

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Zelllinien

PC12-Pheochromozytom-Zellen der Ratte, sowie CHO-Zellen wurden von der American Type Culture Collection bezogen. Barbe-Rattenhirn-Endothelzellen wurden freundlicherweise von Dr. B.B. Singer, Stockholm, Schweden, zur Verfügung gestellt. In CHO- und Barbe-Ausgangszellen wurden verschiedene Isoformen und Mutanten des CEACAM1 stabil transfiziert. Das Hybridom zur Produktion des mAk Be 9.2 wurde in der AG Reutter hergestellt.

5.1.2. Bakterien

E. coli INV α F' (Invitrogen, San Diego, USA)

Genotyp: F', endA1, recA1, hsdR17(r κ , m κ), I κ , supE44, thi-1, gyrA96, relA1, ϕ 80 Δ lacM15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR.

5.1.3. Plasmide

pRC/CMV (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Zur Klonierung und Amplifikation von DNA in *E. coli*. Ermöglicht die Expression in Eukaryonten-Zellen, enthält den Promotor des Cytomegalovirus (CMV), die Polyadenylierungssequenz des Rinder-Wachstumshormons (BGH) und das Neomycin-Gen zur Selektion in Geneticin-haltigem Medium.

pCR 2.1 (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

Zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang, enthält lacZ α -Gen und Resistenzgene zur Ampicilin- und Kanamycin-Resistenz.

5.1.4. Primer

		Position in CEACAM1-4L cDNA
Primer b	5' TGTGCAGGGTCTCTCCGTGA 3'	1673-1693
C-CAM-L	5' ACTGTCACTGGCCTCAGTCG 3'	974-993
C-CAM-R	5' CACTGGTGCAGTCAGCAGG 3'	1636-1654
Primer 9	5' AGGTTGAGGGTTTGTGCTC 3'	1451-1469
Primer 22	5' GACCCAGATCCGCCAGTC 3'	1417-1425 + 1479-1487
Primer 3	5' GAAGCAGGCATAGGTTCCGC 3'	945-964
Primer 5	5' CTAGCAGGCAGCAGAGACTA 3'	106-125

alle Primer: AG Reutter, FU-Berlin

Sequenzierungs-Primer (MWG-Biotech)

M13-forward (GTAAAACGACGGCCAG)

M13-reverse (CAGGAAACAGCTATGAC)

5.1.5. Antikörper, Marker, Kits, Chemikalien

Antikörper

Polyklonales anti-CEACAM-Antiserum bzw. -IgG	AG Reutter	FU Berlin
Monoklonaler anti-CEACAM-Antikörper Be 9.2	AG Reutter	FU Berlin
Polyklonales anti-CEACAM1-zyto-Antiserum	AG Reutter	FU Berlin
Ziege-anti-Maus-Ig	DAKO, Glostrup	Dänemark
Kaninchen-anti-Maus-FITC	Sigma	USA
PY99	Santa Cruz	USA
PTP1C	Transduction Laboratories	USA
PTP1D	Transduction Laboratories	USA
SHP2	Santa Cruz	USA
β-Aktin	Sigma	USA
Rab5A	Santa Cruz	USA
Caveolin 1	Transduction Laboratories	USA
Anti-ACTIVE [®] -MAPK	Promega	Mannheim
Anti-ACTIVE [®] -JNK	Promega	Mannheim
Anti-ACTIVE [®] -p38	Promega	Mannheim
ERK1	Santa Cruz	USA
ERK2	Santa Cruz	USA
JNK1/2	Pharmlingen	USA
p38	Santa Cruz	USA
Ratte-anti-Maus-HRP-Konjugat	Dianova	Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen-HRP-Konjugat	Dianova	Hamburg

Marker

1 kb-DNA-Größenleiter Gibco/BRL, Detroit, USA

Molekulargewichtsstandard Sigma, München

(High-Molecular-Weight) 1 Glas wird in 2 ml denaturierendem Probenpuffer gelöst, davon werden 10 µl pro Minigel eingesetzt.

Kits

¹⁷ Sequencing™-Kit	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Plasmid-Midi-Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid-Maxi-Kit	Qiagen, Hilden
Original-TA-Cloning-Kit (Version G)	Invitrogen, Groningen, NL
BCA-Test-Kit	Pierce, Rockford, USA
RNeasy-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick-Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden
Renaissance® western blot detection kit	NEN

Chemikalien

Nerve growth factor 7S	Roche Molecular Biochemicals
Latrunculin A	Calbiochem
Lipofectamin™ 2000 Reagent	Gibco BRL
Immersionöl Immersol	Zeiss
G418-Sulfat	Biochrom
Cytochalasin D	Sigma

5.1.6. Enzyme

Superscript (Reverse-Transkriptase)	Gibco-BRL
Lysozym (Eiweiß)	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Taq-DNA-Polymerase	Perkin-Elmer, Überlingen
T4-DNA-Ligase	Life Technologies, Detroit, USA
DNase I	Life Technologies, Detroit, USA

Restriktionsenzyme und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden, soweit sie hier nicht aufgeführt sind, von der Firma Life Technologies (Detroit, USA) bezogen.

5.1.7. Nährmedien

Nährmedien für die Kultivierung von ZellenCHO-Zell-Medium :

α -MEM
 10 % FKS (v/v)
 5 mM Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 0,1 mg/ml Streptomycin

PC12-Zell-Medium :

RPMI 1640
 10% Pferdeserum (v/v)
 5 mM Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 0,1 mg/ml Streptomycin

Barbe-Zell-Medium :

RPMI 1640
 10% FKS (v/v)
 5 mM Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 0,1 mg/ml Streptomycin

Hybridom-Medium :

RPMI 1640 : DMEM 1:1
 15% FKS (v/v)
 5 mM Glutamin
 100 U/ml Penicillin
 0,1 mg/ml Streptomycin

Selektionsmedien für transfizierte Zellen

Die oben genannten Medien mit zusätzlich 600 μ g/ml Geneticin

Für die Bakterienkultur:

LB-Medium:	10 g NaCl	
	10 g Pepton	(Gibco-BRL, Detroit, USA)
	5 g Yeast-Extract	(Gibco-BRL, Detroit, USA)
	ad 1l mit aqua bidest.	

