

5. Methoden

Falls nicht näher bezeichnet, wurden die Methoden entsprechend den Angaben in „Molecular Cloning“ (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt.

Für sämtliche Arbeiten wurde Reinstwasser aus einer Milli Q Synthesis A10 Anlage (Millipore) verwendet.

5.1 Amplifikation, Präparation, Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren

5.1.1 PCR

Der Reaktionsansatz für eine PCR bestand in der Regel aus 1x PCR-Puffer, 20 μ M Primer A, 20 μ M Primer B, 200 μ M dNTPs (jeweils), 30-50 ng *Template*-DNA, 1,5 mM MgCl₂ und 0,4 μ l GenTherm™ Polymerase in 50 μ l H₂O. Die GenTherm™ Polymerase generiert A-Überhänge am 3'-Ende der Amplifikate. Um stumpfe Enden zu erhalten oder bei besonders langen Amplifikaten Lesefehler der DNA-Polymerase herabzusetzen, wurde in einigen Fällen die PfuUltra™ *High-Fidelity DNA* Polymerase den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert und als letztes die Polymerase zugegeben. Dann wurden die Proben in den auf 94°C vorgeheizten PCR-Block gestellt und das PCR-Programm gestartet (*simplified hot start*). Für mehrere PCR-Ansätze wurde ein Mastermix verwendet, um Pipettierfehler zu vermeiden.

Programm:

| | | | |
|---------------------|-----------------|-------------------|----------|
| Denaturierung: | 94°C | 5 min | |
| Denaturierung: | 94°C | 30 sec | |
| <i>Annealing</i> : | T _{an} | 30 sec | } 25-35x |
| <i>Elongation</i> : | 72°C | 1 min/kb Fragment | |
| <i>Elongation</i> : | 72°C | 10 min | |
| Ende: | 4°C | ∞ | |

T_{an} bezeichnet die spezifische *Annealing*(Anlagerungs)-Temperatur der verwendeten Primer. Die Anzahl der Zyklen war abhängig von Menge und Zugänglichkeit des Ausgangsmaterials. Anschließend wurden die Ansätze mit 5 μ l 10x DNA-Probenpuffer versetzt und mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -20°C.

5.1.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wurde das Ausgangsmaterial RNA in cDNA umgeschrieben. Daran schloss sich eine normale PCR an. In dieser Arbeit wurde das *ThermoScript* RT-PCR-System von *Invitrogen* verwendet, das sämtliche benötigte Komponenten bis auf die RNA enthielt. Für die Reaktion wurden 1 μ l Oligo(dT)₂₀-Primer (50 μ M), 4 μ g RNA und 1 μ l 10 mM dNTP-Mix mit DEPC-behandeltem H₂O auf 12 μ l aufgefüllt, 5 min bei 65°C inkubiert und auf Eis gelagert. Auf den Ansatz wurde anschließend 8 μ l eines Mastermixes gegeben, bestehend aus je 4 μ l 5x cDNA-Synthesepuffer,

1 µl 0,1 M DTT, 1 µl *RNaseOUT* (40 U/µl), 1 µl DEPC-behandeltes Wasser und 1 µl *ThermoScriptTMRT* (15 U/µl) pro Reaktion. Die cDNA-Synthese fand für 1 h bei 50°C statt, dann wurde das Enzym 5 min bei 85°C inaktiviert, der Reaktionsansatz mit 1 µl RNaseH versetzt und weitere 20 min bei 37°C inkubiert, so dass dann nur noch die einzelsträngige cDNA vorlag. Daran anschließend wurden 4 µl des Ansatzes in einer PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

5.1.3 Größenauftrennung von DNA mittels DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente (in 1x DNA-Probenpuffer) wurden ihrer Größe entsprechend in 0,7-2,5 %igen Agarosegelen mit 1x TAE als Laufpuffer elektrophoretisch bei 80-120 V in Horizontal-Elektrophoresekammern aufgetrennt. Die Gele enthielten 0,25 µg/ml Ethidiumbromid und wurden in 1x TAE angesetzt. Das Auftragsvolumen variierte zwischen 10 µl (analytisch) und 50-100 µl (präparativ). Die Dokumentation erfolgte über Visualisierung der DNA-Banden mit UV-Licht. Analytische Gele wurden fotografiert, bei präparativen Gelen wurden die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten.

5.1.4 Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mittels UV-Licht detektiert, die Banden mit einem Skalpell sauber ausgeschnitten und mit dem auf Glasmilch beruhenden System QIAEXII (*Qiagen*) den Herstellerangaben entsprechend aus dem Agarosegel gelöst. Die DNA wurde mit 20-30 µl H₂O eluiert.

5.1.5 Restriktionsverdau von DNA

DNA wurde je nach Enzym entsprechend den Herstellerangaben in dem geeigneten Puffer verdaut. Das Ansatzvolumen betrug 10 µl (analytisch) beziehungsweise 50 µl (präparativ). Die Menge des benötigten Enzyms berechnete sich aus folgender Faustregel:

$$\frac{\text{Enzymeinheit in U}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{\text{Länge } \lambda\text{-DNA(48850bp)}}{\text{Länge der Proben-DNA}} \times \frac{\text{Anzahl Enzymschnittstellen in Proben-DNA}}{\text{Anzahl Enzymschnittstellen in } \lambda\text{-DNA}}$$

Die Inkubation erfolgte üblicherweise 1,5 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur. PCR-Fragmente wurden auf Grund schlechterer Restriktionseffizienz ca. 2 h inkubiert. Die Restriktionsverdau wurden durch Hitzeinaktivierung für 10 min bei 65°C, Phenol/Chloroform-Extraktion oder durch Zugabe von einem Zehntel des Gesamtvolumens an 10x DNA-Probenpuffer abgestoppt.

5.1.6 Klenow-Reaktion

Für das Auffüllen beziehungsweise Entfernen überhängender, klebriger Enden (*sticky ends*) an DNA-Fragmenten wurde das Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I ohne die N-terminale 5'→3'-Exonuklease) verwendet. Der Reaktionsansatz bestand aus 14 µl DNA-Lösung (in H₂O), 1 µl 10x Klenow-Puffer, 2 µl 0,5 M dNTP-Lösung, 1 µl H₂O und 2 µl Klenow-Fragment. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 30°C. Die Reaktion wurde mit 2,5 µl 0,2 M EDTA-Lösung abgestoppt.

5.1.7 Dephosphorylierung von DNA

Linearisierte Vektoren wurden mit der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIAP) dephosphoryliert, wobei für den Reaktionsansatz 26,5 µl linearisiertes Plasmid in H₂O, 3 µl 10x CIAP-Puffer und 0,5 µl CIAP zusammengegeben wurden. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37°C, die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl 10x DNA-Probenpuffer oder Phenol/Chloroform-Extraktion abgestoppt.

5.1.8 Phosphorylierung von DNA

PCR-Fragmente, die nicht mit einem Restriktionsenzym behandelt wurden, sondern direkt einer PCR mit der PfuUltraTM *High-Fidelity DNA* Polymerase entstammten, mussten vor der Ligation phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung erfolgte mit der Polynukleotidkinase (PNK) in folgendem Ansatz: 25 µl DNA-Lösung, 3 µl 10x PNK-Puffer, 1,5 µl 1 mM ATP und 0,5 µl PNK. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 3 µl 0,2 M EDTA abgestoppt.

5.1.9 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um kurze komplementäre DNA-Fragmente zu hybridisieren, wurden je 50 ng/µl Oligonukleotide und 100 mM KCl in 200 µl H₂O in einem siedend heißen Wasserbad bis zur Abkühlung auf RT inkubiert (ca. 2-3 h). Anschließend wurde die DNA durch eine Ethanol-fällung präzipitiert.

