2002 – Mär 2003 Studium: Umweltschutztechnik an der Universität
 Stuttgart

Schulische Ausbildung

1999 – 2002 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Maria-Merian-
 Schule in Waiblingen (Baden-Württemberg)
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1993 – 1999 Salier Realschule in Waiblingen (Baden-Württemberg)
 Abschluss: Mittlere Reife

1992 – 1993 Salier Grundschule in Waiblingen (Baden-Württemberg)

1991 – 1992 Deutsch Sprachkurs Karolingerschule in Waiblingen
 (Baden-Württemberg)

1987 – 1991 Grundschule in Duschanbe (Tadschikistan)

ERKLÄRUNG

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbst und lediglich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Wörtliche oder sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Michael Berg

Stuttgart, den 22. Februar 2012