LB/Amp-Medium:

wie LB-Medium, zusätzlich mit 50 μ g/ml Ampicillin (Boehringer, Mannheim)

LB-Agar:

wie LB-Medium, zusätzlich mit 15 g Agar, (Gibco-BRL, Detroit, USA)

LB/Amp-Agar:

wie LB/Amp-Medium, zusätzlich mit 15 g Agar (Gibco-BRL, Detroit, USA)

SOC-Medium

2	% (w/v)	Bacto-Trypton
0,5	% (w/v)	Bacto-Hefe-Extrakt
10	mM	NaCl
2,5	mM	KCl
10	mM	MgCl ₂
10	mM	MgSO ₄
20	mM	Glucose, mit aqua bidest. auf 1l

5.1.8. Chemikalien

Laborchemikalien wurden von den Firmen ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in höchster Qualitätsstufe bezogen. Chemikalien und Reagenzien weiterer Hersteller sind bei den entstreichenden Methoden ausgewiesen.

Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Diese waren entweder sterile Einmal-Artikel oder sie wurden durch Hitze im Labor sterilisiert.

5.1.9. Lösungen

Lösungen zur Analyse und Reinigung von ProteinenLösungen für SDS-PolyacrylamidgelelektrophoreseLösung A

30 % Acrylamid (w/v)
0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)

Lösung B

0,2 % SDS (w/v)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Lösung C

0,2 % SDS (w/v)
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

10%ige Trenngellösung

3,0 ml Lösung A
2,5 ml Lösung B
3,75 ml aqua bidest.
45 µl 10% APS (v/v)
4,5 µl TEMED

4%ige Sammelgellösung

0,75 ml Lösung C
1,85 ml aqua bidest
12 µl 10% APS (v/v)
3 µl TEMED

10 x Laufpuffer

0,25 M Tris-HCl, pH 8,8
1,92 M Glycin
1 % SDS (w/v)

5 x Probenpuffer (nicht-reduzierend)

0,3 M Tris-HCl, pH 6,8
15 % SDS (w/v)
50 % Glycerin (v/v)
0,015% Bromphenolblau (w/v)

5 x Probenpuffer (reduzierend)

wie 5 x Probenpuffer (n. reduzierend)
zusätzlich 25 % Mercaptopropandiol (v/v)

Lösungen für die Coomassie-Färbung:Coomassie Blau-Färbelösung:

5% Ethanol (v/v)
7,5% Essigsäure (v/v)
1‰ Serva Blue G-250 (w/v)

Coomassie Blau-Entfärbelösung:

wie Färbelösung, aber ohne Serva-Blue

Lösungen für die Silberfärbung:Fixierer:

50% Ethanol (v/v)
12% Essigsäure (v/v)
0,02% Formaldehyd (v/v)

Lösung A:

0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (w/v)

Lösung B:

0,02% AgNO_3 (w/v)
0,025% Formaldehyd (v/v)

Lösung C:

4% Na_2CO_3 (w/v)
0,5‰ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (w/v)
0,015% Formaldehyd (v/v)

Lösungen für den Western-BlotTransferpuffer

160 mM Glycin
20 mM Tris-HCl, pH 8,3
10 % Ethanol

Ponceau S-Färbelösung

0,2 % Ponceau-Rot (w/v)
1,5 % TCA (v/v)
1,5 % Sulfosalicylsäure (w/v)
0,1 % Essigsäure (v/v)
in aqua bidest.

Luminol A

6,8 mM p-Cumarsäure
in DMSO

Luminol B

1,25 mM Luminol
in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

Luminol C3 % H₂O₂ (v/v)PBS11 mM Na₂HPO₄0,7 mM NaH₂PO₄

140 mM NaCl

pH 7,8

PBS-Tween (PBS-T)

Wie PBS zusätzlich mit

0,1 % Tween 20 (v/v)

TBS

10 mM Tris-HCl, pH 7,8

150 mM NaCl

TBS-Tween (TBS-T)

Wie TBS zusätzlich mit

0,1 % Tween 20 (v/v)

Lösungen für die ProteinaufarbeitungSolubilisationspuffer

150 mM NaCl

1 mM CaCl₂1 mM MgCl₂

1,0 % Triton X-100

10 mM Tris-HCl, pH 7,8

Präzipitationspuffer

500 mM NaCl

50 mM TRIS

2 mM CaCl₂

0,05 % NP-40

1 g/l Hühnerei-Ovalbumin

auf pH 8.5

RIPA-Puffer

50 mM TRIS, pH 7,2

150 mM NaCl

1 % Triton X-100 (v/v)

0,1 % SDS (w/v)

1 % Deoxycholat (w/v)

100x Protease Inhibitor MixInhibitor-Mischung für Säugetierzellen
(Sigma, München)Lösungen für die Immunfluoreszenz:Zytoskelett-stabilisierender Puffer mit Saccharose (ZPS)

10 mM MES, pH 6,1

138 mM KCl

3 mM MgCl₂

2 mM EGTA

Saccharose bis 0,32 M frisch dazugeben.

Elvanol

5 g Elvanol (Polyvinylalkohol 25/140, FP 80000) werden langsam in 20 ml Puffer (pH 7,2) gelöst. Der Ansatz wird 16 h bei RT gerührt. Nach Zugabe von 1 ml konz. Glycerin und erneutem Rühren über 16 h wird 15 min. bei 10000 rpm zentrifugiert und 1,2 Phenylendiamin (1mg/ml) im Überstand unter Lichtausschluß gelöst. Die Lösung wird auf pH 8 eingestellt. Die Lösung ist bei -20°C max. 8 Monate haltbar.

