



Alexander Hümmer (Autor)

**Entwicklung und Etablierung eines auf flourophoren Reportern basierende Mammalian Two-Hybrid -Assays zur quantitativen Analyse von Mechanismus und Spezifität der G-Proteinmodulation präsynaptischer, spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle**

Alexander Hümmer

---

Entwicklung und Etablierung eines auf fluorophoren Reportern basierenden „Mammalian Two-Hybrid“-Assays zur quantitativen Analyse von Mechanismus und Spezifität der G-Proteinmodulation präsynaptischer, spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle

---



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3325>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

**Abkürzungsverzeichnis****IX-XIII**

<b>1 Einleitung</b>	<b>14</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Gerätschaften</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Arbeitsmaterialien und Chemikalien</b>	<b>27</b>
<b>2.3 Molekularbiologie</b>	<b>28</b>
2.3.1 Antibiotika	28
2.3.2 Bakterienstämme	29
2.3.3 Medien und Puffer	29
2.3.4 cDNA Matrizen	31
2.3.5 Expressions- und Klonierungsvektoren	32
2.3.6 Synthetische Oligonukleotide	33
2.3.6.1 Oligonukleotide für PCR-Reaktionen	33
2.3.6.2 Phosphorylierte, komplementäre Oligonukleotide	36
2.3.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	37
2.3.7.1 PCR-Reaktion mit MgCl <sub>2</sub> -Gradienten	38
2.3.7.2 PCR-Reaktion mit DMSO-Zusatz	38
2.3.8 Hybridisierung phosphorylierter, komplementärer Oligonukleotide	38
2.3.9 DNA-Präparationen	39
2.3.9.1 Präparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	39
2.3.9.2 Plasmidpräparation über Anionenaustauschchromatographie	39
2.3.10 Ethanolpräzipitation von DNA	40
2.3.11 Bestimmung von DNA-Konzentrationen	40
2.3.12 Modifikation von DNA	40
2.3.12.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
2.3.12.2 Dephosphorylierung gespaltener DNA	41
2.3.12.3 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit T4-DNA-Polymerase	41
2.3.12.4 Ligation von DNA-Fragmenten	41

2.3.13	Agarosegelelektrophorese	42
2.3.14	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	42
2.3.15	Herstellung kompetenter E.coli - XL1-blue Bakterien	43
2.3.16	Transformation von Plasmid-DNA in E.coli	43
<b>2.4</b>	<b>Yeast Two-Hybrid</b>	<b>43</b>
2.4.1	Hefestamm	44
2.4.2	Medien und Lösungen	44
2.4.3	Herstellung kompetenter Hefezellen nach der Lithium-Acetat-Methode	46
2.4.4	Transformation von Plasmid-DNA in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
2.4.5	Nachweis von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität im „Colonie-Lift“ Filter Assay	47
<b>2.5</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>48</b>
2.5.1	Medien und Lösungen	48
2.5.2	Allgemeine Zellkulturbedingungen	49
2.5.3	Zellmaterial	49
2.5.4	Passagieren von Zellen	49
2.5.5	Kryokonservierung	50
2.5.6	Reinigung von Deckgläschen	50
2.5.7	Beschichtung von Deckgläschen	50
2.5.8	Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzelllinien	51
2.5.9	Zellpräparation für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen	51
<b>2.6</b>	<b>Proteinbiochemie</b>	<b>52</b>
2.6.1	Puffer und Lösungen	52
2.6.2	Präparation von Gesamtzellprotein	53
2.6.3	SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese	53
2.6.4	Western-Blot	54
2.6.5	Proteinnachweis durch Immunfärbung	54
<b>2.7</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>55</b>
2.7.1	Fluoreszenzfilter	55
2.7.2	Fluoreszenzoptische Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen	55