5.1.10 Phenol/Chloroform-Extraktion

Proteine wurden aus einer DNA-Lösung mit Hilfe einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohollösung extrahiert. Dazu wurde die Probe mit dem einfachen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, ca. 1 min auf dem Vortexer gemischt und anschließend bei 20000 g und RT für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand ebenso mit dem einfachen Volumen Chloroform extrahiert. Aus dem daraus resultierenden Überstand wurde die DNA mittels Isopropanolfällung oder Ethanol-fällung gewonnen.

5.1.11 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

5.1.11.1 Isopropanolfällung

Die DNA-Lösung wurde mit dem 0,7fachen Volumen Isopropanol versetzt, ca. 1 h unter ständigem Invertieren bei RT inkubiert und 15 min bei 20000 g und RT zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das DNA-Präzipitat in 1 ml 70 %igem Ethanol resuspendiert und wie oben 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Präzipitat ca. 5 min an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in H₂O gelöst.

5.1.11.2 Ethanol-fällung

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1fachem Volumen 3 M NaAc-Lösung, pH 5,3 und 2,5fachem Volumen Ethanol versetzt, kurz auf dem Vortexer gemischt und dann 20 min bei RT und 20000 g abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde wie oben mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in H₂O gelöst.

5.1.12 Ligation eines DNA-Fragments in ein DNA-Plasmid

Bei der Ligation klebriger Enden (*sticky-end-Ligation*) wurden das Plasmid und das Fragment mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut und das Plasmid dephosphoryliert.

Bei der Ligation stumpfer Enden (*blunt-end-Ligation*) wurden das linearisierte Plasmid und das Fragment gegebenenfalls mit Klenow-Fragment aufgefüllt, das Plasmid dephosphoryliert und das Fragment gegebenenfalls phosphoryliert. Es wurden 10 µl Fragment, 2,5 µl Plasmid, 1,5 µl 10x T4-Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase 3 h (klebrige Enden) beziehungsweise 8 h (stumpfe Enden) bei 14°C inkubiert und anschließend in transformationskompetente Bakterienzellen transformiert.

5.1.13 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

5.1.13.1 Ultra-kompetente (chemokompetente) Bakterien

Die Aufarbeitung erfolgte im Wesentlichen nach Inoue et al., 1990. Eine Bakterienkolonie wurde über Nacht bei 37°C und 180 rpm in 3 ml LB-Medium inkubiert. 200 µl dieser Kultur wurden am nächsten Abend in 250 ml SOB-Medium überimpft und bei RT und 180 rpm über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von 0,6 inkubiert. Die Bakterien wurden sofort 10 min auf Eis gelagert und anschließend bei 2500 g und 0°C für 10 min abzentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 80 ml eiskaltem, sterilen TB (*Transformation Buffer*) luftblasenfrei resuspendiert, erneut wie oben 10 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem TB vorsichtig resuspendiert und mit 1,5 ml DMSO (Endkonzentration 7 %) versetzt. Die Bakteriensuspension wurde als 200µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Nach der zweiten Übernachtinkubation erfolgten alle Arbeiten auf Eis und im Kühlraum.

5.1.13.2 Elektroporationskompetente Bakterien

Eine Bakterienkolonie wurde über Nacht in 2,5 ml LB-Medium bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Kultur wurde in 250 ml vorgewärmtes SOB-Medium überimpft und bei 37°C und 180 rpm ca. 2-3 h bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5-0,6 inkubiert. Die Bakterienkultur wurde dann sofort 30 min auf Eis gelagert und 10 min bei 2000 g und 0°C zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde vorsichtig in 250 ml eiskaltem 1 mM Hepes resuspendiert, wie oben zentrifugiert und erneut in 125 ml 1 mM Hepes resuspendiert. Die Suspension wurde wie oben zentrifugiert. Anschließend wurde das Bakteriensediment in 15 ml Glycerinlösung resuspendiert, 15 min bei 2000 g und 0°C zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Diesen Vorgang wurde mit 10 ml Glycerinlösung wiederholt. Die Bakterien wurden dann vorsichtig in 1 ml Glycerinlösung resuspendiert, als 45µl-Aliquots in einem Trockeneis/Ethanolgemisch schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Nach der zweiten 37°C-Inkubation erfolgten alle Arbeiten auf Eis und im Kühlraum.

5.1.14 Transformation von Bakterien

5.1.14.1 Transformation chemokompetenter Bakterien

Für die Retransformation eines Plasmids waren zwischen 10 ng (XL1-Blue-Bakterien) und 1 µg (BL21-Bakterien und M15) DNA ausreichend, Ligationsansätze wurden komplett eingesetzt. Chemokompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, davon jeweils 100 µl auf die Plasmid-DNA

beziehungsweise den Ligationsansatz pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten 90 sec Hitzeschock bei 42°C. Die Bakterien wurden dann sofort für 1-2 min auf Eis inkubiert, mit 1ml LB-Medium versetzt und 40 min bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 30 sec bei 20000g und RT abzentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 100 µl abgenommen. Die Bakterien wurden im Restmedium resuspendiert, auf LB-Agarplatten, die mit Antibiotika zur Selektion transformationspositiver Klone versetzt worden waren, ausgestrichen und über Kopf stehend ca. 12-16 h bei 37°C inkubiert.

5.1.14.2 Transformation elektrokompeter Bakterien

Ligationsansätze wurden vor der Elektroporation mit Isopropanol gefällt und in möglichst wenig (1-2 µl) H₂O resuspendiert, Plasmid-DNA wurde in einer Konzentration von 1-100 ng (ebenfalls nur höchstens 2 µl Volumen) eingesetzt. DNA, die aus Hefe aufgereinigt worden war, wurde vollständig für die Elektroporation verwendet. Die DNA wurde mit 40 µl auf Eis aufgetauter Bakteriensuspension versetzt, in die 30 min auf 0°C vorgekühlte Elektroporationsküvette gefüllt und mit einem *Biorad Genepulser* mit den Einstellungen: 200 µΩ, 25 µF, 1,66 kV elektroporiert. Sofort danach wurde 1 ml LB-Medium auf den Elektroporationsansatz gegeben und die Bakterien 1 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Weiterbehandlung erfolgte wie oben.

5.1.15 Plasmidisolierung aus Bakterien

5.1.15.1 Plasmidaufarbeitung im kleinen Maßstab

Von einer Ligations- oder Retransformationsagaroseplatte wurden einzelne Klone gepickt und in 2 ml (Übertagkulturen, 6-8 h) beziehungsweise 5 ml (Übernachtulturen, 12-16 h) LB-Medium mit den dem Plasmid entsprechenden Antibiotikazusätzen bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach zwei unterschiedlichen Protokollen:

5.1.15.1.1 Aufarbeitung mittels NaOH/SDS-Lyse

Im Standardprotokoll wurden 1,5 ml der Bakterienkultur in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, 30 sec bei 20000 g und RT zentrifugiert und mit dem Vortexer in 200 µl mit RNase versetzter Lösung P1 (*Qiagen*) resuspendiert. Dann wurde 200 µl Lösung P2 (*Qiagen*) dazugegeben, durch vorsichtiges Umschwenken gemischt und maximal 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 200 µl eisgekühlter Lösung P3 (*Qiagen*) und vorsichtiges Mischen die genomische DNA gefällt. Diese wurde dann 10 min bei 20000 g und RT abzentrifugiert. Die DNA wurde aus dem resultierenden Überstand durch Isopropanolfällung präzipitiert und in 10-50 µl H₂O durch 10-minütige Inkubation bei 40°C gelöst.