Lösungen für die ZellkulturarbeitZelkultur-PBS8 mM Na₂HPO₄1,5 mM KH₂PO₄

140 mM NaCl

3 mM KCl

pH 7,2, Osmolarität: 300 ± 3 mOsm

PBS/EDTA

0,5 g EDTA

in 1 l PBS lösen

Lösungen für die Plasmid-DNA-PräparationMinilysatlösung I

0,025 M Tris-HCl, pH 8,0

0,050 M Glucose

0,010 M EDTA

2,0 mg/ml Lysozym

Minilysatlösung II

0,2 M NaOH

1,0 % SDS (w/v)

Minilysatlösung III

3,0 M Natriumacetat, pH 4,8

PCR-Reagenzien

dNTP's (Perkin Elmer, Branchburg, USA)

10xPCR-Puffer " "

MgCl₂ " "

X-Gal-Stammlösung: 20 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid in Dimethylformamid

BPB-Probenpuffer

3 % Ficoll (w/v)
 0,025 % BPB (w/v)
 0,025 % Na₂EDTA (w/v)
 in 1 x TAE

10 x TAE-Puffer

0,40 M Tris-acetat, pH 8,0
 0,20 M Natriumacetat
 0,02 M EDTA

10 x Synthese-Puffer

(für Reverse Transkriptase)
 200 mM TRIS-HCl, pH 8,4
 500 mM KCl
 25 mM MgCl₂
 1 g/l BSA

5 x T4-Ligasepuffer

10 mM ATP
 250 mM TRIS-HCl, pH 7,5
 35 mM MgCl₂
 10 mM DTT
 500 mM KCl

5.1.10. Geräte

Gerätebezeichnung	Typ	Hersteller
Brutschrank (Bakterien)	BK 6160	Heraeus
Brutschrank (Zellkultur)	6000	Heraeus
Cleanbench	Faster 1	BioFlow-Technik
ELISA-Reader	Spectra	SLT-Labinstruments
Filmentwicklungsmaschine	Curix 60	Agfa AG
Flachbettgelelektrophoresekammer	B1A, B2	BioRad
Gel-Dokumentations-Apparatur	Gel-Print 2000i	MWG-Biotech
Hybrid-Thermo-Cycler	Touch-Down	MWG-Biotech
Kühlzentrifuge	Centricon H-401	Kontron Instr.
Mikroskop	TMS	Nikon
Power-Supply	Power-Pac 1000	BioRad
SDS-PAGE-System	Mini-Protreat II	BioRad
Sequencer	LI-COR 4200	MWG-Biotech
Spektralphotometer	Ultrospec 3000	Pharmacia
Ultrazentrifuge	Centricon T-2070	Kontron Instruments
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Konokales Mikroskop	LSM 410	Zeiss
Luminoldetektionssystem	LAS 1000	Fuji
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200	Zeiss

5.2. Methoden

5.2.1. Zellbiologische Methoden

5.2.1.1. Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wurden bei 37 °C im Begasungsbrutschrank bei 95% rel. Luftfeuchte und 5% CO₂ gehalten. PC12-Zellen wurden in Suspensionskultur in RPMI mit 10% hitzeinaktiviertem Pferdeserum kultiviert. Zur Passage wurden die Zellen bei 900 rpm zentrifugiert, in PBS gewaschen und im Verhältnis 1:3 verdünnt. Für Experimente wurden Zellkulturschalen für 18 h bei 4 °C mit 20 µg / ml Kollagen IV beschichtet und die Zellen für wenigstens weitere 18 h ausplattiert. Die neuronale Differenzierung wurde durch Behandlung mit 250 ng / ml NGF (Roche) für 72 h induziert. CHO-Zellen wurden in α-MEM-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FKS adhärent gezogen. Barbe-Zellen wuchsen ebenfalls adhärent in RPMI mit 10% FKS. Beide Zelllinien wurden mit PBS / EDTA abgelöst, zentrifugiert, mit PBS gewaschen und im Verhältnis 1:3 (Barbe) bzw. 1:8 (CHO) verdünnt ausplattiert.

Die Hybridomzellen zur Produktion des mAk Be 9.2 wurden in serumhaltigem Medium kultiviert, bis die Zellen dicht gewachsen waren. Die Zellen wurden zur Antokörpergewinnung gewaschen, in serumfreies Medium überführt und weiter kultiviert, bis die Zellen anfangen, abzusterben. Das Medium wurde gesammelt, für 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert und steril filtriert. Die Antikörper wurden durch Affinitätschromatographie an Protein G gereinigt.

5.2.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zelllinien

Eukaryote Zellen können in flüssigem Stickstoff eingefroren und somit für Monate haltbar gemacht werden. Dazu werden frisch gewaschene und pelletierte Zellen in neun Teilen (900 µl) inaktiviertem FKS und einem Teil (100 µl) Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen, langsam auf -80°C abgekühlt und in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie schnell aufgetaut, in Medium gewaschen, und anschließend auf Kulturplatten ausplattiert, im Brutschrank inkubiert werden.

5.2.1.3. Stimulation von Zellen

Vor Experimenten wurden die Zellen für 2 h in serumfreiem Medium gehalten. Re-Stimulation von serumdepletierten PC12-Zellen mit 10% Pferdeserum wurde für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Zur Stimulation von CEACAM1 durch Quervernetzen mit Antikörpern wurden Zellen in Kulturschalen auf 4 °C abgekühlt. Dann wurde der anti-CEACAM1 mAk Be 9.2 (10 µg / ml) für 30 min zugegeben und bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen in warmem PBS erfolgte die abschließende Stimulation mit Ziege-anti-Maus Ig (15 µg /ml) für 5 bis 180 min bei 37 °C. Zur Darstellung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung wurde in manchen Versuchen Pervanadat (s.u.) 5 min vor dem Ende der Stimulationszeit zugegeben. Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte durch Inkubation mit 2 µM Cytochalasin D und

500 nM Latrunculin A während der zweiten Stunde der Serumdepletion. Stimulation mit 500 nM PMA wurde für 10 min bei 37 °C durchgeführt.