2.7.3	„Three cube“ – Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)	56
<b>2.8</b>	<b>Elektrophysiologie</b>	<b>58</b>
2.8.1	Lösungen für die Messung von Kulturzellen (HEK293)	58
2.8.2	Gesamtzellableitung	59
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>„Yeast Two-Hybrid“-Untersuchungen</b>	<b>60</b>
3.1.1	Hybridkonstrukte für „Yeast Two-Hybrid“-Untersuchungen	62
3.1.2	Phänotyp-Bestimmung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> –Y187	62
3.1.3	Untersuchungen zur autonomen Reporterogenaktivität	63
3.1.4	„Yeast Two-Hybrid“-Interaktionsuntersuchungen zwischen G-Protein $\beta_2$ -Untereinheit und cytoplasmatischen Linker I-II der $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal $\alpha_{1A}$ -Untereinheit	64
<b>3.2</b>	<b>Entwicklung und Etablierung eines auf fluorophoren Reporter genen basierenden „Mammalian Two-Hybrid“-Assays</b>	<b>66</b>
3.2.1	Herstellung von Fusionskonstrukten für „Mammalian Two-Hybrid“-Untersuchungen	67
3.2.2	EYFP als „Two-Hybrid“-induzierbares Reporter gen	68
3.2.3	Kompartimentierung und Konzentrierung des EYFP-Reporter gensignals	70
3.2.4	Konstitutiv exprimierendes ECFP zur Detektion und Quantifizierung von „Two-Hybrid“-induzierten EYFP-Reporter gensignalen	73
3.2.5	Spezifikation von CFP- und YFP-Fluoreszenzfilter für fluoreszenzoptische Signalquantifizierungen	75
3.2.6	Zeitabhängigkeit der Reporter gensignalquantifizierung	77
3.2.7	Fluoreszenzquantifizierungen im „Mammalian Two-Hybrid“-Assay	82
3.2.7.1	Anwendbarkeit der Fluoreszenzquantifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in unterschiedlichen Zelllinien	82
3.2.7.2	Interaktionsuntersuchungen zwischen G-Protein $\beta_2$ -Untereinheit und cytoplasmatischen Linker I-II der P/Q-typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal $\alpha_{1A}$ -Untereinheit	85
3.2.7.3	Überprüfung der Hybridproteinexpression im Westernblot	87
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zur G-Proteinmodulation spannungsabhängiger <math>\text{Ca}^{2+}</math>-Kanäle</b>	<b>88</b>
3.3.1	Vergleichende Interaktionsuntersuchungen zur G-Proteinmodulation von spannungsabhängigen P/Q-, N-, R- und L-typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen	88

3.3.2	Interaktionsuntersuchungen von G-Protein $\beta_2$ -Untereinheit mit den cytosolischen Linkern I-II von P/Q-, N-, R- und L-typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen	90
3.3.3	Interaktionsuntersuchungen von $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal $\beta_{1b}$ -Untereinheit mit den cytosolischen Linkern I-II von P/Q-, N-, R- und L-typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen	93
3.3.4	Kompetition von G-Protein G- $\beta_2$ und $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal $\beta_{1b}$ -Untereinheit am cytosolischen Linker I-II der P/Q-typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal $\alpha_{1A}$ -Untereinheit.	95
3.3.5	Charakterisierung von G-Protein $\beta_2$ -Peptidbereichen, welche die G-Proteinmodulation von P/Q-typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle auslösen können	98
3.3.5.1	Interaktionsuntersuchungen von Bindungsbereichen zwischen G-Protein G- $\beta_2$ und G- $\gamma_3$	99
3.3.5.2	„Patch clamp“-Untersuchungen von G-Protein $\beta_2$ -Deletionskonstrukten	101
3.3.5.3	Interaktionsuntersuchungen von G-Protein $\beta_2$ -Deletionskonstrukten mit dem cytosolischen Linker I-II der P/Q-typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal $\alpha_{1A}$ -Untereinheit	104
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
4.1	Ausblick auf weiterführende Untersuchungen	119
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>122</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Appendix</b>	<b>136</b>
7.1	Vektorkarten	136
7.1.1	„Mammalian Two-Hybrid“-Reporterplasmide	136
7.1.2	Fluorophore Expressionsplasmide mit modifizierten Polylinkern	139
7.1.3	Expressionsvektoren mit integrierten Epitopsequenzen	141
7.2	Klonverzeichnis	143
7.2.1	Hybridkonstrukte für das „Mammalian Two-Hybrid“-Assay	143
7.2.2	Fluorophore Fusionskonstrukte für das „Three cube“-FRET Assay	145
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>148</b>