5.1.15.1.2 Aufarbeitung mittels Ionenaustauscher-Säule

Die Aufarbeitung der positiven Klone des Hefe Zwei-Hybrid-Screens erfolgte mit dem *NucleoSpin-Plasmid-Kit* (*Macherey-Nagel*) nach Herstellerangaben. Für die Elution der DNA wurden 50 µl AE-Puffer verwendet.

5.1.15.2 Plasmidaufarbeitung im großen Maßstab mittels Ionenaustauscher-Säule

Zwischen 50 und 100 ml einer Übernachtkultur wurden mit Hilfe des *NucleoBond PC 100 Kits* (*Macherey-Nagel*) beziehungsweise des Plasmid Midi Kits (*Qiagen*) nach Herstellerangaben mit folgenden Modifikationen aufgereinigt: Die Bakterienkultur wurde zu Beginn 10 min bei 3000 g und 4°C abzentrifugiert. Nach der Aufarbeitung der Bakterien mit den Puffern S1-3 (*Macherey-Nagel*)

beziehungsweise P1-3 (*Qiagen*) wurden die Suspension ohne Zentrifugation direkt durch einen Papierfaltenfilter filtriert und auf die Säule gegeben. Nach der Elution aus der Säule und Zugabe von Isopropanol wurde die DNA 1 h bei RT unter ständigem Invertieren präzipitiert. Dann wurde die DNA-Suspension 45 min bei 5000 g und RT zentrifugiert, das Präzipitat in 1 ml 70 % Ethanol resuspendiert, die Suspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 5 min bei 20000 g und RT zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde 5 min bei RT getrocknet und in 50 µl H₂O ca. 30 min bei 37°C gelöst. Die DNA wurde dann bei -20°C gelagert.

5.1.16 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung wurde photometrisch über die Absorption bei 260 nm gemessen. Als Maß für die Reinheit der Lösung wurde die Ratio $\text{Absorption}_{260\text{nm}}/\text{Absorption}_{280\text{nm}}$ bestimmt. Sie sollte für DNA zwischen 1,8 und 2 liegen und für RNA größer oder gleich 2 sein. Als Faustregel gilt: 1 OD_{260nm} (optische Dichte bei 260 nm) entspricht 50 ng/µl DNA beziehungsweise 40 ng/µl RNA. Als weitere Qualitätskontrolle für die im Translationsassay eingesetzte RNA wurde ein Nukleinsäurespektrum (Absorption von 200 bis 340 nm) aufgenommen. Dieses sollte ein deutliches Maximum bei 260 nm haben und ansonsten wenige Schwankungen aufweisen.

5.1.17 DNA-Sequenzierung

Sämtliche über PCR generierte Klonierungen wurden durch Sequenzierung nach der Sanger-Methode (Sanger und Coulson, 1975) überprüft und bestätigt. Die Sequenzierungen wurden von Dr. W. Kullmann und Mitarbeitern (DNA-Sequenzierungseinheit des ZMNH) beziehungsweise der Firma *Invitek* (Berlin) durchgeführt.

5.1.18 *In vitro* Transkription von RNA

Die *in vitro* Transkription wurde je nach Vektor mit T7- oder Sp6-Polymerase durchgeführt. Für quantitative Transkription *gcapter* RNA wurde das *Megascript Sp6-Kit* (*Ambion*) beziehungsweise *Riboprobe Combination System T7/Sp6* (*Promega*) verwendet. Für radioaktiv markierte RNA wurde ebenfalls das *Riboprobe Combination System T7/Sp6* (*Promega*) eingesetzt. Als *Template* wurden 1-5 µg linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Die Linearisierung erfolgte über Nacht in einem 100 µl Ansatz. Um die Vollständigkeit der Restriktion zu überprüfen, wurde 1 µl des Ansatzes auf einem DNA-Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend zweimal mit 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Dann wurde die DNA mit 10 µl, 3 M NaAc pH 5,2, 5 µl Glykogenlösung und 250 µl 100 % Ethanol 5 min bei RT gefällt, 5 min bei 12000 g und RT zentrifugiert, in 1 ml 70 % Ethanol resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Die DNA wurde maximal 5 min bei RT getrocknet und dann in 10 µl H₂O, das direkt der *Millipore*-Anlage entnommen wurde, resuspendiert.

5.1.18.1 Quantitative Transkription *gcapter* mRNA

5.1.18.1.1 Sp6-Transkription

Eine quantitative Sp6-Transkription wurde mit dem *Megascript Sp6-Kit* durchgeführt und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: Je 2 µl ATP, CTP, UTP (50 mM), 2 µl GTP (16,7 mM), 3 µl

GpppG (40 mM), 2 µl 10x *Transcription buffer*, 5 µl DNA-*Template* (1 µg/µl, linearisiert) und 2 µl Enzymmix. Die Inkubation erfolgte 4 h bei 37°C. Dann wurde die RNA mit 10 µl LiCl-Lösung (Komponente des Kits) 45 min bei -20°C gefällt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 20000 g und 4°C wurde das RNA-Sediment mit 1 ml 70 %igem Ethanol versetzt, durchmischt und 5 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Die RNA wurde ca. 5-10 min an der Luft getrocknet und in 10 µl frischem H₂O resuspendiert.

5.1.18.1.2 T7-Transkription

Eine quantitative T7-Transkription wurde mit dem *Riboprobe Combination System T7/Sp6* durchgeführt und setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 20 µl *Transcription Optimized Buffer*, 10 µl 100 mM DTT, 2,5 µl RNasin (40 u/µl), je 5 µl ATP, UTP, CTP (10 mM) und GTP (1 mM), 1,25µl GpppG (40 mM), 5 µl DNA-*Template* (1 µg/µl, linearisiert), 38,5 µl H₂O und 2,75 µl T7-Polymerase. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert, dann wurden weitere 2,75 µl Polymerase dazugegeben und noch einmal 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wie oben mit LiCl gefällt.

5.1.18.2 Herstellung ³⁵S-markierter mRNA

Zur radioaktiven Markierung von RNA wurde das *Riboprobe-Kit* in folgendem Ansatz benutzt: 4 µl 5x *Transcription buffer*, 2 µl 100 mM DTT, je 1 µl ATP, GTP, CTP (10 mM), 1 µl *Template* (~ 1 µg), 8µl α[³⁵S]UTP und 2 µl Polymerase (T7 oder Sp6), mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37°C inkubiert, mit 80 µl 1 mM DTT versetzt und mit *Mini Quick Spin DNA Columns* (Roche) nach Herstellerangaben von ungebundenen Nukleotiden befreit. Anschließend wurde die RNA mit 200 µl 100 % Ethanol für 10 sec auf Trockeneis gefällt und 15 min bei 20000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Präzipitat noch einmal 1 min bei 20000 g und RT zentrifugiert. Dann wurde der Überstand vollständig entfernt und die RNA 20 min bei 37°C trocknen gelassen. Die RNA wurde entweder in 10 µl 0,5 mM DTT aufgenommen (für die Analyse des Translationsinitiationskomplexes) oder nach einer 20minütigen Inkubation bei RT in 40 µl 1 M DTT mit 400 µl Hybridisierungslösung versetzt (für *in situ* Hybridisierung). In beiden Fällen wurde die Radioaktivität von 1 µl Sonde im Szintillationszähler quantifiziert. Für die *in situ* Hybridisierung wurde die Sonde gegebenenfalls noch 1:10 oder 1:20 in Hybridisierungslösung und 5 mM DTT verdünnt. Der Hybridisierungsmix wurde bis zur Verwendung (am gleichen Tag) bei 55°C gelagert.

