

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

2.1.1.1 *E. coli* DH5 α

Dieser Labor-Sicherheitsstamm basiert auf dem Stamm K12. Aufgrund seiner genetischen Modifikationen (u.a. *recA*^{-/-}, *endA*^{-/-}) eignet er sich für die Amplifizierung von Plasmid-DNA und wurde daher für routinemäßiges Klonieren benutzt.

2.1.1.2 *E. coli* DH10 β F' DOT³⁵

Dieser Stamm exprimiert das *pir*-Gen Produkt, das für die Transkription der pSM2-Vektoren essenziell ist. Daher wurde dieser Stamm für das Amplifizieren der pSM2-*knockdown*-Plasmide eingesetzt.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien waren in der Regel von *pro analysi* Qualität und wurden von den Firmen Applichem, Gibco, ICN, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

Alle Lösungen in dieser Arbeit wurden mit entmineralisiertem Wasser hergestellt, das eine Leitfähigkeit von < 0,055 μ S/cm aufwies.

Für Sequenzierungen wurde *LiChrosolv*[®] Wasser für die Chromatographie³⁶ verwendet.

³⁵ PirPlus[®] DH10 β F'DOT *cells*, Fa. Openbiosystems

³⁶ Fa. Merck

2.1.3 Medien und Puffer

Methodenspezifische Puffer sind bei der Beschreibung der Methode, allgemein verwendete Puffer sind im Folgenden zu finden:

2x LSB (Lämmli-Sample Buffer)

20 % (v/v) Glycerin, 8 % (w/v) SDS, 10 mM EDTA,
0,005 % Bromphenolblau in 250 mM Tris-HCl, pH 6,8

2x LSB ohne SDS

26 % (v/v) Glycerin, 13 mM EDTA, 0,0065 %
Bromphenolblau in 325 mM Tris-HCl, pH 6,8

PBS

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM
KH₂PO₄ in H₂O, pH 7,4

TBS

137 mM NaCl in 20 mM Tris-HCl, pH 6,8

TBST

0,1 % (v/v) Tween[®] 20 in TBS

2.1.4 Plasmide und Klonierungen

| | |
|---|---|
| pEGFP-C1 | Plasmid zur Expression von <i>green fluorescent protein</i> (GFP) aus <i>Aequorea victoria</i> , zur Kontrolle der Transfektionseffizienz |
| pSV- β -Galactosidase ³⁷ | Vektor für die konstitutive Expression von β -Galactosidase, als Kontrolle für Reporter-Gen-Assays |
| pM5-NRF-Fus-EpoR/gp130 | Retroviraler Expressionsvektor, enthält die für eine Erythropoetin-Rezeptor/gp130-Chimäre kodierende Sequenz ³⁸ |
| pEF-Flag-SOCS1 pEF-Flag-SOCS3 | Expressionsvektoren, enthalten die kodierende Sequenz für murines SOCS1 bzw. SOCS3, mit <i>Flag-tag</i> (DYKDDDDK) ³⁸ |
| pSVL-JAK1 pSVL-JAK2 | Expressionsvektoren für murines JAK1 bzw. JAK2 ³⁹ |
| pSM2-SOCS1 ⁴⁰ | <i>Knockdown</i> -Vektor, kodiert für shRNA gegen humanes SOCS1 |
| pSuper-SOCS3 ⁴¹ | <i>Knockdown</i> -Vektor, der für shRNA gegen SOCS3 kodiert |

³⁷ Fa. Promega, Genbank Zugriffsnummer: X65335

³⁸ Freundlicherweise überlassen von Dr. Fred Schaper, RWTH Aachen; (Fischer *et al.*, 2004), (Hilton *et al.*, 1998)

³⁹ Freundlicherweise erhalten von H. Hermanns, RWTH Aachen

⁴⁰ Fa. Openbiosystems, v2HS-23987; Zielsequenz: 5'-TGTGGAAAGGACGAAACACC-3'

⁴¹ Zielsequenz: 5'-AAGACCCAGTCTGGGACCAAGAA-3'; (Yang *et al.*, 2004)

| | |
|---|---|
| <p>pCMV-SPORT6-PTP1B pCMV-SPORT6-PrIR pCMV-SPORT6-EpoR</p> | <p>Über das RZPD (Ressourcenzentrum / Primäre Datenbanken, Berlin) bezogene Expressionsvektoren für murine Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B⁴² (PTP1B) murinen Prolaktin-Rezeptor⁴² (PrIR) und murinen Erythropoetin-Rezeptor⁴² (EpoR)</p> |
| <p>pMET7-LEPRb-WT⁴³ pMET7-LEPRb-FYY pMET7-LEPRb-YFY pMET7-LEPRb-FFY</p> | <p>Eukaryontische Expressionsvektoren⁴⁴ mit modifiziertem SV-40 Promotor, kodieren für den Leptin-Rezeptor bzw. eine der Tyrosin-Phenylalanin Punktmutanten</p> |
| <p>pMET7-LEPRb-Box-gp130 pMET7-LEPRb-Box-PrIR pMET7-LEPRb-Box-EpoR pMET7-LEPRb-Box-IFNγR2</p> | <p>Diese Plasmide enthalten die Sequenz eines chimären Leptin-Rezeptors, dessen Box 1/2-Region durch die eines der angegebenen Rezeptoren ausgetauscht wurde. Zum Vorgehen bei der Klonierung siehe Abbildung 2.1.</p> |
| <p>pWZLneo-LEPRb-WT pWZLneo-LEPRb-FYY (Y985F) pWZLneo-LEPRb-YFY (Y1077F) pWZLneo-LEPRb-FFY (Y985,1077F)</p> | <p>Retroviraler Expressionsvektor, der in einer speziellen Verpackungszelllinie (<i>Phoenix</i>[®]) zur Bildung von Virionen führt, die Sequenzen für das jeweilige Rezeptorkonstrukt und Neomycin-Resistenz in das Genom von Empfängerzellen integrieren können. Zum Vorgehen bei der Klonierung siehe Abschnitt 2.1.4.1.</p> |
| <p>pWZLblasti-LEPRb-WT</p> | <p>Im Gegensatz zu obigen Plasmiden überträgt das resultierende Virus Resistenz gegen Blasticidin. Details zur Klonierung siehe Abschnitt 2.1.4.2.</p> |

⁴² Genbank Zugriffsnummern: BC010191 (PTP1B), BC006652 (PrIR), BC046282 (EpoR)

⁴³ Wildtyp

⁴⁴ Freundlicherweise überlassen von Prof. Jan Tavernier, Universität Gent, Gent, Belgien

| | |
|---------------------------------------|--|
| pcDNA 6.2-GW -JAK2 ⁴⁵ | <i>Knockdown</i> -Plasmide, die für miRNAs |
| -#1 ⁴⁶ , -#2 ⁴⁷ | gegen humanes JAK2 bzw. |
| -control ⁴⁸ | mit unspezifischer Zielsequenz kodieren |

2.1.4.1 Klonierung der pWZLneo-LEPRb-Y/F-Punktmutanten

Um die Bedeutung der intrazellulären Tyrosinreste des Leptin-Rezeptors eingehender untersuchen zu können, wurden Rezeptormutanten eingesetzt, in denen jeweils ein Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt worden war. Entsprechende Konstrukte im Plasmid pMET7 standen uns bereits zur Verfügung. Ein Verdau mit BstX I und KspA I lieferte das *insert*. Um diese in den retroviralen Vektor pWZLneo umklonieren zu können wurde ein bereits vorhandenes Plasmid des LEPRb-WT in pWZLneo (Hekerman, 2004) auf die gleiche Weise geschnitten und als *backbone* verwendet. Die Ligation von *insert* und *backbone* ergab das eingesetzte retrovirale Expressionsplasmid. Allen Mutanten gemein ist ein C-terminal fusioniertes *c-Myc*-Epitop der Sequenz GEQKLISEEDL.