5.2.1.4. Herstellung von Natriumorthovanadat-und Pervanadat -Lösung

Vanadate neigen in Lösung zu Bildung von oligomeren und polymeren Addukten. Durch wiederholte Zyklen von Erhitzen und Einstellen des pH- Wertes erhält man das monomere Orthovanadat. Eine 100 mM Na₃VO₄-Lösung wird auf pH 10 eingestellt. Die Lösung sollte gelb sein. Die Lösung wird bis zur Entfärbung aufgeköcht und nach Abkühlen auf RT wird der pH-Wert erneut justiert. Der Zyklus wird dreimal wiederholt, anschließend wird die fertige Lösung in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Zur Erzeugung von Pervanadat wird diese Stammlösung mit 30% H₂O₂ für 5 min bei RT oxidiert. Der Mix wird direkt zur Behandlung der Zellen eingesetzt, so dass sich Endkonzentrationen von 100 µM für Vanadat und 10 mM für H₂O₂ ergeben.

5.2.1.5. Solubilisierung von Zellen

Für Koimmunpräzipitationsexperimente wurden Zellen von der Kulturschale in Solubilisationspuffer mit 1% Triton X-100 abgekratzt, und für 1 h unter vorsichtiger Rotation bei 4 °C solubilisiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 15.000 g für 15 min pelletiert und der Überstand verwendet. Zur Bestimmung der Detergenslöslichkeit von CEACAM1 nach Stimulation wurde die Solubilisierung unter heftigem Rütteln und bei 37 °C durchgeführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in PBS gewaschen und in 2x Probenpuffer für maximal 3 min aufgeköcht. Zur Darstellung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung wurde bei 4 °C in RIPA für 1 h unter heftigem Rütteln lysiert und dann zentrifugiert.

5.2.1.6. Quantifizierung der Detergenslöslichkeit von CEACAM1

Die relative Menge an CEACAM1 in 30 µg Protein-Lysat und in 20µl der Pelletfraktion wurde über Immunblot bestimmt. Diese Mengenverhältnisse gewährleisteten vergleichbare Bandenintensitäten, was für die Quantifizierung nötig ist. Durch Extrapolation auf die gesamte Fraktion wurde die relative Menge des löslichen und unlöslichen CEACAM1 errechnet. Hieraus ergab sich der prozentuale Anteil des CEACAM1 in der unlöslichen Fraktion.

5.2.1.7. Quantifizierung der CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung

CEACAM1 wurde durch Immunpräzipitation aus Zelllysat angereichert und im Immunblot zuerst die relative Menge des Signals für Phosphotyrosin (PY), dann für CEACAM1 (CC) bestimmt. Der Quotient PY / CC wurde für Kontrollen gleich 100% gesetzt, so dass sich die relative prozentuale CEACAM1-Tyrosinphosphorylierung für jede Probe im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ergab.

5.2.1.8. Transfektion von DNA in Eukaryonten-Zellen

Das Einschleusen von DNA in Zellen wurde mit der Lipofektamin-Methode durchgeführt. Hierbei bindet die DNA an kationische Lipide in Liposomen. Diese Komplexe werden von der Zellmembran aufgenommen. $1,3 \times 10^6$ PC12-Zellen wurden auf 3,5 cm Kollagen IV-Schalen in Medium ohne Antibiotikum ausplattiert und kultiviert, bis 90% Konfluenz erreicht war. Zur Transfektion wurden 10 μ l Lipofektamin 2000 und 4 μ g der entsprechenden Plasmid-DNA in jeweils 250 μ l Opti-MEM-Medium (Gibco) gelöst und getrennt für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden beide Ansätze gemischt und für 20 min zur Bildung der DNA-Lipid-Komplexe inkubiert. Der Mix wurde dann direkt auf die Zellen gegeben. Nach 5 h wurden die Zellen gewaschen und das Medium gewechselt. Die Klonierung der transfizierten Zellen erfolgte durch limitierte Verdünnung in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Die Zellen wurden soweit verdünnt, daß sich rein statistisch eine Zelle in 200 μ l Selektionmedium bzw. eine Zelle in 400 μ l befand und 200 μ l wurden pro Loch ausplattiert. Die Zelle konnte im Zeitraum von einigen Tagen zu einer Population heranwachsen, in größere Kulturschalen überführt werden und die Proteinexpression mittels Immunblot und/oder FACS-Analyse überprüft werden.

5.2.2. Proteinchemische Methoden

5.2.2.1. Proteinbestimmung

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurde der BCA-Test-Kit der Firma Pierce, Rockford, USA, verwandt. Der Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ . Die Bichinolin-4-carbonsäure reagiert mit Cu^+ , wobei zwei Bichinolinsäure-Moleküle einen intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu^+ -Ion eingehen. Die vorliegenden Proben wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit je 200 μ l der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wurde, versetzt. Nach 30 min-Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) bekannter Konzentrationen konnte die unbekannte Proteinkonzentration der zu testenden Probe bestimmt werden.

5.2.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Für die vertikale Elektrophorese von Proteinen wurde das Mini-Protean-System II der Firma Biorad verwandt. Grundsätzlich kamen Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel zum Einsatz. Der Aufbau und die Ausstattung der Gelapparatur erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Richtlinien. Die SDS-PAGE wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit 5-fach konzentriertem Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V. Als Größenstandard diente der Molekulargewichtsstandard "high-Marker" der Firma Sigma.