Folgende Kombinationen von Restriktionsenzym zur Linearisierung des *Template*-Plasmides mit SP6/T7-RNA-Polymerase wurden für die Generierung von *Sense*- (für den Translationsassay, als Negativkontrolle der *in situ* Hybridisierung und für den RNA-*Pulldown*) beziehungsweise *Antisense*-Transkripten (für die *in situ* Hybridisierung) verwendet:

| Plasmid | Restriktion | RNA-Polymerase | Orientierung | Verwendung |
|----------------|-------------|----------------|------------------|--|
| pSport1-Arg3.1 | Not1 | T7-Polymerase | <i>sense</i> | Translationsassay <i>in situ</i> Hybridisierung RNA- <i>Pulldown</i> |
| pSport1-Arg3.1 | Sall | Sp6-Polymerase | <i>antisense</i> | <i>in situ</i> Hybridisierung |
| pSport1-GRF1 | BamH1 | T7-Polymerase | <i>sense</i> | <i>in situ</i> Hybridisierung |
| pSport1-GRF1 | Kpn1 | Sp6-Polymerase | <i>antisense</i> | <i>in situ</i> Hybridisierung |
| pSport1-GAPDH | Kpn1 | Sp6-Polymerase | <i>sense</i> | RNA- <i>Pulldown</i> |

5.1.19 Größenauffrennung von RNA in Formamid-Agarosegelen

RNA-Proben wurden mit dreifachem Volumen RNA-Probenpuffer versetzt, 15 min bei 65°C inkubiert, 1 min bei 20000 g und RT abzentrifugiert, mit 1 µl 10x DNA-Probenpuffer vermischt und sofort auf Eis gelagert. Sie wurden auf 1-2 %ige Agarosegele (1x MOPS-Puffer, 15 % Formaldehyd) aufgetragen und in 1x MOPS-Puffer bei 100 Volt in Horizontal-Elektrophoresekammern aufgetrennt. Anschließend wurden die RNA-Banden mit UV-Licht visualisiert.

5.1.20 Fällung von RNA aus wässrigen Lösungen

5.1.20.1 Isopropanolfällung

Die Fällung von RNA mit Isopropanol erfolgte analog zur DNA-Fällung.

5.1.20.2 Ethanolfällung

100 µl RNA-Lösung wurden mit 238 µl H₂O und 13 µl Ammoniumsulfatlösung versetzt, sofort 20 min bei 20000 g und RT zentrifugiert und anschließend mit 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach kurzem Trocknen wurde die RNA in H₂O resuspendiert. Die RNA wurde für 1-2 Monate bei -20°C, für längere Zeiträume bei -80°C gelagert.

5.2 Klonierungen

Sämtliche für die Klonierung verwendeten Primer sind unter Angabe der eingefügten Restriktionssequenzen in Kapitel 6.3 aufgelistet, die verwendeten Vektoren, falls nicht näher bezeichnet, sind unter Kapitel 6.2 aufgeführt.

5.2.1 Klonierung der Zinkfingerdeletionskonstrukte für das Tri-Hybrid-System

Zur Klonierung der Konstrukte ZF1- bis ZF14 wurde die cDNA der Zinkfinger über die Primer *zfalle* und *z2* aus dem Plasmid *pcrII-ZinkiSV1* amplifiziert und der PCR-Ansatz über Phenol/Chloroform-Extraktion und Isopropanolfällung aufgereinigt. Die cDNAs wurden anschließend über die primerspezifischen Restriktionsenzyme in den Vektor *pACTII* ligiert, über Restriktionsanalysen anhand ihrer Länge identifiziert und mittels Sequenzierung verifiziert. Es konnten die Konstrukte ZF1-, ZF3-, ZF4-, ZF5-, ZF6-, ZF7-, ZF8-, ZF10-, ZF11-, ZF12-, ZF13- und ZF14 kloniert werden. Das Konstrukt ZF7-9 wurde mittels der Primer *zfalle* und *zf9re* über PCR aus dem Konstrukt ZF7- amplifiziert und mit Hilfe der primerspezifischen Restriktionsenzyme in den *pACTII*-Vektor ligiert.

5.2.2 Klonierung der GST-Fusionsproteine von Zinki für den *in vitro* Translationsassay und den GST-Pulldown

Zur Herstellung der GST-Fusionsproteine von Zinki wurden die cDNAs der Zinki-Domänen bis auf die vierzehn Zinkfinger aus den entsprechenden *pAS2*-Vektoren (*pAS2-Zg*, *pAS2-ZN*, *pAS2-KRAB*, *pAS2-ZL*; s. Kap. 5.2.4) mittels der Restriktionsenzyme *BamH1* und *Sal1* in den ebenso

restriktionsverdauten und dephosphorylierten Vektor pGEX-KG umkloniert (pGEX-KG-Zinki, pGEX-KG-ZN, pGEX-KG-KRAB, pGEX-KG-ZL). Lediglich die cDNA der vierzehn Zinkfinger wurde über die Restriktionsenzyme NcoI und SacI aus dem Plasmid ZF1- (in pACTII) isoliert und in den ebenso restriktionsverdauten und dephosphorylierten Vektor pGEX-KG ligiert (pGEX-KG-ZF14). Auf diese Weise lagen die Zinki-kodierende Sequenzen im richtigen Leserahmen zur GST-Domäne. Die Expression und Aufreinigung der Proteine erfolgte wie in Kapitel 5.5.9 beschrieben.

5.2.3 Klonierung des GST-S5a-Konstrukts für den *Pulldown* poly-ubiquitinerter Proteine

Die cDNA der kodierenden Sequenz des Proteins S5a wurde über die sequenzspezifischen Primer *s5afor* und *s5arev* aus einer Mausnieren-cDNA (zu Verfügung gestellt von Dr. Arne Engelsberg in unserem Labor) mittels PCR im richtigen Leserahmen amplifiziert und mit Hilfe der primerspezifischen Restriktionsenzyme in den Vektor pGEX-KG kloniert (GST-S5a). Die Expression und Aufreinigung des Proteins erfolgte wie in Kapitel 5.5.9 beschrieben.

5.2.4 Klonierung der Zinki-Konstrukte für das Zwei-Hybrid-System

Für die Klonierung des vollständigen Zinki-Proteins als Köder für einen *Zwei-Hybrid-Screen* wurde die cDNA der kodierenden Sequenz von Zinki mit den Primern *z1b* und *z2* aus dem Plasmid pcrII-ZinkiSV1 amplifiziert und mit Hilfe der primerspezifischen Restriktionsenzymen in pAS2 ligiert (pAS2-Zg). Die Klonierung des N-Terminus von Zinki als Köder für den *Zwei-Hybrid-Screen* erfolgte über die Amplifikation der cDNA des N-Terminus von Zinki (Nukleotide 1596-1790) mit den Primern *z1b* und *z12* aus dem Plasmid pcrII-ZinkiSV1. Anschließend wurde die cDNA über die primerspezifischen Restriktionsenzyme in den richtigen Leserahmen des pAS2-Vektors einkloniert (pAS2-ZN). Für den Versuch, die GRF1-Bindungsdomäne von Zinki zu bestimmen, wurden die 33 Nukleotide der KRAB-Domäne über Hybridisierung der Primer *z1b* und *zkr* und anschließendem Auffüllen der 5'-Überhänge beziehungsweise Entfernen der 3'-Überhänge mit Klenow-Fragment generiert. Dann wurde die cDNA mit den primerspezifischen Restriktionsenzymen verdaut und in den ebenso restriktionsverdauten und dephosphorylierten pAS2-Vektor kloniert (pAS2-KRAB). Die 162 Nukleotide lange Linkerregion von Zinki dagegen wurde mit den Primern *z11* und *z12* über PCR amplifiziert und mit Hilfe der primerspezifischen Restriktionsenzyme ebenfalls in den Vektor pAS2 ligiert (pAS2-ZL).