Doppelmutanten mit je zwei Tyrosin-Phenylalanin Mutationen und die Dreifachmutante wurden auf gleichem Wege von Julia Zeidler kloniert (Zeidler, 2006), das pWZLneo-LEPRb-WT-Plasmid stammt von Paul Hekerman (Hekerman, 2004).

Diese Rezeptormutanten sollten in einem klonalen Zellsystem stabil exprimiert werden.

2.1.4.2 pWZLblasti-LEPRb-WT

Dieses Plasmid wurde durch Umklonierung aus dem pWZLneo-LEPRb-WT-Vektor gewonnen. Aus diesem Plasmid wurde das Leptin-Rezeptor-Gen durch Verdau mit den Enzymen Aat II, Hind III und Nhe I herausgeschnitten. Dabei diente Nhe I lediglich der Verkleinerung des anderen Fragments und damit der besseren

⁴⁵ Fa. Invitrogen; BLOCK-iT Pol II miR-JAK2, Katalognummer 45-3334;

⁴⁶ Zielsequenz: 5'-ATTCCATGCCGATAGGCTCTGT-3'

⁴⁷ Zielsequenz: 5'-AAAGCTTGCTCATCATACTTG-3'

⁴⁸ Zielsequenz: 5'-GAAATGTACTGCGCGTGGAGA-3'

Auftrennung im Agarose-Gel. Das pWZLblasti-Plasmid wurde mit den Enzymen Aat II und Hind III geschnitten und diente als *backbone* in der nachfolgenden Ligation mit dem *insert*. Die Identität des Plasmids wurde durch Kontrollverdau mit Aat II, Hind III und Pst I bestätigt, da Pst I im Neomycin-, nicht jedoch im Blastidicin-Resistenzgen schneidet.

2.1.4.3 Klonierung der LEPRb-Box1/2-Chimären

Diese Plasmide kodieren für chimäre Leptin-Rezeptoren, deren Kinase-bindenden Regionen durch diejenigen aus humanem gp130⁴⁹ (IL-6-R β), murinem Prolaktin-Rezeptor, murinem Erythropoetin-Rezeptor oder der β -Untereinheit des murinen Interferon- γ -Rezeptors (IFN γ R2) ersetzt wurden. Ausgehend von dem pMET7-LEPRb-WT Konstrukt wurden über gerichtete Mutation eine Sal I-Schnittstelle und eine EcoR V-Schnittstelle eingefügt, die die auszutauschende Region flankierten. Eine zweite Sal I-Schnittstelle im Plasmid wurde zuvor durch Schneiden mit Sal I, Auffüllen der überhängenden Enden mit Klenow-Fragment und nachfolgende *blunt-end* Ligation zerstört. Schneiden mit EcoR V und Sal I ergab das *backbone*. Die cDNA-Sequenz für die Box1/2-Region des jeweiligen Rezeptors wurde durch PCR gewonnen, mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt und aus dem Gel isoliert. Über die EcoR V-Schnittstelle im 5'-PCR-Primer und die Sal I-Schnittstelle im 3'-PCR-Primer konnte dieses *insert* in das *backbone* ligiert werden. Um die Gefahr von PCR-Fehlern zu minimieren, wurde aus dem neu klonierten Vektor mit Dra III und SacI ein größeres Stück um das *insert* ausgeschnitten und in einen, in gleicher Weise geschnittenen Ursprungsvektor einkloniert. Alle *in-vitro* polymerisierten DNA-Abschnitte wurden zur Kontrolle der Fehlerfreiheit sequenziert. Dabei wurde eine Punktmutation einer Cytosin- zu einer Thymidin-Base in der Sequenz des LEPRb-Box-gp130 Konstruktes festgestellt⁵⁰, die auch im Ursprungsplasmid pM5-NRF-Fus-EpoR/gp130 vorhanden war. Diese Mutation liegt jedoch außerhalb der Box1/2-Region und wird daher die JAK-Bindung nicht beeinflussen.

⁴⁹ Die signaltransduzierende Kette gp130 findet als Homo- oder Heterodimer in allen Rezeptoren der Interleukin 6 (IL-6) Familie Verwendung.

⁵⁰ Nukleotid-Nummer 2383 in NM_002184

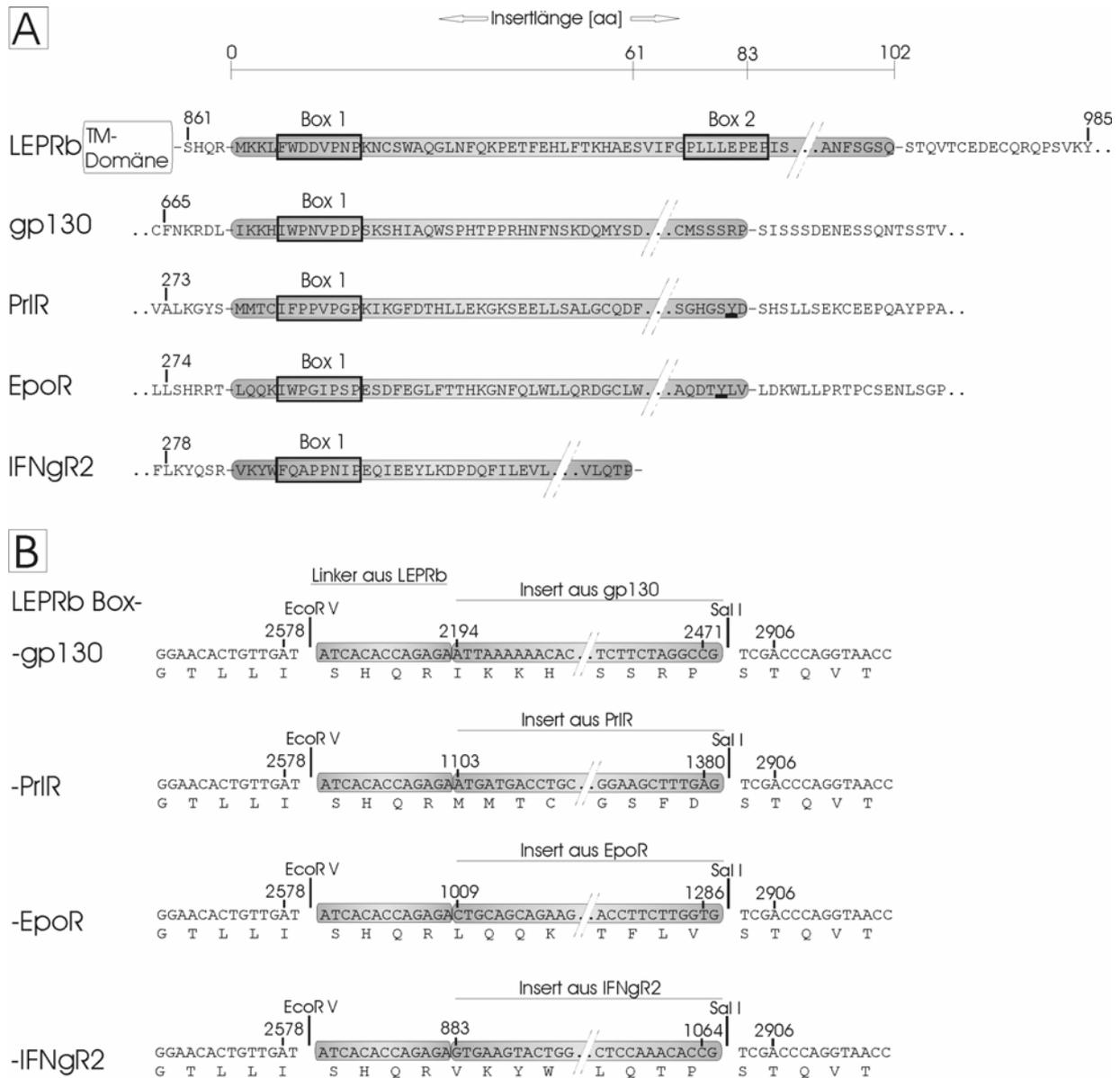


Abbildung 2.1 : Klonierung der JAK-spezifischen LEPRb-Chimären

Über stille Mutationen wurden eine EcoR V- und eine Sal I-Schnittstelle in das pMET7-LEPRb-WT-Plasmid eingeführt. Aus den angegebenen Rezeptoren wurden mittels PCR der JAK-bindende Bereich amplifiziert und über im Primer befindliche EcoR V- bzw. Sal I-Schnittstellen in den LEPRb einkloniert.