5.2.2.3. Coomassie-Färbung von Proteingelen

Proteine können in Gelen sehr einfach mit dem Farbstoff Coomassie Blau gefärbt werden. Das Gel wird in Färbelösung in der Mikrowelle vorsichtig ohne Kochen erhitzt und bis zum Abkühlen bei RT geschüttelt. Dann wird dreimal in Entfärbelösung auf die gleiche Weise entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt sind.

5.2.2.4. Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Proteinen ist etwas aufwändiger, aber auch deutlich empfindlicher als die Coomassie-Färbung. Alle Arbeitsschritte werden mit Handschuhen unter Schütteln bei RT durchgeführt. Das Gel wird 20 min in Fixierer fixiert, dann dreimal 10 min in 50% Ethanol gewaschen. Dann wird 1 min (!) in Lösung A inkubiert, dreimal 20 sec in aqua bidest gewaschen, 15 min in Lösung B inkubiert und erneut gewaschen. Die Färbung erfolgt nach Sichtkontrolle in Lösung C für 1-5 min. Das Gel wird zügig gewaschen und die Reaktion in Fixierlösung gestoppt. Vor dem Trocknen wird das Gel in 50% Ethanol gewaschen.

5.2.2.5. Western-Blotting (Towbin et al., 1979)

Verwandt wurden Blotapparaturen der Firma Biorad. Direkt nach der Elektrophorese wurde der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut, so daß die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigte. Der Transfer wurde bei 4°C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 60 min durchgeführt. Um die Qualität des Proteintransfers beurteilen zu können, wurden die auf die Membran übertragenen Proteine mit Ponceau S-Färbelösung angefärbt. Dazu wurde der Blot 1 min in Färbelösung getaucht und dann in aqua dest. solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Die vollständige Entfärbung erfolgte in PBS oder TBS. Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulose-Membran erfolgte immunologisch mit Antikörpern.

5.2.2.6. Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von Lipid-Rafts (Iwabuchi et al., 1998)

CHO-Zellen wurden auf 10 cm Schalen stimuliert wie oben beschrieben. Die Zellen wurden dann in 1 ml eiskalten Solubilisationspuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis stehen gelassen. Das Lysat wurde mit 10 Hüben eines Dounce-Homogenisators homogenisiert und für 5 min bei 1.300 g zentrifugiert, um Kerne, Zytoskelett und sonstige unlösliche Komponenten abzutrennen. Der Überstand wurde mit einer 85% (w/v) Saccharose-Stammlösung in Solubilisationspuffer auf 42,5% (w/v) Saccharose eingestellt und in ein Ultrazentrifugationsröhrchen gegeben. Die Probe wurde mit 18 ml 30% (w/v) Saccharose in Solubilisationspuffer und 5 ml 5% Saccharose in Solubilisationspuffer überschichtet. Der Gradient wurde für 18 h bei 4 °C bei 120.000 g zentrifugiert und anschließend von oben beginnend in 1 ml Einheiten fraktioniert. Die Lipid-Rafts reichern sich unter diesen Bedingungen aufgrund ihrer geringen Dichte zwischen der 5%- und der 30%-Schicht an, während frei lösliche Proteine am Boden des Gradienten verbleiben. 16 µl aller Fraktionen

wurden mit 4 µl 5x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C gekocht und im Immunblot auf CEACAM1 und Caveolin1 getestet.

5.2.3. Immunchemische Methoden

5.2.3.1. Reinigung von Antikörpern durch Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von Antikörpern wurde die Affinität der bakteriellen Proteine A und G an die Fc-Teile von Antikörpern genutzt. Der mAk Be 9.2, Subklasse IgG₁, wurde über eine 1 ml Protein G Fast Flow Säule (Pharmacia) gereinigt. Alle Schritte wurden bei 4°C mit einer Flussrate von 0,5 ml / min durchgeführt. Die Säule wurde mit 5 ml Zellkultur-PBS äquillibriert, dann wurden je nach Gehalt 50 bis 200 ml zentrifugierter und steril filtrierter Zellkulturüberstand des Hybridoms über die Säule gegeben. Dann wurde mit 5 ml PBS gewaschen und der gebundene Antikörper mit 0,1 M Glycin, pH 2,5 eluiert. Die erhaltenen 1 ml – Fraktionen wurden sofort mit 1 M Na₂CO₃ neutralisiert. Die Fraktionen wurden durch Proteinbestimmung und Coomassie-Färbung im Gel untersucht. Die Reinigung von Antikörpern aus Serum wurde auf analoge Weise mit einer Protein A-Säule durchgeführt. Pro Aufreinigung wurde ca. 1 ml Serum eingesetzt.

5.2.3.2. Immunblot

Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgte die Blockierung in 10% Magermilchpulver in PBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Alle anschließenden Inkubations- und Waschschrte wurden in PBS-T durchgeführt, der letzte Waschschrte vor der Entwicklung in PBS. Die Membran wurde zweimal gewaschen, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper für 18 h bei 4 °C. Die Membran wurde fünfmal 5 min lang gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper, z.B. einem mit Peroxidase gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:5000 - 1:10000), für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlichem Waschen, mindestens sechsmal 10 min, konnte der Blot mit Chemilumineszenzdetektion entwickelt werden. Hierzu wurde die Membran mit Whatman-Papier getrocknet und anschließend mit einer Mischung aus 10 µl Luminol-Lösung A, 1 ml Luminol-Lösung B und 3 µl Luminol-Lösung C für 1 min inkubiert. Nach Trocknen mit Whatman-Papier wurden die Blots in Folie gelegt und die Signale für 20 sec bis 1 h in einer LAS-1000-Kamera (Fuji) aufgenommen. Die Quantifizierung von Banden wurde mit dem Programm Image Gauge V3.4 durchgeführt. Die graphische Bearbeitung wurde in Photoshop V5.5 durchgeführt. Im Immunblot mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern stört Phosphat sowohl im Puffer als auch in Proteinen der Milch, z.B. Casein. Deshalb wurde hier mit TBS-T gewaschen. Der Blot wurde in TBS-T mit 10% BSA für 18 h bei 4 °C blockiert, und für 4 h bei 4 °C mit dem mAk PY99 (1:2.000) inkubiert. Die weitere Detektion erfolgte wie oben. Die phosphorylierungsspezifischen anti-ACTIVE[®]-MAPK, anti-ACTIVE[®]-JNK und anti-ACTIVE[®]-p38- Antikörper (Promega) wurden nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Diese Blots wurden in TBS-T mit 1% BSA für 18 h bei 4 °C blockiert und die Antikörper für 2 h bei RT eingesetzt. Vor der zweiten Verwendung eines Blots wurden alte Antikörper durch

Strippen mit dem Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Pierce) für 15 min bei RT entfernt. Der Blot wurde gründlich gewaschen, erneut blockiert und mit neuen Antikörpern inkubiert.