5.2.5 Klonierung der GRF1-Konstrukte für das Zwei-Hybrid-System

Die Plasmide zur Eingrenzung der Zinki-Bindungsdomäne von GRF1 im *Zwei-Hybrid-System* wurden alle über PCR aus dem kürzesten im *Screen* isolierten GRF1-Klon amplifiziert (Klon Nr. 48) und mit Hilfe der primerspezifischen Restriktionsenzyme in den ebenso restriktionsverdauten und dephosphorylierten Vektor pACTII kloniert. Die cDNA des Konstrukts G1 wurde über die Primer *g1fa* und *g1fb* amplifiziert, die cDNA von G2 über *g2f* und *g2r* und die cDNA von G3 über *g3f* und *g3r*. Die 72 Nukleotide für das Plasmid pACTII-GK wurden ebenfalls über PCR mit den Primern *grfk*

und *g3r* amplifiziert. Die Deletion der drei C-terminalen Aminosäuren von GRF1 für das Konstrukt pACTII-Gdel erfolgte über eine PCR mit den Primern *g1fa* und *gmut*. Auch diese cDNAs wurden mit Hilfe der primerspezifischen Restriktionsenzyme in den pACTII-Vektor einkloniert.

5.2.6 Klonierung des offenen Leserahmens von GRF1

Die Nukleotide 50-3804 der cDNA von GRF1 (*Accession*-Nr. X67241.1), die die vollständige kodierende Sequenz und 20 Nukleotide der 5'UTR umspannen, wurden über eine zweistufige PCR amplifiziert. Das geschah zunächst über zwei getrennte PCRs, wobei zum einen der N-terminale Teil (Nukleotide 50-1957, Primer *gfor1* und *grfB*) und zum anderen der C-terminale Teil (Nukleotide 1935-3804, Primer *grfA* und *ggrev*) der cDNA aus einer hippokampalen Ratten-cDNA-Bank (pACTII-libIII) amplifiziert wurden. Die beiden um 25 Nukleotide überlappenden Amplifikate wurden als *Template* in einer SOE-PCR (Ho et al., 1989; Horton et al., 1989) zur Generierung des gesamten Konstrukts mit den Primern *gfor1* und *ggrev* eingesetzt. Für diese PCR wurde die PfuUltraTM-Polymerase verwendet, um Mutationen zu vermeiden. Die daraus resultierende GRF1-cDNA wurde dann über die primerspezifischen Restriktionsenzyme in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Das resultierende Plasmid pcDNA3.1-GRF1 enthielt die endogene Kozaksequenz von GRF1 (10 Nukleotide vor dem Startcodon), so dass seine Translation in eukaryotischen Zellen gewährleistet wurde (Kozak, 1987).

5.2.7 Klonierung des His₆-Zinki-Fusionsproteins für den His₆-Pulldown

Die cDNA des für den His₆-Pulldown verwendeten Plasmids pQE30-Zg wurde über die Primer *zpfor* und *zpgrev* aus dem Plasmid pcrII-ZinkiSV1 amplifiziert und mit Hilfe der primerspezifischen Restriktionsenzyme in den Vektor pQE30 ligiert. Es beinhaltete die vollständige kodierende Sequenz von Zinki, die im richtigen Leserahmen zu den sechs Histidinen des pQE30-Vektors exprimiert wurde. Die Expression und Aufreinigung des Proteins erfolgte wie in Kapitel 5.5.9 beschrieben.

5.2.8 Klonierung der GST-Fusionsproteine von GRF1 für den GST-Pulldown

Für die Klonierung der GST-Fusionsproteine von GRF1 wurden die cDNAs durch Restriktionsverdau mit den Enzymen NcoI und SacI aus dem kürzesten im Zwei-Hybrid-Screen identifizierten Klon Nr. 48 beziehungsweise dem Zwei-Hybrid-Plasmid pACTII-GK isoliert und in den ebenso restriktionsverdauten und dephosphorylierten Vektor pGEX-KG einkloniert. Auf diese Weise lag die GRF1-kodierende Sequenz im richtigen Leserahmen zur GST-Domäne. Die Expression und Aufreinigung der Proteine erfolgte wie in Kapitel 5.5.9 beschrieben.

5.2.9 Klonierung der Konstrukte für die *in vitro* Transkription

Der Vektor pSport-GAPDH für die Herstellung der GAPDH-RNA als Kontrolle im RNA-Pulldown wurde über Amplifikation der GAPDH-cDNA mittels PfuUltraTM-Polymerase aus einer hippokampalen Ratten-cDNA-Bank (pACTII-libIII) mit den Primern *egapfor* und *egaprev*, anschließender Phosphorylierung der Fragmente mit PNK und Ligation in den SmaI-verdauten und dephosphorylierten Vektor pSport2 kloniert. Die Klonierung des Vektors pSport-GRF1 zur Herstellung der GRF1-Sonden für die *in situ* Hybridisierung erfolgte durch die Isolation der GRF1-

cDNA aus dem Plasmid pcDNA3-GRF1 (s. Kap. 5.2.6) über die internen EcoRI-Restriktionsschnittstellen (Nukleotide 1946-3164). Die GRF1-cDNA wurde dann in den ebenso restriktionsverdauten und dephosphorylierten Vektor pSport2 einkloniert und die Orientierung des PCR-Fragmentes über Restriktionsanalysen und Sequenzierung überprüft.

5.3 Sequenzanalysen

Sämtliche verwendete Computerprogramme sind unter Angabe der Internetadresse und der entsprechenden Referenzen unter Kapitel 6.13 aufgeführt.

5.3.1 Analyse von Aminosäuresequenzen

Die Aminosäuresequenzen der vierzehn Zinkfinger von Zinki wurden zunächst mit dem *multiple alignment* Programm CLUSTAL W abgeglichen. Der genauere Abgleich erfolgte mit dem Computerprogramm BLAST *Align Two Sequences*, wobei der Analyse die Substitutionsmatrix BLOSUM62 (Henikoff und Henikoff, 1992) zugrunde gelegt wurde.

Die Analyse der Zinki-Sequenz hinsichtlich potentieller Kernlokalisierungssignale wurde mit dem Computerprogramm *PredictNLS server* durchgeführt.

Die Analyse der Proteindomänenstruktur von GRF1 erfolgte mit dem Computerprogramm Pfam 11.0.

5.3.2 Analyse von DNA-Sequenzen

Die DNA-Sequenzen, die der Sequenzierung der positiven Klone des Zwei-Hybrid-Screens entstammten, wurden mit dem Computerprogramm BLASTN 2.2.7 analysiert, wobei der Analyse alle FASTA BLAST Datenbanken zugrunde gelegt wurden. Um über PCR amplifizierte DNA-Sequenzen zu überprüfen, wurden diese mit dem Computerprogramm BLAST *Align Two Sequences* mit der Originalsequenz verglichen. Dieses Programm wurde auch für den Sequenzabgleich der GRF1-Homologen aus Ratte und Mensch verwendet.

5.4 Hefe-Zwei-/Tri-Hybrid-Methoden

5.4.1 Transformation von Hefen

5.4.1.1 Übernachtkulturen

Für eine Übernachtkultur wurden ca. 3 bis 4 Kolonien des gewünschten Hefeklons in 5 ml Medium in einem sterilen Reagenzglas (*Small-Scale-Transformation*), beziehungsweise ca. 10 Kolonien in 100 ml Medium in einem sterilen 250 ml-Erlenmeyerkolben (*Zwei-Hybrid-Screen*) bei 190 rpm und 30°C für ca. 12-16 h inkubiert. Das Kulturmedium wurde je nach Selektionsbedingungen gewählt: YPD-Medium für untransformierte Hefen, beziehungsweise *Selected-Dropout-Medium* mit den

entsprechenden Aminosäurezusätzen und Antibiotika für Hefen, die bereits ein Plasmid mit Selektionsmarker enthielten.