A Gezeigt sind die betreffenden Rezeptoren im Aminosäure-Kontext. Grau unterlegt ist das umklonierte *insert*. Die unterstrichenen Tyrosinreste wurden durch Phenylalaninreste ersetzt. Der IFN γ R2 wurde aufgrund seiner kurzen Sequenz als 32 Aminosäuren kürzeres Fragment umkloniert.

B Dargestellt sind die Sequenzen des LEPRb-WT und der fertigen Rezeptorchimären. Grau unterlegt ist das jeweils eingefügte *insert* aus den betreffenden Rezeptoren plus ein vier AS großes Stück aus dem LEPRb, das eingefügt wurde, um den Abstand der Box1/2-Domäne zur Transmembran-Region konstant zu halten.

2.1.5 Oligonukleotide

Für Mutagenesereaktionen, PCR-Amplifikationen und Sequenzierungen wurden Oligonukleotide der Firmen Qiagen oder Eurogentec benutzt, die in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) zu 100 µM Lösungen verdünnt worden waren. Es handelte sich dabei um folgende Sequenzen:

Tabelle 2.1 : Verzeichnis der verwendeten Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz | Annealing-temperatur |
|-------------------------|--|----------------------|
| Mutageneseprimer | | |
| LEPRbEcoRV-for | 5' -GGAACACTGTTGATATCACACCAGAG-3' | 55 °C |
| LEPRbEcoRV-rev | 5' -CTCTGGTGTGATATCAACAGTGTTC-3' | 55 °C |
| LEPRbSall-for | 5' -CTGGGTCTCAGTCGACCCAGGTAACC-3' | 58 °C |
| LEPRbSall-rev | 5' -GGTTACCTGGGTCGACTGAGACCCAG-3' | 58 °C |
| PCR-Primer | | |
| Boxgp130-EcoRV | 5' -ATCACACCAGAGAATTAAAAACACATCTGG-3' | 55 °C |
| Boxgp130-Sall | 5' -CTAGAAGTCGACGGCCTAGAAGATGACATG-3' | 55 °C |
| BoxEpoR-EcoRV | 5' -ATCACACCAGAGACTGCAGCAGAAGATCTGGCC-3' | 48 °C |
| BoxEpoR-Sall | 5' -CCACTTGTGACACCAAGAAGGTGTCCTGG-3' | 48 °C |
| BoxPriR-EcoRV | 5' -ATCACACCAGAGAATGATGACCTGCATCTTTC-3' | 48 °C |
| BoxPriR-Sall | 5' -AAGAGAGTCGACTCAAAGCTTCCATGACC-3' | 48 °C |
| Sequenzierprimer | | |
| gp130-Seq227 | 5' -CCATGAGTAAAGTGAGTGCTG-3' | 50 °C |
| gp130-Seq278 | 5' -CACTGATGTAAGTGTGTTGTGG-3' | 52 °C |
| pMET7-revSeq | 5' -GAGCGAGGAAGCGGAAGAGG-3' | 60 °C |
| LEPRb-6for | 5' -CCTTACCTTCTCATGGCC-3' | 49 °C |
| pSM2-Seq | 5' -GTACTTTACAGAATCGTTGCC-3' | 56 °C |

2.2 Molekularbiologische Techniken

Molekularbiologische Standardmethoden, die im Folgenden nicht erwähnt werden, wurden nach den Angaben des *Molecular Cloning Manual* (Sambrook und Russell, 1989) durchgeführt.

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen MBI Fermentas oder New England Biolabs bezogen und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.2.1 DNA-Präparation aus *E. coli*

Plasmid-DNA für diagnostische Zwecke wurde mittels der *rapid boiling* Methode (Sambrook und Russell, 1989) gewonnen. Dazu werden die *E. coli*-Zellen in *rapid boiling* Lysepuffer erhitzt und somit lysiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation von den größten Zellmembrantrümmern befreit. Zur Proteolyse mit Restriktionsendonukleasen wurden 150 ng/μl RNase A zugesetzt.

Für präparative Zwecke wurde DNA mit Hilfe des *High Pure Plasmid Isolation Kits*⁵¹ oder des *Plasmid Purification Maxi Kits*⁵² nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Plasmide wurden in 10 mM Tris-HCl-Puffer eluiert und die Konzentration der Lösung durch Absorptionsmessung bei $\lambda=260$ nm unter Berücksichtigung der Relation $c_{DNA} [\mu\text{g} / \text{ml}] = A_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor}$ bestimmt.

STET-Puffer

0,44 M D(+)-Glucose, 50 mM EDTA, 0,5 % (v/v)
Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

rapid boiling Lysepuffer

0,6 μg/ml Lysozym in STET-Puffer

⁵¹ Fa. Roche

⁵² Fa. Qiagen

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Ein PCR-Ansatz enthielt typischerweise ca. 50 ng Plasmid-DNA als *template* sowie je 0,4 µM des *forward*- und *reverse*-Primers und 1 mM jedes Nukleotids⁵³. Standardmäßig wurde das *RedTaq ReadyMix* PCR Kit⁵⁴ zur PCR eingesetzt, bei längeren oder schwierigen Sequenzen das *JumpStart Accutaq Kit*⁵⁴.

Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und sofort in den vorgeheizten (96°C) Thermoblock eines Thermocyclers gestellt. Typischerweise folgten nach einem initialen Denaturierungsschritt (30 Sekunden bei 96°C) 25 bis 35 Zyklen nach folgendem Schema:

| | | |
|--------------------|-------------------|--------------|
| Denaturierung: | 95°C | 30 Sekunden |
| <i>Annealing</i> : | siehe Tabelle 2.1 | 20 Sekunden |
| Elongation | 68°C | 30 Sekunden, |

gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt von 4 Minuten.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde DNA in Agarose-Gelen (0,7 % bis 2 % (w/v) in TAE-Puffer) aufgetrennt. Hierzu wurden die DNA-Proben mit dem 0,25-fachen Volumen *gel loading buffer* vermischt und neben einem DNA-Standard⁵⁵ aufgetragen. Nach dem Auftrennen bei 8 V/cm wurden falls erforderlich relevante Fragmente ausgeschnitten und mit dem *Gel Extraction Kit*⁵⁶ aufgereinigt.