5.2.3.3. Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen wurden unter Verwendung einer Protein A-Sepharose-Matrix durchgeführt. Protein A aus *Staphylococcus aureus* besitzt eine hohe Affinität zum Fc-Teil von Antikörpern. Durch an Protein A gebundene Antikörper kann ein Antigen aus einer Lösung, z.B. einem Zellsolubilisat, gebunden und isoliert werden.

Bei der Immunpräzipitation aus Zellkulturmedium wurden die Zellen zwei Tage in Kultur gehalten und das Medium nach mehrfacher Zentrifugation, zunächst für 3 min bei 900 rpm zum Abzentrifugieren der Zellen, dann mindestens zweimal 3 min bei 2000 rpm zum Abzentrifugieren von unlöslichen Bestandteilen, gewonnen. Um Serum zu gewinnen, wurde Vollblut 40 min bei Raumtemperatur stehengelassen, anschließend wurde die Probe 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Für eine Immunpräzipitation wurde jeweils 300 µl Serum eingesetzt. 10 µl Antiserum wurden mit 7 mg Protein A-Sepharose CL 4B (Pharmacia) in 1 ml PBS für 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach je zweimaligem Waschen mit 10 ml PBS und 10 ml Präzipitationspuffer erfolgte die Inkubation des Antikörperkomplexes mit antigenhaltiger Lösung (Medium bzw. Serum) in Präzipitationspuffer für 2-18 h unter ständigem Schütteln bei 4°C. Anschließend wurde je zweimal mit Präzipitationspuffer und mit PBS gewaschen. Der Immunkomplex wurde durch Kochen in 20 µl SDS-PAGE-Probenpuffer gelöst. Der Überstand wurde abgenommen, erneut zentrifugiert und zur Elektrophorese eingesetzt.

5.2.3.4. FACS-Analyse

Zur Analyse der Oberflächenexpression von Adhäsionsproteinen wurden 10^5 Zellen geerntet, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert und in PBS für 45 min auf Eis mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde ebenfalls für 45 min auf Eis mit einem anti-IgG-FITC-Konjugat inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und die Fluoreszenz mit einem FACS-Scan der Firma Becton-Dickenson (Heidelberg) bestimmt.

5.2.3.5. Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Nach Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern kann die Lokalisation von Antigenen in Zellen durch Anregung im kurzwelligen Bereich und Erfassung des emittierten längerwelligen Lichtes im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Zur Färbung von CEACAM1 wurden PC12-Zellen auf Kollagen IV-beschichteten Objektträgern aus Glas oder Plastik für 18 h ausplattiert, mit PBS gewaschen, und für 15 min bei RT in PBS mit 3% Paraformaldehyd fixiert. Unspezifische Bindungen wurden in PBS mit 1% BSA (PBS /BSA) für 30 min bei RT blockiert. Inkubation mit polyklonalem anti-CEACAM1-IgG erfolgte in PBS / BSA bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde für 1h bei RT mit einem Ziege-anti-Kaninchen-FITC-Konjugat gefärbt und erneut gewaschen. Die Präparate

wurden an der Luft getrocknet und in Elvanol eingedeckt. Zur Visualisierung der makromolekularen Reorganisation von CEACAM1 wurden Zellen vor dem fixieren nacheinander mit dem anti-CEACAM1-mAk Be 9.2 und Ziege-anti-Maus-Ig-Antikörpern behandelt.

Das LSM kann im Gegensatz zum normalen Fluoreszenzmikroskop durch Anwendung des konfokalen Prinzips die exakte dreidimensionale Lage eines Signals darstellen. Zur Darstellung der Kolokalisation von CEACAM1 und Aktin wurden Barbe-Zellen auf Glasobjektträgern bis zur Konfluenz kultiviert, optional für 45 Sek. mit 0,1% Triton X-100 in ZPS extrahiert und dann in 3% Formaldehyd in ZPS für 20 min fixiert. Nach Waschen (TBS / 0,1% Triton X-100, 3x), Permeabilisieren (10 min in TBS / 0,5% Triton X-100), erneut waschen (s.o.), und Blockieren (30 min in TBS / 0,1% Triton X-100, 2% BSA) wurden die Zellen polyklonalem anti-CEACAM1-IgG und Ziege-anti-Kaninchen-FITC gefärbt (s.o.). Anschließend wurde F-Aktin durch Inkubation mit Phalloidin-TRITC (1 µg / ml, 20 min in Blockierlsg.) visualisiert.

5.2.4. Mikrobiologische Methoden

5.2.4.1. Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Vollmedium, dem nach Bedarf Ampicillin zugesetzt wurde. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach dem integrierten Resistenzgen. Die Kulturen wurden bei 37°C auf Festmedium (1,5% Agar in LB) oder in Schüttelkulturen bei 220 rpm und 37°C inkubiert. Ausgangsmaterial zum sterilen Beimpfen von Kulturen waren Einzelkolonien von einer Kulturplatte. Die Langzeitlagerung von *E. coli* erfolgte nach Zusatz von 20% Glycerin bei -80°C.