5.4.1.2 Zelltitrierbestimmung einer Hefekultur

Der Zelltiter einer Hefekultur wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dabei wurde üblicherweise eine 1:10-Verdünnung ausgezählt.

5.4.1.3 Simultane und sequentielle *Small-Scale-Transformation*

Für die Transformation von DNA in Hefen wurde eine 5-ml-Übernachtskultur mit auf 30°C vorgewärmtem YPD-Medium so verdünnt, dass 50 ml einer Hefekultur mit einem Zelltiter von 5×10^6 /ml entstanden. Dieser Ansatz wurde in einem sterilen 500-ml-Erlenmeyerkolben ca. 3-4 h bei 250 rpm und 30°C inkubiert, bis ein Zelltiter von 2×10^7 erreicht war (Phase des exponentiellen Wachstums). Die Hefezellen wurden bei 3000 g und 25°C 4 min zentrifugiert, das Sediment vorsichtig in 20 ml autoklaviertem H₂O resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Die sedimentierten Hefezellen wurden in 1 ml 100 mM LiAc aufgenommen, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 190 rpm und 30°C für 10 min inkubiert. Nach einer 5sekündigen Zentrifugation bei 5000 g und RT wurde der Überstand abgenommen, das Sediment in 350 µl 100 mM LiAc resuspendiert und auf 500 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Pro Transformationsansatz wurden 50 µl dieser Hefesuspension in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Folgende Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge auf das Hefensediment pipettiert: 240 µl PEG-Lösung (50 %), 36 µl 1 M LiAc, 25 µl *Carrier*-DNA (200 mg/ml Lachssperma-DNA) und 3-4 µg DNA (pro zu transformierendem Plasmid) in 45 µl H₂O. Der Transformationsansatz wurde mindestens 1 min mit einer Mikropipette unter Vermeidung von Luftblasen resuspendiert. Dann wurden die Hefen 30 min bei 30°C und 190 rpm und anschließend 20 min bei 42°C im Wasserbad oder Thermoblock inkubiert (Hitzeschock), wobei diese ca. alle 5 min invertiert wurden. Anschließend wurde unter oben genannten Bedingungen abzentrifugiert. Die sedimentierten Hefen wurden in 1 ml H₂O aufgenommen und davon 100 µl auf kleinen SD-WL-Platten (simultane Transformation mit zwei Plasmiden) beziehungsweise auf kleinen SD-W-Platten (sequentielle Transformation mit einem Plasmid) ausgestrichen. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet, um Austrocknen zu vermeiden, und verkehrt herum in den Brutschrank gestellt, damit eventuell entstehende Kondensflüssigkeit nicht auf die Hefekolonien, sondern auf den Deckel tropfen. Die Inkubation erfolgte für zwei bis vier Tage bei 30°C.

5.4.1.4 Zwei-Hybrid-Screen

Für den Zwei-Hybrid-Screen wurde eine 100-ml-Übernachtskultur (SD-W-Medium) von bereits mit dem Köderplasmid pAS2-ZN transformierten Hefen bei 2500 g und 25°C 4 min abzentrifugiert und das Sediment in 100 ml YPD-Medium aufgenommen (Zelltiter ca. 5×10^6 /ml). Nach ca. 4-5 h Inkubation bei 250 rpm und 30°C (Zelltiter ca. 2×10^7 /ml) wurde die Hefekultur wie bei der *Small-Scale-Transformation* abzentrifugiert und mit 20 ml H₂O gewaschen. Auf das Hefensediment wurden folgende Lösungen in angegebener Reihenfolge pipettiert: 4,8 ml 50 % (w/v) PEG-Lösung, 720 µl 1 M LiAc, 500 µl *Carrier*-DNA (200 mg/ml Lachssperma-DNA), 30 µl pACT2-libIII (50 µg) und 1020 µl H₂O. Der Ansatz wurde mindestens 1 min mit einer Mikropipette resuspendiert, 30 min bei 190 rpm

und 30°C inkubiert, dann 30 min einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad unterzogen, wobei alle 5 min invertiert wurde. Dann wurden die Hefen wie oben abzentrifugiert. Die sedimentierten Hefen wurden in 2250 µl H₂O resuspendiert und jeweils 150 µl der Hefesuspension auf insgesamt 15 15-cm-Agarplatten ohne die Aminosäuren Tryptophan (Selektion des Köderplasmides), Leucin (Selektion des Beuteplasmides) und Histidin (Selektion auf Interaktion der Proteine), versetzt mit 10 mM 3-Aminotriazol (Hemmer der Histidinbiosynthese, erhöht den Histidinselektionsdruck) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden mit Parafilm abgedichtet und 4-6 Tage bei 30°C auf dem Kopf stehend inkubiert. Außerdem wurden jeweils 1 µl, 5 µl und 10 µl der Hefesuspension mit H₂O auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und auf 9-cm-SD-WL-Platten ausgestrichen, um die Transformationsrate (Anzahl Kolonien pro µg DNA) zu bestimmen. Die Transformationsrate des *Screens* mit pAS2-ZN betrug $0,5 \times 10^6$ Klone/µg, das heißt es wurden ca. 25 Millionen verschiedene Klone generiert. Zur Erhöhung des Selektionsdruck wurden die nach vier Tagen gewachsenen Klone auf Agarplatten mit 30 mM 3-AT ausgestrichen und erneut bei 30°C inkubiert.

5.4.2 Proteininteraktionstests der transformierten Hefen

5.4.2.1 Histidin-Assay

Je drei Kolonien pro Platte wurden 2-3 Tage nach der Transformation strichförmig auf SD-WLH-Platten ausgestrichen, die gegebenenfalls zwischen 10 mM und 50 mM 3-AT enthielten. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet, bei 30°C verkehrt herum inkubiert und nach 2-4 Tagen auf Wachstum der Klone kontrolliert.

5.4.2.2 X-gal-Assay

Für diesen Test wurden die Hefen ebenfalls 2-3 Tage nach der Transformation strichförmig auf SD-WL-Platten ausgestrichen und 2 Tage wie üblich inkubiert. Für den X-gal-Assay (oder β-Galactosidase-Assay) wurde ein Gelblottingpapier in einer Petrischale (entsprechend der Größe der Hefepatte) mit ca. 5 ml X-gal-Lösung, bestehend aus 70 µl X-gal-Stocklösung in 5 ml Z-Puffer, getränkt, so dass das Papier gut durchnässt war. Um die Zellmembran der Hefen zu permeabilisieren, wurde für 30 sec eine kreisrund zugeschnittene, oben markierte Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,2 µm) auf die Hefepatte gelegt, anschließend zusammen mit den daran haftenden Kolonien mit einer Pinzette vorsichtig abgezogen und mit der Kolonien besetzten Seite nach oben in flüssigen Stickstoff gelegt, bis die Membran samt Hefen gefroren war. Nach kurzem Antauen der Membran bei RT wurde sie dann mit der Kolonien besetzten Seite nach oben auf das X-gal-getränkte Gelblottingpapier gelegt, die Petrischale mit Parafilm verschlossen und je nach Stärke der Blaufärbung 20 min bis 4 h bei 30°C inkubiert. Nach Erreichen einer zufrieden stellenden Blaufärbung wurden die Membranen an der Luft getrocknet, wobei sich die Blaufärbung noch verstärkte.