5x Gel Loading Buffer (GLB)

30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % Orange G in TAE

TAE-Puffer

0,11 % (v/v) Essigsäure 96 %, 1 mM EDTA in 40 mM Tris-HCl, pH 8,0

⁵³ 100 mM Solutions, Fa. Amersham

⁵⁴ Fa. Roche

⁵⁵ GeneRuler[®] bzw. MassRuler[®], Fa. MBI Fermentas

⁵⁶ Fa. Qiagen

2.2.4 Hybridisierungen von Northern-Blots

Für die Detektion der *socs1*-Genexpression auf RNA-Ebene wurde ein Northern-Blot mit RNA von Leptin-stimulierten RIN-LEPRb-WT-Zellen untersucht. Das *template* für die cDNA-Sonde wurde aus dem Plasmid pEF-FLAG-SOCS1 mittels Xba I-Verdau gewonnen, und die Sonde mit der *random primed labeling* Methode (Feinberg und Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert. Dazu wurde ca. 200 ng DNA mit 0,5 µg Hexanukleotid-Primern aufgeköcht, um die Doppelstrang-DNA zu denaturieren. Dann wurden 10 % des Endvolumens 10x OLB sowie 50 µCi α -³²P-CTP⁵⁷ und 1 µl (=5 u) Klenow exo-⁵⁸ zugegeben und bei Raumtemperatur für 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Sonde mit dem *Nucleotide Removal Kit*⁵⁹ aufgereinigt, und die Blotmembran für 6 Stunden mit Prähybridisierungspuffer bei 42°C geblockt. Danach wurde der Blot mit der radioaktiven Sonde (ca. 21,5 Mio. cpm⁶⁰) in Hybridisierungspuffer für 16 Stunden bei 42°C inkubiert. Der Blot wurde bis zu einer Stringenz von 0,3x SSC-Puffer intensiv gewaschen und anschließend für 36 Stunden auf einen *Phosphorimager Screen*⁶¹ aufgelegt, der nachfolgend mit einem *Storm 820 Scanner*⁶² ausgelesen wurde.

100x Denhardts-Lösung

2 % (w/v) BSA, 2 % (w/v) Ficoll® 400, 2 % (w/v) PVP 360 in H₂O

(Prä-)Hybridisierungspuffer

50 % (v/v) Formamid, 5 ml 20x SSPE, 1 ml 100x Denhardts-Lösung, 0,5 % (w/v) SDS, 0,01 % (w/v) DNA aus Fischsperma in H₂O

⁵⁷ [α -³²P]-dCTP; 10 µCi/µl, 5 kCi/mmol, Fa. Hartmann

⁵⁸ Klenow Fragment der *E. coli* DNA Polymerase I ohne 3'-5' Exonukleasefunktion

⁵⁹ Fa. Qiagen

⁶⁰ Szintillationsmessungen wurden mit Ready *Protein*+[®] *Liquid Scintillation Cocktail* (Fa. Beckman Instruments) in einem Beckman Coulter LS 600 SC Szintillationsmessgerät durchgeführt.

⁶¹ Cyclone Storage Phosphor Screen, Fa. Packard

⁶² Fa. Amersham Pharmacia

10x OLB für dCTP

100 mM MgSO₄, 1 mM DTT, je 0,6 mM dATP, dGTP, dTTP
in 0,5M Tris-HCl (pH 6,9)

2x SSC (pH 7,0)

0,3M NaCl, 30 mM Tri-Natriumcitrat in H₂O, pH 7,0

20x SSPE

3 M NaCl, 200 mM NaH₂PO₄, 20 mM EDTA in H₂O, pH 7,4

2.2.5 Mutagenese

Gerichtete Mutationen wurden in DNA mit Hilfe des *Quikchange*[®] *Site-directed Mutagenesis Kit*⁶³ nach Angaben des Herstellers eingeführt. Dabei wurden zwei Primer, die die gewünschten Mutationen enthielten und ansonsten komplementär zur umgebenden Sequenz auf beiden Strängen waren, im Thermocycler an die DNA angelagert und davon ausgehend die komplette übrige Sequenz polymerisiert. Anschließend wurde mit Dpn I verdaut, dadurch wurden ausschließlich die methylierten Ausgangsplasmide zerstört, während die *in-vitro* polymerisierten Plasmide verblieben und in *E. coli* transformiert werden konnten. Durch diagnostisches Schneiden wurde ein Klon mit dem richtigen Plasmid identifiziert, und ein Bereich um die eingefügte Mutation in einen Ursprungsvektor umkloniert. Durch dieses Vorgehen konnten die Bereiche des Plasmids, die aus *in-vitro* Polymerisation hervorgegangen waren, minimiert werden. Da nur solche Bereiche anschliessend durch Sequenzierung überprüft wurden, konnte dadurch der Sequenzieraufwand minimiert werden.

⁶³ Fa. Stratagene

2.2.6 Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA wurden nach der dideoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1992) durchgeführt. Dazu wurde das *BigDye[®] Terminator Sequencing Kit⁶⁴* (Applied Biosystems) benutzt, und die Vervielfältigung nach Angaben des Herstellers im Thermocycler durchgeführt. Nach einer Ethanolfällung der DNA wurden die Fragmente im Kapillarsequenzierer *Abi Prism 310* getrennt und detektiert.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung

2.3.1.1 Anzucht von *E. coli* DH5 α

DH5 α -Zellen wurden in LB-Medium bei 37° unter Schütteln kultiviert. Enthielten die Zellen ein Plasmid mit Ampicillin-Resistenzgen wurde zum LB-Medium 100 μ g/ml Ampicillin zugefügt.

LB-Medium

10g Pepton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, ad 1.000 ml H₂O;
als Geliernmittel für LB-Platten wurden zusätzlich 15g Agar
zugefügt

2.3.1.2 Anzucht von *E. coli* DH10 β F' DOT-Zellen

Zur Amplifizierung der *pSM2-knockdown*-Plasmide wurde Zellen dieses Stamms in 2x LB *low salt* Medium bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Dem Medium waren Chloramphenicol [25 μ g/ml], Kanamycin [25 μ g/ml] und Tetracyclin [1 μ g/ml] zugesetzt.

⁶⁴ Fa. Applied Biosystems

2 x LB low salt Medium

20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1.000 ml H₂O;
als Geliermittel für LB *low salt* Platten wurden zusätzlich
15 g Agar zugefügt

2.3.2 Transformation

E. coli-Zellen, die nach der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983) die Fähigkeit zur effizienten Aufnahme von Plasmiden⁶⁵ erlangt hatten, wurden nach langsamem Auftauen von -70 °C mit der zu transformierenden DNA vermengt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen einer Hitzeschockbehandlung (42 °C für 90 Sekunden) unterzogen und für 45 Minuten in 250 µl Medium ohne Zusatz von Antibiotika bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 rpm abzentrifugiert, in 100 µl Medium resuspendiert und auf Kulturplatten ausgestrichen.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung von Säugerzelllinien

Alle Medien und fötales Rinderserum (FCS⁶⁶) wurden von der Firma PAA, sämtliche Plastikwaren für die Zellkultur wurden von der Firma Nunc bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Inkubator bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Das jeweilige Medium (vgl. Tabelle 2.2) wurde mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin⁶⁷ ergänzt. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml 0,25 %-iger Trypsinlösung⁶⁸ abgelöst. Dann wurden die Zellen in 10 ml des jeweiligen Mediums aufgenommen und in der gewünschten Dichte in Kulturbehältnisse ausgesät.