5.2.4.2. Herstellung kompetenter Bakterien (Mandel & Higa, 1970; Dagert & Ehrlich, 1979)

Die Herstellung von Bakterien, deren Zellmembranen für DNA-Moleküle permeabel ist, wurde mit der Methode von Dagert & Ehrlich durchgeführt. Dazu müssen die Bakterien mit CaCl₂ behandelt werden. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml LB-Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln (220 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2 herangezogen. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 6000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment in 20 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in 500 µl kaltem CaCl₂ resuspendiert. Nun konnten die Zellen sofort zur Transformation eingesetzt werden oder mit 20% (v/v) Glycerin versetzt bei -80°C gelagert werden.

5.2.5. Molekularbiologische Methoden

5.2.5.1. RNA-Präparation

RNA kann von RNasen sehr schnell degradiert werden. Da RNasen ubiquitär vorhanden sind, ist beim Arbeiten mit RNA auf kontaminationsfreies Arbeiten zu achten.

Präparation von Total-RNA mit RNeasy

Eine Methode zur Aufreinigung von Total-RNA bietet der RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden). Die Anweisungen des Herstellers wurden exakt befolgt. Bei dieser Methode wurden ca. 10^7 Zellen in Gegenwart eines stark denaturierenden Puffers lysiert und homogenisiert. Die RNA wird hier an eine selektiv bindende Silicagel-Membran im Zentrifugationsröhrchen gebunden und mit ethanolhaltigem Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 30 μ l RNase-freiem Wasser

5.2.5.2. cDNA-Synthese

Gesamt-RNA wurde durch das RNA-abhängige Enzym Reverse-Transkriptase (Superscript, Gibco-BRL, Detroit, USA) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 10 μ l einer 1 μ g/ μ l konzentrierten RNA-Lösung eingesetzt. Die Lösung wurde für 5 min auf 70°C erhitzt, um Basenpaarungen innerhalb einzelsträngiger RNA aufzulösen. Dann wurde die Probe 5 min auf Eis inkubiert und ein Mix aus 1 μ l dNTPs (10 mM), 4 μ l 5x First-Strand-Puffer, 2 μ l 100 mM DTT und 1 μ l Primer zugefügt. Zu der Probe wurde dann 1 μ l Reverse-Transkriptase gegeben und es wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Primeranlagerung zu ermöglichen. Es folgte eine 50 min-Inkubation bei 42°C (Transkriptionsreaktion), dann 5 min bei 90°C (Denaturierung).

5.2.5.3. Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985; Mullis & Faloona, 1987)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit der exponentiellen Amplifikation von ausgewählten DNA-Abschnitten *in vitro* nach Mullis & Faloona (1987) sowie Saiki et al. (1985). Einem vorliegenden Stück einzelsträngiger DNA kann durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ein komplementärer Strang aufpolymerisiert werden. Zur Synthese werden zwei Oligonukleotidprimer, welche die zu amplifizierende Region flankieren, an die entgegengesetzten DNA-Stränge hybridisiert. Die neu entstandenen Doppelstränge werden dann durch Erhitzen zu Einzelsträngen denaturiert, die nach erneutem Hybridisieren der Primer wiederum als Matrize für die Polymerase dienen. Der Reaktionszyklus, der aus DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer und Auffüllreaktion besteht, liefert nach jeder Wiederholung eine Verdoppelung der vorhandenen Matrizen-DNA und damit eine exponentielle Anreicherung der gewünschten Sequenz. Die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* *YT1* liefert eine hitzebeständige DNA-Polymerase, so daß die Kettenreaktion in einem Gefäß ohne erneute Zugabe von Polymerase nach jedem Denaturierungsschritt durchgeführt werden kann. Im 50 μ l-Ansatz waren je 0,25 μ M Primer, je 0,4 μ M dNTPs, 1,5 μ M MgCl₂, 1 x Puffergemisch (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3), 2 U Taq-Polymerase und die Probe enthalten. Die Reaktionsbedingungen für alle durchgeführten PCR-Reaktionen:

einmalige Denaturierung bei 94°C für 4 min, gefolgt von 35 Zyklen, die sich zusammensetzten aus Annealing der Primer bei 55°C für 1 min, Auffüllreaktion bei 72°C für 1,5 min und Denaturierung bei 94°C für 1 min. Zuletzt folgte eine einmalige Auffüllreaktion bei 72°C für 10 min.

5.2.5.4. Agarose-Gelelektrophorese

Elektrophoresen wurden zur Größenbestimmung nach Restriktionsverdau, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Qualitätskontrolle von RNA benutzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in horizontalen 0,8 bis 1,5%igen (w/v) Agarose-Gelen. Die Agarose wurden durch Kochen in TAE-Puffer gelöst und in die entsprechenden Gelschlitzen gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen BPB-Probenpuffer versetzt. Bei analytischen Gelen betrug das Auftragsvolumen 5-20 µl, bei präparativen Gelen 100-200 µl. Von der 1 kb-Leiter (Gibco-BRL) wurden 250 ng aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 75 V durchgeführt, bis der Farbmarker die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hatte. Das Gel wurde anschließend für 5-10 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) gefärbt und die analytischen Gele unter UV-Licht fotografiert.