5.4.3 Cycloheximidgegen Selektion zur Plasmidisolation in Hefen

Das hier verwendete pAS2-Plasmid besitzt ein Gen, das Cycloheximidsensitivität vermittelt (*CYH2*). Der Hefestamm CG1945 ist cycloheximidresistent, d.h. erst wenn ein Hefeklon das *CYH2*-tragende Plasmid verliert, kann er auf cycloheximidhaltigem Medium wachsen. Dies bietet die Möglichkeit, das Köderplasmid aus doppelt transformierten Klonen eines Zwei-Hybrid-*Screens* zu eliminieren (Guthrie und Fink, 1991). Dazu wurde eine Hefekolonie in 200 µl H₂O resuspendiert und 100 µl davon auf SD-

LC-Platten ausgestrichen. Diese Agaroseplatten wurden wie oben 2-3 Tage inkubiert. Die gewachsenen Klone enthielten nur noch das pACTII-Plasmid.

5.4.4 Hefeverpaarung

Bei der Hefeverpaarung wurde aus zwei haploiden Hefestämmen mit unterschiedlichem Paarungstyp ein diploider Hefestamm generiert, der das Genom beider Stämme enthielt. Dazu wurden jeweils ein Klon der beiden Hefestämme zusammen in 500 µl YPD-Medium gut resuspendiert und für ca. 10-12 h bei 30°C und 190 rpm inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Suspension auf SD-WL-Platten ausgestrichen.

5.4.5 Plasmidisolierung aus Hefen

Um ein Plasmid aus Hefen zu isolieren, wurde jeweils eine große Kolonie in einer 5 ml-Übernachtskultur (Medium entsprechend dem Selektionsmarker auf dem zu isolierenden Plasmid) angeimpft. 3 ml dieser Kultur wurden bei 20000 g und RT 5 sec abzentrifugiert. Der Überstand wurde weitestgehend abgenommen und das Hefensediment mit Hilfe eines Vortexers resuspendiert. Dann wurden 200 µl Hefelysislösung darauf gegeben und die Suspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, in dem sich 0,3 g säuregewaschene Glasperlen zur Lyse der Zellen und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zur Extraktion der Proteine befanden. Nach zweiminütiger Inkubation auf einem Vortexer wurde wie oben zentrifugiert, die obere Phase abgenommen und mit Chloroform versetzt. Nach Behandlung wie oben (Vortexer, Zentrifugation) wurden zur oberen Phase 500 µl Ethanol und 10 µl 8 M Lithiumchloridlösung für die DNA-Fällung gegeben und 20 min bei -20°C inkubiert. Nach 10minütiger Zentrifugation (20000 g, RT) wurde der Überstand entfernt und das entstandene DNA-Präzipitat zweimal mit 500 µl eiskalter 70 %iger Ethanollösung gewaschen, indem es in der Ethanollösung resuspendiert, wie oben 5 sec zentrifugiert und der Überstand entfernt wurde. Nach der Trocknung wurde die DNA dann in 5 µl H₂O resuspendiert und vollständig für die Transformation in elektrokompetente HB101 Bakterien eingesetzt.

5.4.6 Herstellung und Auftauen von Hefeglycerinstocks

Hefeklone oder -stämme wurden längerfristig bei -80°C in glycerinhaltigem Medium aufbewahrt. Dazu wurden 5-6 frische Hefeklone in 1,225 ml 15 % Glycerin enthaltendem YPD-Medium resuspendiert und bei -80 °C in 2-ml-Kryogefäßen eingefroren. Um die Hefen wieder in Kultur zu bringen, wurde mit einer sterilen, vorne zugeschmolzenen Pasteurpipette ein kleiner Teil der eingefrorenen Suspension abgenommen und auf vorgewärmten YPD- beziehungsweise Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und mehrere Tage auf dem Kopf stehend bei 30°C inkubiert.

5.5 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

5.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden auf der Bradford-Methode basierend durchgeführt (Bradford, 1976). Zunächst wurde eine Eichgerade mit Hilfe eines BSA-Standards erstellt. Dazu wurden aufsteigende BSA-Konzentrationen von 0,5 µg/ml bis 5 µg/ml in PBS aus einer BSA-Stocklösung hergestellt und davon jeweils 100 µl mit 700 µl PBS und 200 µl *Brilliant Blue Reagenz* (Biorad) versetzt und kurz durchmischt. Nach ca. 2 min wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. In diesem Konzentrationsbereich ist das Verhältnis der Färbung zur Menge an BSA linear, daher konnte anhand der so generierten Eichgerade auf gleiche Weise die Konzentration der Proteinprobe bestimmt werden.

5.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mit Hilfe von diskontinuierlicher SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt (Lämmli, 1970). Es wurden Gelapparaturen des *Twin-Gel-Systems* von *Biometra* verwendet. Sammel- und Trenngel setzten sich wie folgt zusammen:

Sammelgel 5 % (3 ml):

| | |
|-------------------------|--------|
| H ₂ O | 2,1 ml |
| 30 % Acrylamidmix | 0,5 ml |
| 1,0 M Tris-HCl (pH 6,8) | 380 µl |
| 10 % SDS | 30 µl |
| 10 % Ammoniumpersulfat | 30 µl |
| TEMED | 3 µl |

Trenngel (10 ml):

| | <u>8 %</u> | <u>10 %</u> | <u>12 %</u> |
|------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| H ₂ O | 4,6 ml | 4,0 ml | 3,3 ml |
| 30 % Acrylamidmix | 2,7 ml | 3,3 ml | 4,0 ml |
| 1,5 M Tris-HCl (pH 8) | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |
| 10 % SDS | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| 10 % Ammoniumpersulfat | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| TEMED | 6 µl | 6 µl | 6 µl |

Je kleiner die aufzutrennenden Proteine, desto höherprozentig wurde das Trenngel gewählt. Temed und Ammoniumpersulfat wurden erst kurz Gießen des Gels dazugegeben. Die aufzutragenden Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1x), 5 min bei 95°C denaturiert, 1 min bei 20000 g und RT abzentrifugiert und einige Minuten auf Eis inkubiert. Nach Auftragen der Proben unter 1x SDS-Laufpuffer wurde zunächst ein Strom von etwa 15mA pro Gel angelegt, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Dann wurde der Stromfluss auf 30mA pro Gel erhöht. Anhand der vorgefärbten Banden des Protein-Größenstandards und der Farbstoffbanden des SDS-Probenpuffers konnte der Zeitpunkt, bei der die Größenauftrennung der Proteinbanden ausreichend war, bestimmt, die Elektrophorese abgestoppt und entweder über Coomassiefärbung, Autoradiographie oder Western Blot analysiert werden.

5.5.3 Analyse eines Proteingels mittels Autoradiographie

Mit radioaktiv markierten Proteinen beladene Proteingele wurden nach der Elektrophorese 5 min in Geltrocknungslösung geschwenkt und dann zwischen einem Gelblottingpapier und Frischhaltefolie 1,5

h bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Gel für mindestens 6 h auf einen *BioMax MR* Film exponiert.

5.5.4 Coomassiefärbung eines Proteingels

Der Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue R250* färbt Proteine unspezifisch blau an. Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel ca. 30 min in Coomassiefärbelösung und anschließend in Entfärbelösung bei RT solange inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden gut zu erkennen waren. Das Gel wurde 5 min in Geltrocknungslösung geschwenkt und dann zwischen einem Gelblottingpapier und Frischhaltefolie 1,5 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

5.5.5 Western Blot

Um Proteine mit spezifischen Antikörpern zu detektieren, wurden sie nach der Auftrennung über SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurde das Polyacrylamidgel nach Beendigung der Elektrophorese ebenso wie die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nitrocellulosemembran für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Dann wurden Gel und Nitrocellulosemembran zwischen vier Gelblottingpapieren und zwei Schwämmen eingespannt und in eine *Mini-Protean-Slab-Cell-Apparatur (Biorad)* eingebaut. Der Blottingvorgang lief entweder bei 100 V 1,5 h bei RT, wobei das Kühlaggregat in der Kammer nach 45 min ausgetauscht wurde, oder über Nacht bei 25-30 V und 4°C. Nach Beendigung des Blottingvorgangs wurde die Nitrocellulosemembran kurz mit Wasser gespült und 10 min mit Ponceau-S-Lösung angefärbt. Die Membran wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder in Frischhaltefolie gewickelt bei -20°C aufbewahrt.