⁶⁵ Kompetenz

⁶⁶ *Fetal calf serum*

⁶⁷ Penicillin G 10.000 u/ml; Streptomycin 10.000 µg/ml, Fa. Gibco

⁶⁸ Fa. Gibco

Tabelle 2.2 : Verzeichnis der verwendeten Zelllinien

| Bezeichnung | Beschreibung | Organismus | Basismedium |
|-------------------------------|---|--------------------------|--------------------|
| RINm5F (RIN) ⁶⁹ | β-Zelle (Insulinom) | Ratte | RPMI 1640 |
| HIT T15 (HIT) ⁷⁰ | β-Zelle (Insulinom) | syrischer Goldhamster | RPMI 1640 |
| HEK 293T (HEK) | Niere (embryonal) | Mensch | DMEM High Glucose |
| <i>Phoenix</i> ^{®71} | HEK 293T, modifiziert | Mensch | DMEM High Glucose |
| HepG2 ⁷² | Leber (Hepatom) | Mensch | RPMI 1640 |
| COS-7 (COS) | Niere | grüne Meerkatze | DMEM High Glucose |
| 2C4 ⁷³ | parentale Fibrosarkom- Zelllinie der Linien U4C und γ2A | Mensch | DMEM High Glucose |
| U4C ⁷³ | JAK1-negative Fibrosarkom-Linie | Mensch | DMEM High Glucose |
| γ2A ⁷³ | JAK2-negative Fibrosarkom-Linie | Mensch | DMEM High Glucose |

2.4.2 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Zur Konservierung in flüssigem Stickstoff bei -196 °C wurden nicht-konfluente Zellen aus einer 80 cm² Zellkulturflasche mit PBS gewaschen, abgelöst und in 2 ml Konservierungsmedium (10 % DMSO in FCS) aufgenommen, auf zwei Kryovials verteilt und langsam auf -70 °C abgekühlt. Am folgenden Tag wurden die Vials in flüssigen Stickstoff überführt.

⁶⁹ Freundlicherweise erhalten von Dr. Dagmar Meyer zu Heringdorf, Universität Essen

⁷⁰ Freundlicherweise erhalten von Prof. Dr. Annette Schürmann, DIfE, Potsdam-Rehbrücke

⁷¹ Freundlicherweise überlassen von Dr. Andreas Barthel, Universität Düsseldorf

⁷² Freundlicherweise erhalten von Dr. Johannes Bode, Universität Düsseldorf

⁷³ Freundlicherweise erhalten von Dr. Heike Hermanns, RWTH Aachen; (Mueller *et al.*, 1993; Watling *et al.*, 1993)

Zum Auftauen wurde der Inhalt eines Vials in Medium aufgenommen, und nach kurzem Abzentrifugieren und Resuspendieren in einer Zellkulturflasche ausgesät.

2.4.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

2.4.3.1 Transiente Transfektion mit FuGENE® 6

Mit diesem Reagenz wurden HEK 293T, *Phoenix* und COS-7-Zellen transfiziert. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers⁷⁴, wobei das Verhältnis von Reagenz zu DNA 2 µl/µg betrug.

2.4.3.2 Transiente Transfektion mit JetPEI®

Transfektionen von HIT- und HepG2-Zellen wurden mit diesem Reagenz nach Angaben des Herstellers⁷⁵ durchgeführt. Das Verhältnis von Reagenz zu DNA betrug 2 µl/µg.

2.4.3.3 Stabile retrovirale Transfektion

Um spezifische Effekte einzelner Tyrosine des Leptin-Rezeptors zu untersuchen, wurden neben den bereits verfügbaren RIN-Linien, die den wildtyp-Leptin-Rezeptor oder Mehrfach-Tyrosinmutanten (YFF, FYF, FFY, FFF) exprimieren auch Linien benötigt, die Leptin-Rezeptor-Einzelmutanten (YYF, YFY, FYY) exprimieren. Zur Generierung dieser stabilen Zelllinien wurden Retroviren benutzt, die von *Phoenix*-Zellen⁷⁶ produziert wurden, nachdem diese mit dem pWZL-Vektor transfiziert worden waren. Dabei wurden Gene für die essentiellen viralen Proteine ins Genom dieser Verpackungszelllinie integriert, während auf dem Plasmid neben der zu integrierenden Sequenz ein so genanntes Verpackungssignal kodiert ist. Zusammen initiieren diese Genprodukte die Bildung und Freisetzung von Virionen, die wegen der Spezifität der viralen Hüllproteine (ecotrope Linie) ausschließlich

⁷⁴ Fa. Roche

⁷⁵ Fa. Polyplus Transfection

⁷⁶ Siehe auch: www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html (08/2006)

Nagerzellen infizieren können. Wegen des auf dem Plasmid befindlichen Resistenzgens (gegen Neomycin/G-418⁷⁷ bzw. Blasticidin) können viral transfizierte Zellen durch Zusatz von Antibiotika selektioniert werden.

Zur Virusproduktion wurden ca. $3,0 \cdot 10^5$ *Phoenix*-Zellen in einer 85 mm Kulturschale ausgesät. Nach 20-stündiger Inkubation wurden die Zellen mit neuem Medium versorgt und nach einer weiteren Stunde mit 4 µg Plasmid-DNA und 0,25 µg pEGFP-C1 (zur Kontrolle der Transfektionseffizienz) transfiziert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und dann im Abstand von jeweils 48 Stunden dreimal der Überstand mit den darin enthaltenen Virionen abgenommen, durch einen Filter der Porengröße 0,45 µm filtriert und eingefroren. Durch diese Maßnahmen konnte das Verschleppen ebenfalls resistenter *Phoenix*-Zellen verhindert werden.

Zur Infektion wurden RIN-Zellen in *6-well-multidish*-Platten subkonfluent ausgesät. Nach 24 Stunden wurden fünf Kavitäten mit je 2 ml einer 33 %-igen Mischung des virenhaltigen Überstands mit frischem Medium inkubiert, der 5 µg/ml Polybrene^{®78} zugesetzt war. Dieses Polyanion sollte die Infektion durch Minimierung von elektrostatischen Abstoßungskräften zwischen Zellmembran und DNA erleichtern. Die sechste Kavität wurde zur späteren Selektionskontrolle nicht infiziert. Dies wurde an den zwei darauf folgenden Tagen wiederholt. Anschließend wurden alle Zellen mit G-418 (1 mg/ml) bzw. Blasticidin (3 µg/ml) selektioniert, bis alle nicht-infizierten Zellen abgestorben waren. Die überlebenden resistenten Zellen wurden vereinigt und als stabile Zelllinie kryokonserviert.

Auf diese Weise wurden folgende stabile Zelllinien generiert:

| | |
|------------------------------------|---|
| RIN-LEPRb -WT/ -FFY/ -FYY/ -YFY | Expression der jeweiligen LEPRb-Mutante nach viraler Transfektion mit dem entsprechenden pWZLneo-Plasmid |
| RIN-LEPRb-WT+EpoR/gp130 | Expression des LEPRb-WT sowie der EpoR/gp130 Rezeptorchimäre (vgl. Abschnitt 2.1.4) nach viraler Transfektion des pWZLblasti-LEPRb-WT- und des pM5-NRF-Fus-EpoR/gp130-Plasmids. |

⁷⁷ *Geneticin Sulphate*

⁷⁸ Hexadimethrinbromid

2.4.4 Inkubation mit Zytokinen

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Zellen vor der Zugabe von Leptin oder anderen Zytokinen für mindestens 16 Stunden ohne FCS inkubiert, d.h. das Komplettmedium wurde abgenommen und durch das entsprechende Basismedium ersetzt. Dadurch sollten die Zellen dem Einfluss von FCS mit seiner nicht genau definierbaren Zusammensetzung entzogen werden und reproduzierbare Verhältnisse für die Versuche geschaffen werden.

Zur Stimulation wurden die entsprechenden Zytokine dem Basismedium zugegeben und gleichmäßig vermischt. Während der Stimulation wurden die Zellen wie gewöhnlich im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten.