5.2.5.5. Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution

DNA kann aus Agarose-Gelen durch ihre Verflüssigung in Spezialpuffer gelöst und durch QIAgen-Säulen gereinigt werden. Verwandt wurde hierfür der "QIAquick-Gel-Extraction-Kit" (Qiagen, Hilden). Der im Kit enthaltene Puffer QG enthält Salze, die die Struktur von Nukleinsäuren modifizieren. Der QG-Puffer ermöglicht das Schmelzen der Agarose bei relativ niedrigen Temperaturen und die optimale Bindung an die Silicagel-Membran in den Säulen, die jeweils mittels kurzer Zentrifugation beladen, gewaschen und eluiert werden. Die DNA-Absorption ermöglicht die Reinigung von unerwünschten Primern und Verunreinigungen, wie Salzen, Enzymen, nicht inkorporierten Nukleotiden, Agarose, Ethidiumbromid, Ölen und Detergentien, da diese nicht binden. Salze werden durch den Ethanol-enthaltenden PE-Puffer quantitativ entfernt. Die Elution erfolgt unter basischen Bedingungen mit wenig Salz. Nach dem Ausschneiden der entsprechenden Banden aus einem Ethidiumbromid-gefärbten Gel unter UV-Licht (366 nm) wurde die DNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert.

5.2.5.6. Klonierung von PCR-Produkten

Ligation von DNA-Fragmenten (Weiss et al., 1968)

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mit Hilfe einer Ligase wird als Ligation bezeichnet. Ligierte wurden entweder linearisierter, dephosphorylierter Vektor mit durch Restriktionsverdau isolierten DNA-Fragmenten oder frische PCR-Produkte mit einem PCR-Vektor. Für die Ligation und Klonierung von PCR-Produkten (mit A-Überhang) wurde nach den Anweisungen des Herstellers (Invitrogen,

Groningen, Niederlande) vorgegangen. Die Ligation von dephosphoryliertem Vektor mit DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsverdau und Gelelektrophorese sowie Gelelektion isoliert worden sind, erfolgte nach folgendem Rezept: 0,5 pmol (1,5 µl) Restriktionsfragment-DNA wurde mit 0,1 pmol (0,5 µl) linearisierter und dephosphorylierter Vektor-DNA mit 2 µl 5x Ligasepuffer, 5 µl Wasser, 1 µl T4-DNA Ligase (20 U) über Nacht bei 14°C ligiert. Die Ligationsansätze wurden vollständig zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

5.2.5.7. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA und somit die genetische Veränderung von Bakterien bezeichnet. Dabei wurden zu 100 µl kompetenten Zellen 5 µl eines Ligationsansatzes pipettiert und die Proben 30 min auf Eis gehalten. Es folgte eine 30 sec-Inkubation bei 42°C im Wasserbad, um die Aufnahme der DNA zu erleichtern. Die Zellen wurden 2 min auf Eis und danach in 450 µl LB-Medium oder alternativ SOC-Medium für 1 h schüttelnd bei 37°C inkubiert, damit sich die Zellen regenerieren konnten. Aliquots von 50 und 200 µl dieser Zellsuspension wurden auf vorgewärmten LB-Amp-Agarplatten, die zuvor mit je 25 µl X-Gal-Lösung (40 mg/ml) beschichtet wurden, bei 37°C über Nacht inkubiert.

5.2.5.8. Plasmid-Schnell-Präparation (Birnboim & Doly, 1979)

Von einer *E. coli*-Übernachtskultur in selektivem LB-Medium wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Minilysatlösung I resuspendiert, kurz mit Hilfe des Vortex gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Das in dieser Lösung enthaltene Lysozym verdaut die bakterielle Zellwand. Anschließend wurden 200 µl Minilysatlösung II zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Diese stark alkalische Lösung lysiert die Zellen und setzt die DNA frei. Nach Zugabe von 150 µl der neutralisierenden Minilysatlösung III folgte eine 15 min-Inkubation auf Eis. Durch die hohe Salzkonzentration dieser Lösung werden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt, während die Plasmid-DNA gelöst bleibt. Eine anschließende 10 minütige Zentrifugation bei 11000 rpm pelletierte die zellulären Proteine und die chromosomale DNA. Der Plasmid-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 1 ml Isopropanol gefällt. Die ausgefallene DNA wurde mit 13000 rpm bei 4°C pelletiert und dreimal mit kaltem 70% Ethanol gewaschen. Die DNA konnte in Wasser aufgenommen, quantifiziert bzw. weiter analysiert werden.

5.2.5.9. Midi- und Maxi-Plasmidpräparationen

Die Midi- und Maxi-Plasmidpräparationen wurden nach den Anweisungen und mit den Materialien des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Diese Methode geht auf die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly (1979) zurück. Um größere Mengen (100 bzw. 500 µg) High-Copy-Plasmid-DNA zu isolieren, wurden 25 ml bzw. 100 ml Übernachtskulturen eingesetzt. Die Reinigung der DNA erfolgte über ein Anionen-Austauscher-Harz, an das DNA bei geringen Salzkonzentrationen und niedrigem pH-Wert bindet. Verunreinigungen,

wie z.B. Proteine, werden bei mittleren Salzkonzentrationen entfernt. RNA wird durch zugegebene RNase inaktiviert. Mit Hochsalzpuffer wurde die Plasmid-DNA eluiert, durch Isopropanol-Fällung konzentriert und mit 70% Ethanol entsalzt.

5.2.5.10. Restriktionsspaltung (Brooks, 1987)

Die Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit Restriktionsendonukleasen wurde bei der Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt zwischen 1 und 50 µg DNA. Restriktionsspaltungen wurden immer unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Pro Restriktionsansatz wurden etwa eine Einheit (U) Enzym pro µg DNA verwandt, die Reaktion erfolgte immer bei 37°C für mindestens 2 h. Die erhaltenen Fragmente wurden mit Hilfe der TAE-Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Reinigung der Fragmente erfolgte durch Gelelution.

5.2.5.11. Sequenzierung (Sanger et al., 1977)

Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. 300 fmol DNA wurden mit 4 pmol Fluoreszenz-markiertem Sequenzierprimer M13-forward oder M13-reverse auf die vier Stopmixe verteilt und die Ansätze mit einem Volumen von 6 µl einem Cycle-Sequencing mit 18 bis 25 Zyklen unterzogen. Dann wurde 1 µl des zuvor mit Gelladepuffer gestoppten Reaktionsmixes auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (MWG-Biotech, München) analysiert.