Folgende Zytokine kamen zur Anwendung:

| | |
|-----------------|--|
| Leptin | rekombinantes murines Leptin ⁷⁹ , lyophilisiert, rekonstituiert in 10 mM Natriumcitrat zu 1 µg/µl RIN-Zellen wurden stets mit 20 ng/ml Leptin stimuliert, während für HIT-, HepG2- und Fibrosarkom-Zellen stets 100 ng/ml Leptin eingesetzt wurde. |
| Wachstumshormon | rekombinantes, humanes Wachstumshormon ⁸⁰ (<i>Growth Hormone</i> , Somatotropin), lyophilisiert, rekonstituiert in H ₂ O zu 1 µg/µl RIN-Zellen wurden stets mit 100 ng/ml stimuliert. |
| Erythropoetin | rekombinantes, humanes Erythropoetin ⁸¹ [2,2 * 10 ⁵ U/mg] RIN-Zellen wurden stets mit 7 U/ml stimuliert. |

⁷⁹ Fa. Peprotech

⁸⁰ Fa. Bachem

⁸¹ Fa. Boehringer-Mannheim

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Präparation von Gesamtzelllysaten

2.5.1.1 Denaturierende Lyse für Western-Blot Analysen

Zellen in *6-well-multidish*-Platten wurden auf Eis zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, dieses abgesaugt und je 250 μ l/well kochender SDS-Lysepuffer zugegeben. Mit Zellschabern wurden die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und für 5 Minuten im Wasserbad gekocht. Nach einer 30-sekündigen Ultraschallbehandlung wurde bei 14.000 U/min für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand als fertiges Lysat in ein Eppendorfgefäß überführt.

Lysepuffer für denaturierende Lyse

1 % (w/v) SDS in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4

2.5.1.2 Native Lyse für Immunfällungen

Zellen in 85 mm Zellkulturplatten wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Absaugen wurde je 1 ml Lysepuffer für native Lyse zugesetzt, und die Zellen für 5 Minuten auf Eis lysiert. Für Co-Immunfällungen wurde NP-40 im Lysepuffer durch 1 % Brij[®]97 ersetzt, und die Lyse auf 30 Minuten verlängert. Die Zellen wurden abgeschabt, für 15 Sekunden mit Ultraschall behandelt und für 3 Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Lysepuffer für native Lyse

1 % (v/v) NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF in 20 mM Tris-HCl (pH7,5) Kurz vor Benutzung wurden 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml Aprotinin und 5 μ g/ml Leupeptin zugesetzt.

2.5.2 Western-Blot Analysen

2.5.2.1 SDS-PAGE und Western-Blot

Für die denaturierende Gelelektrophorese wurden Polyacrylamidgele im Format 8,6 x 7,7 cm des *Biometra Minigel* Systems verwendet. Die Gele bestanden aus einem Trenngel von 6 cm Länge zur Auftrennung der Proteine und einem darüberliegendem Sammelgel von 1 cm Länge zur Fokussierung der Proteine vor dem Trenngel. Das Trenngel wurde in Konzentrationen von 8 % bis 12 % Polyacrylamid⁸² in 25 % Trenngelpuffer unter Zugabe von 0,1 % (v/v) TEMED⁸³ und 0,1 % (w/v) APS⁸⁴ auspolymerisiert. Das darüberliegende Sammelgel wurde in einer Konzentration von 4 % Polyacrylamid in 25 % Sammelgelpuffer mit 0,1 % (v/v) TEMED und 0,2 % (w/v) APS gegossen. Ein ins Sammelgel gesteckter Kamm ließ die nötigen Taschen für das Auftragen der Proben entstehen.

SDS-Lysate wurden vor dem Auftragen mit 2x LSB ohne SDS im Verhältnis 4:1 gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, während Eluate von Immunpräzipitationen bereits in LSB vorlagen und lediglich aufgeköcht wurden. Als Proteinstandard wurde *Biotinylated Protein Ladder*⁸⁵ oder SDS-6H⁸⁶ aufgetragen. Die Trennung erfolgte in Elektrodenpuffer bei 10 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel bis zum Herauslaufen der Front.

Ein fertiges Trenngel wurde anschließend auf eine Nitrocellulose⁸⁷- bzw. PVDF⁸⁸-Membran geblottet. Dies erfolgte im Tankverfahren in Transferpuffer bei 200 mA für 2 Stunden. Beide Membran-Varietäten wurden vor dem Blotten einige Minuten in Transferpuffer äquilibriert, wobei PVDF-Membranen zuvor in Methanol hydrophilisiert worden waren. Im Falle der Verwendung des unmarkierten SDS-6H Standards wurde die Position der Banden nach Anfärben des Gels mit

⁸² Verhältnis Acrylamid : Bis-Acrylamid 33 : 1

⁸³ N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Fa. Bio-Rad

⁸⁴ Ammoniumpersulfat; Fa. Gibco BRL

⁸⁵ Fa. Cell Signaling Technology

⁸⁶ Fa. Sigma-Aldrich

⁸⁷ Protran 45µm, Fa. Schleicher & Schüll

⁸⁸ Immobilon; Fa. Millipore

Ponceau-S-Lösung auf der Membran markiert, und die Membran in TBST wieder entfärbt.

Elektrodenpuffer

250 mM Glycin, 0,1 % SDS in 25 mM Tris-HCl, pH 8,4

Ponceau-S-Lösung

0,25g Ponceau-S, 40 ml Methanol, 15 ml Essigsäure 96 %, H₂O ad 100 ml

Sammelgelpuffer

0,4 % SDS in 500 mM Tris-HCl, pH 6,8

Transferpuffer

0,1 % SDS, 20 % (v/v) Methanol, 250 mM Glycin in 25 mM Tris-HCl, pH 8,3

Trenngelpuffer

0,4 % (w/v) SDS in 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

2.5.2.2 Proteindetektion

Nach dem Blotten wurden die Membranen mit TBST gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockinglösung inkubiert, um unspezifische Bindung von Antikörpermolekülen an die Membran zu verhindern. Dann wurden die Membranen mit einer Lösung des primären Antikörpers⁸⁹ für 16–18 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST wurde der zweite Antikörper, der gegen den F_c-Teil des ersten Antikörpers gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, in der Blockinglösung für den sekundären Antikörper für eine Stunde auf die Membran gegeben. Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST um

⁸⁹ Alle primären Antikörper waren in 5 % BSA / 0,02 % Natriumazid gelöst.

unspezifisch gebundenen sekundären Antikörper zu entfernen, wurden die geblotteten Proteine mittels ECL-Reaktion⁹⁰ detektiert. Hierzu wurde die Membran für eine Minute in einer 1:1-Mischung der ECL-Detektionslösungen I & II inkubiert. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Umsetzung von Luminol⁹¹ unter Entstehung von Licht, das mit einer CCD-Kamera⁹² detektiert wurde. Durch den großen linearen Bereich der Aufnahme wurde eine Quantifizierung der Lumineszenzsignale ermöglicht⁹³.

Blockinglösung

3 % (w/v) BSA⁹⁴ in TBST

Blockinglösung für sekundäre Antikörper

5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST

ECL-Detektionslösung

I: 20 µl H₂O₂ [30 % v/v] in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

II: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Cumarinsäure⁹⁵ in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

⁹⁰ Enhanced chemiluminescence

⁹¹ 5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazinedione

⁹² *Charge coupled device*; LAS-3000, Fa. Fujifilm

⁹³ Software: AIDA Image Analyzer 4.00, Fa. Raytest

⁹⁴ Bovines Serumalbumin (Fraktion V), Fa. Calbiochem

⁹⁵ 4-Hydroxy-Zimtsäure

Tabelle 2.3 : Verzeichnis der verwendeten Antikörper

| Bezeichnung | Organismus | Verdünnung für Immunoblot | Hersteller |
|-----------------------------|------------|---------------------------|-------------------|
| P-STAT3 Y705 | Kaninchen | 1:1000 | CST ⁹⁶ |
| STAT3 | Kaninchen | 1:1000 | CST |
| P-STAT5b Y694 | Kaninchen | 1:500 | CST |
| STAT5 | Kaninchen | 1:500 | Upstate |
| P-STAT1 Y701 | Kaninchen | 1:1000 | CST |
| STAT1 | Kaninchen | 1:1000 | CST |
| P-JAK2 Y1007/1008 | Kaninchen | 1:500 | Biosource |
| LepR (AF-497) | Ziege | 0,15 µg/ml | R & D Systems |
| SOCS3 (H-103) | Kaninchen | --- | Santa Cruz |
| SOCS3 (H-103) ,biotinyliert | Kaninchen | 1:1500 | Santa Cruz |
| Flag M2 | Maus | 5 µg/ml | Sigma-Aldrich |
| c-Myc (A-14) | Kaninchen | 1:200 | Santa Cruz |
| c-Myc, Agarose-gekoppelt | Ziege | --- | Santa Cruz |
| Kaninchen IgG | Ziege | 1:5000 | Pierce |
| Maus IgG | Schaf | 1:5000 | GE Healthcare |
| Ziege IgG | Kaninchen | 1:2000 | Dianova |

2.5.2.3 Entfernen von primärem Antikörper

Um auf einer Membran sequentiell mehrere Proteine nachzuweisen und dabei Kreuzreaktivitäten des sekundären Antikörpers zu vermeiden, musste der erste Antikörper nach der Detektion wieder vom Protein abgelöst werden. Dazu wurde die Membran für 45 Minuten in TBS mit 2% SDS und 100 mM β -Mercaptoethanol bei 50 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Waschen mit TBST konnte eine weitere Immundetektion durchgeführt werden.

⁹⁶ Fa. Cell Signaling Technology

2.5.3 Immunfällungen

2.5.3.1 Immunfällung von Proteinen

Zum gesamten nativen Lysat einer 85 mm Zellkulturplatte wurden je 1 µg Antikörper gegeben und nach kurzem Mischen eine Stunde auf Eis inkubiert. Dann wurden 2,25 mg vorgequollene Protein-A-Sepharose zugegeben und für weitere 16 Stunden in einem horizontalen 360°-Schüttler bei 4°C inkubiert. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit 1 ml Lysepuffer mit 0,1 % NP-40 und weitere zwei Male mit je 1 ml Lysepuffer ohne NP-40 gewaschen. Nach Abnehmen des Überstands wurden die gebundenen Proteine mit 35 µl 2x LSB für 5 Minuten bei 95°C eluiert.

2.5.3.2 Co-Immunfällung für Kinase-Assays

Für die Fällung des Leptin-Rezeptors zusammen mit assoziierten Proteinen wurde der *c-Myc*-Antikörper oder eine Agarose-gekoppelte Variante dieses Antikörpers eingesetzt. Den nativen Zelllysaten aus je einer 85 mm Zellkulturschale wurden je 2,4 µg Antikörper zugesetzt und für mindestens 4 Stunden bei 4°C im 360°-Schüttler horizontal gedreht. Bei Benutzung des ungekoppelten Antikörpers wurde nach Zugabe von 50 µl Protein-A-Sepharose Suspension eine weitere Stunde gedreht. Bei Verwendung des Agarose-gekoppelten Antikörpers wurden 50 µl Protein-A-Sepharose Suspension zur Verbesserung der Handhabung des Pellets zugegeben. Nach Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit je 800 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Äquilibrierung des Pellets folgten zwei weitere Waschschriffe mit je 800 µl Kinasepuffer.

Kinasepuffer

50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 0,4 mM DTT,
1 mM Na₃VO₄, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin in
10 mM HEPES, pH 7,6;

DTT, Na₃VO₄, Aprotinin und Leupeptin wurden wegen ihrer relativen Instabilität erst kurz vor Benutzung zugegeben.

Protein-A-Sepharose Suspension

75 mg/ml Protein-A-Sepharose⁹⁷, 100 µl/ml
Protein-G-Sepharose⁹⁸ in Lysepuffer für
Co-Immunitäzitation

Waschpuffer für Co-Immunitäzitationen

1 % (v/v) Brij[®]97, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF
in 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)

Kurz vor Benutzung wurden 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF,
5 µg/ml Aprotinin und 5 µg/ml Leupeptin zugesetzt.

2.5.4 Kinase-Assay

Die Aktivität der Janus Kinasen am Leptin-Rezeptor wurde *in-vitro* durch die Bestimmung der Phosphorylierung eines exogenen Substrats durch co-immungefällte Kinasen bestimmt. Nach Waschen und Abnehmen des Pelletüberstands wurden je 35 µl Substratpuffer zugegeben, bei Kontrollreaktionen wurde ATP durch gleiches Puffervolumen ersetzt. Die Ansätze wurden bei 30 °C unter Schütteln für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Sepharose wurde weitere zwei Male mit je 800 µl Waschpuffer für Co-Immunitäzitationen gewaschen, und die gefällten Proteine durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C in 2x LSB gelöst. Nach Abzentrifugieren der Sepharose wurde der Überstand wiederum abgenommen und eingefroren.

⁹⁷ Fa. Amersham Pharmacia

⁹⁸ EZview[®] Red Protein G Affinity Gel, Fa. Sigma-Aldrich

Kinasepuffer

50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, 0,4 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin in 10 mM HEPES, pH 7,6;

DTT, Na₃VO₄, Aprotinin und Leupeptin wurden wegen ihrer relativen Instabilität erst kurz vor Benutzung zugegeben.

Substratpuffer für Kinase-Assays

für einen Ansatz: 2,2 µg rhSTAT1⁹⁹, 28 nmol ATP in 30 µl Kinasepuffer (Endkonzentration: ~62,9 ng/µl STAT1, 0,8 mM ATP)

2.6 Internalisierungs-Assay

2.6.1 Leptin-SEAP Bindungs-Assay

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression des Leptin-Rezeptors wurde eine Bindungsstudie durchgeführt. Mit Hilfe eines Fusionsproteins aus Leptin und sekretierter alkalischer Phosphatase¹⁰⁰ (Leptin-SEAP) konnte die Expression des Rezeptors an der Zellmembran untersucht werden. Dieses Protein stand in konditioniertem Medium (aus dem Überstand von transfizierten COS-1-Zellen) zur Verfügung und wurde als 1:50 Verdünnung eingesetzt. RIN-LEPRb-WT-Zellen wurden in *6-well-multidish*-Platten ausgesät (500.000 Zellen/*well*) und für 24 Stunden inkubiert. Nach vierstündigem Serumentzug wurden *Testwells* für zwei Stunden mit 20 ng/ml Leptin stimuliert, während *Kontrollwells* unstimuliert blieben. Alle Zellen wurden anschließend auf Eis gewaschen, zuerst mit kaltem PBS, worauf ein dreiminütiger Waschschrift mit einer Essigsäurelösung (0,5 M NaCl, 0,2 M Essigsäure, pH 2,3) und drei weitere Waschschriffe mit PBS folgten. Dieses

⁹⁹ Rekombinantes, humanes STAT1, Fa. Biosource

¹⁰⁰ Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Jan Tavernier, Universität Gent, Belgien

Vorgehen löste Leptin aus der zweistündigen Vorstimulation von den Rezeptoren ab und macht diese für Leptin-SEAP zugänglich. Die nun folgende Inkubation mit Leptin-SEAP für 90 Minuten wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS und anschließender Lyse der Zellen in je 120 µl Lysepuffer beendet. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Zellfragmente wurden endogene Phosphatasen durch Erhitzen auf 65 °C für 30 Minuten inaktiviert.

Die Detektion des Leptin-SEAP erfolgte durch chemilumineszente Umsetzung des Substrats CSPD durch die alkalische Phosphatase. Je 50 µl der Lysate wurden mit 50 µl CSPD-Verdünnungspuffer versetzt und in einer CCD-Kamera detektiert. Zur Optimierung des Signals wurden weiße, intransparente 96-well Mikrotiterplatten aus Polypropylen verwendet.

CSPD – Verdünnungspuffer

0,1 M NaCl, 5 µl CSPD in 100 µl 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5

Lysepuffer für Internalisierungs-Assay

1 % Triton X-100 in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4

2.6.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die Lysate für die Leptin-SEAP Bindungsuntersuchung wurden mit Hilfe der BCA-Methode¹⁰¹ auf ihren Proteingehalt untersucht, um gegebenenfalls Ungleichheiten der Proben hinsichtlich der Zellzahl ausgleichen zu können. Zur Messung wurde das *BCA Protein Assay Reagent Kit*¹⁰² verwendet. Die Proben wurden nach den Angaben des Herstellers in 96-well Mikrotiterplatten mit dem Reagenz vermengt und nach 30-minütigem Inkubieren bei 37°C die Absorption des entstandenen Chelatkomplexes bei $\lambda=595\text{nm}$ gemessen. Vom Mittelwert der Messungen wurde die Absorption einer proteinfreien Kontrolllösung subtrahiert und die resultierenden Werte zur Normalisierung der Lumineszenzmessungen verwandt.

¹⁰¹ *Bicinchoninic Acid*, Bicinchonsäure

¹⁰² Fa. Pierce

2.7 Reportergeren-Assays

2.7.1 Luziferase-Assay

Die Rezeptoraktivität wurde auf Genexpressions-Ebene mit Hilfe von Luziferase-Assays untersucht. Diese erlaubten eine sensitive Detektion von Promotoraktivitäten durch Integration der Rezeptoraktivität über den gesamten Zeitraum der Stimulation. Für einen Versuch wurden HepG2- oder HIT-Zellen (150.000 bzw. 340.000 Zellen/well) in *6-well-multidish*-Platten ausgesät und 24 Stunden später mit neuem Medium versorgt. Nach einer weiteren Stunde wurden die Zellen transfiziert, die Proteinexpression erfolgte daraufhin für einen Zeitraum zwischen 30- und 48 Stunden. Anschließend wurde für 16 Stunden mit Leptin stimuliert. Die nachfolgende Lyse der Zellen erfolgte auf Eis mit 100 μ l/well *Reporter Lysis Buffer*¹⁰³. Die Lysate wurden durch Zentrifugieren für 3 Minuten bei 14.000 U/min von unlöslichen Bestandteilen befreit, und die Überstände zur Messung der Luziferase-Aktivität benutzt.

Lysat und Substratpuffer wurden im Verhältnis 1:5 gemischt, und 24 μ l der Mischung im Röhrenluminometer für 10 Sekunden gemessen.

Alternativ wurden je 6 μ l der Lysate in *96-well* Mikrotiterplatten vorgelegt und in einem Plattenluminometer nach automatischer Zugabe von je 30 μ l Luziferasesubstrat für 10 Sekunden vermessen. Als Substratpuffer wurde *Luciferase Assay Reagent*¹⁰³ oder der Substratpuffer nach Gaunitz und Papke (Gaunitz und Papke, 1998) eingesetzt.

Für jeden Datenpunkt wurde in jedem Versuch eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Luziferase Substratpuffer (nach Gaunitz und Papke)

2,67mM MgSO₄, 0,1mM EDTA, 270 μ M Coenzym A¹⁰⁴,
33,3mM DTT, 530 μ M ATP, 470 μ M D-Luciferin¹⁰⁴ in
20 mM Tricin-HCl, pH 7,8;

¹⁰³ Fa. Promega

¹⁰⁴ Fa. p.j.k.

Coenzym A, DTT, ATP und D-Luciferin wurden bei -70 °C aufbewahrt und der gebrauchsfertige Puffer nach Ansetzen in Aliquots bei -70 °C gelagert.

2.7.2 β -Galactosidase-Assay

Zur Normalisierung der Ergebnisse auf Unterschiede in der Transfektionseffizienz wurde bei Reportergen-Assays ein Expressionsplasmid für β -Galactosidase (pSV- β -Galactosidase) zutransfiziert, das die gleichmäßige Expression des Proteins durch Transkription des *lacZ*-Gens unter Kontrolle des SV-40-Promotors gewährleistet.

Zur Messung der Galactosidase-Aktivität wurden 4 μ l Lysat mit 100 μ l β -Galactosidase Substratpuffer in einer 96-*well* Mikrotiterplatte vermengt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Absorption bei $\lambda=410$ nm gemessen und vom Mittelwert zweier Messungen zur Korrektur die Absorption einer Kontrolle ohne Protein subtrahiert. Die so erhaltenen Werte dienen zur Normalisierung der Luziferase-Aktivität.

β -Galactosidase Substratpuffer

60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,386 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,55 mM ONPG¹⁰⁵ in H₂O, pH 8,0

2.8 RNA-interference

Die Induktion des gezielten Abbaus von Proteinen in Säugerzellen durch kurze, doppelsträngige RNA-Fragmente von 21-22 Nukleotiden Länge wurde erstmals im Jahr 2001 beschrieben (Elbashir *et al.*, 2001). Eine Weiterentwicklung dieser Methode (Sui *et al.*, 2002) erlaubt den Einsatz von Plasmid-DNA, die *in-vivo* zu kurzen, inhibierenden RNA-Ketten prozessiert wird. Zum gezielten *knockdown* von

¹⁰⁵ Ortho-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid

SOCS1 und SOCS3 wurden Plasmide eingesetzt, die für *short-hairpin RNA* (shRNA) kodieren. Diese shRNA wird in der Zelle von einem Enzym (Dicer) in *silencing RNA* (siRNA) prozessiert, die wiederum den Abbau von mRNA forciert und dadurch die Proteinexpression des jeweiligen Zielgens stark vermindert. Zum *knockdown* von JAK2 wurden Expressionsplasmide für *micro-RNA* (miRNA) verwendet, die unter Verwendung derselben Prozessierungsmaschinerie zu siRNA umgesetzt werden. RNA-*interference* (RNAi) Experimente wurden als Reporteragen-Assays durchgeführt, im Unterschied zu dem in Abschnitt 2.7.1 beschriebenen Vorgehen wurde jedoch der Zeitraum zwischen Transfektion und Stimulation auf 54 Stunden verlängert.

2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde stets Unabhängigkeit und Normalverteilung der Stichproben angenommen.

Alle Tests wurden als zweiseitige Tests ausgeführt.

Einstichproben-Fälle wurden mit Hilfe des Student'schen t-Tests (bei unbekannter Standardabweichung) berechnet (Abbildungen 3.2, 3.3, 3.15)

Zweistichproben-Fälle wurden bei gleichem Stichprobenumfang ebenfalls mit dem t-Test berechnet, da dieser robust gegenüber einer Ungleichheit der Varianzen reagiert. Bei unterschiedlichem Stichprobenumfang wurde der Welch-Test (t-Test für unbekannte und ungleiche Varianzen) zur Berechnung herangezogen (Abbildungen 3.6, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.18).