5.5.6 Detektion eines Western Blots

Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran 1 h bei RT unter leichtem Schwenken in 10 % Magermilchlösung oder 1x Rotiblock inkubiert. Anschließend wurde ca. 10 min mit PBS-T gewaschen, wobei die Waschlösung insgesamt dreimal gewechselt wurde. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in möglichst kleinem Volumen (2-5 ml, die Membran wurde dazu in Gefrierfolie eingeschweißt). Die Verdünnung war antikörperspezifisch und erfolgte in PBS-T. Anschließend folgte ein einstündiger Waschschrift mit PBS-T, wobei die Waschlösung fünf- bis sechsmal gewechselt wurde. Der zweite Antikörper war peroxidasegekoppelt und erkannte spezifisch Ziege-, Maus- oder Kaninchen-IgG. Er wurde in PBS-T verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Beide Antikörperinkubationen erfolgten unter leichtem Schütteln. Nach Inkubation des zweiten Antikörpers wurde wieder ca. 1 h wie oben gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz nach Herstellerangaben. Die Expositionszeit des Films (*X-Omat blue* oder *Hyperfilm*) betrug zwischen 30 sec und 1h. Nach der Detektion wurde die Membran kurz in PBS-T gewaschen und in Frischhaltefolie bei -20°C aufbewahrt.

5.5.7 Entfernen der Erst- und Zweitantikörper eines bereits detektierten Western Blots

Um eine bereits detektierte Westernblotmembran nochmals mit den gleichen oder anderen Antikörpern zu detektieren, wurden die Erst- und Zweitantikörper folgendermaßen entfernt: Die Membran wurde in 50 ml Strippingpuffer mit 350 µl β-Mercaptoethanol in einem geschlossenen Gefäß zweimal 15 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert, wobei der Puffer einmal gewechselt wurde. Anschließend wurde die Membran zweimal 10 min mit ca. 100 ml Strippingpuffer ohne β-Mercaptoethanol und dreimal 10 min mit PBS-T gewaschen.

5.5.8 Densitometrische Auswertung detektierter Western Blots

Für die Analyse der relativen Bandenstärke detektierter Western Blots wurden die exponierten und entwickelten Filme am Computer eingescannt und mit Hilfe der des Computerprogramms TINA 2.09g (raytest) ausgewertet. Dazu wurde manuell ein Bereich festgelegt, in dem die Gesamtpixelintensität bestimmt wurde. Dieser Bereich hatte für alle Banden eines Western Blots die gleiche Größe. Für jede Spur wurde ein Hintergrundsignal außerhalb des Bandensignals festgelegt und vom Gesamtsignal der Bande abgezogen. Für die Quantifizierung des von GST-S5a präzipitierten Zinki-Proteins (Abb. 2.10) wurde die Signalintensität des Eluats eines *Pulldowns* jeweils gegen die Signalintensität des in diesem *Pulldown* verwendeten Lysats normalisiert (Werte s. Tab. 9.1.2). Für die Analyse der Hippokampuslysate (Abb. 2.11) wurden die so ermittelten Signalstärken von Zinki und Arg3.1 gegen die Signalstärke von GAPDH in der jeweiligen Spur normalisiert (Werte s. Tab. 9.1.3). Zur statistischen Auswertung der Signale wurden die drei Wertepaare mit Hilfe des Computerprogramms Excel einem gepaarten, einseitigen Student-t-Test unterzogen.

5.5.9 Proteinaufreinigung

Sämtliche für diese Experimente verwendeten Puffer enthielten 1x Proteaseinhibitor (*Complete EDTA free tablets*).

5.5.9.1 Expression rekombinanter Proteine in E.coli

Zur Proteinexpression wurden Plasmide, die GST-Fusionsproteine kodierte (pGEX-KG-Vektor), in den proteaseinhibierten E.coli-Stamm BL21 retransformiert. Plasmide für His₆-Proteine (pQE-Vektoren) wurden in den E.coli-Stamm M15 retransformiert. M15-Bakterien enthalten das Plasmid pRep4, das die Expression des rekombinanten Proteins ohne IPTG-Induktion verhindert.

5.5.9.1.1 Animpfen einer Bakterienkultur

Jeweils eine Kolonie der zur Proteinexpression benötigten Bakterien wurde in 5 ml (*Small-Scale*) bzw. 50 ml (*Large-Scale*) LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen angeimpft und über Nacht (12-16 h) bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

5.5.9.1.2 Induktion der Proteinexpression

Jeweils 1/5 der Übernachtskulturen wurden 1:50 mit LB-Medium plus Antibiotika verdünnt und 1,5 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Nach Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG wurden die Bakterien abhängig vom exprimierten Protein 3-5 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend

wurden die Zellen 10 min bei 4°C und 3000 g abzentrifugiert, vom Überstand befreit und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C (über Nacht) beziehungsweise -80°C (mehrere Tage) gelagert.

5.5.9.1.3 Test der Proteininduktion

Um den Erfolg der Proteininduktion zu überprüfen, wurde jeweils vor und nach der Induktion 1 ml Bakteriensuspension als Probe genommen, 1 min bei 20000 g und RT abzentrifugiert und das Sediment in 50-100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden dann mit SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

5.5.9.2 Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine aus E.coli

5.5.9.2.1 Bakterienlyse

Standardmethode

Die Bakterien wurden in 5 ml eiskaltem SET-Puffer auf Eis resuspendiert, 30 min mit 0,3 mg/ml Lysozym bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert und 6 x 10 sec sonifiziert (30 % *Max.Power*). Anschließend wurde der Zellschrott 30 min bei 10000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand entweder bei -80°C eingefroren oder weiterverarbeitet. Diese Methode wurde zur Aufreinigung aller GST-Fusionsproteine bis auf GST-Zinki angewandt.

Methode zur Lyse schwerlöslicher Proteine

Die Aufreinigung erfolgte im Wesentlichen nach einem Protokoll von Frangioni und Neel, 1993. Die Bakterien wurden in 10 ml eiskaltem SET-Puffer resuspendiert, anschließend 15 min auf Eis mit 100 µg/ml Lysozym inkubiert und dann mit 100 µl 1 M DTT und 1,4 ml 10 % Sarkosyllösung versetzt. Nach gründlichem Mischen wurde die Lösung insgesamt 6 x 10 sec auf Eis im Kühlraum sonifiziert (30 % *Max.Power*). Der Zellschrott wurde 20 min bei 30000 g und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand mit 4 ml 10 % Triton X-100-Lösung versetzt und mit SET auf 20 ml aufgefüllt. Nach 30minütiger Inkubation unter ständigem Invertieren bei 4°C konnte die Lösung entweder bei -80°C eingefroren oder weiterverarbeitet werden. Diese Methode wurde zur Aufreinigung von GST-Zinki angewandt.

5.5.9.2.2 Kopplung des Proteins an Glutathion-Sepharose

Vor Gebrauch wurde die Glutathion-Sepharose mit 1 ml SET-Puffer pro 500 µl Sepharose äquilibriert, d.h. resuspendiert, 15 sec bei 800 g und RT zentrifugiert und vom Überstand befreit. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wurde die Sepharose mit dem Proteinlysat 2 h unter ständigem Invertieren bei 4°C inkubiert. Dann wurde wie oben zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in 50 ml eiskaltem SET-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zunächst dreimal mit 50 ml SET-Puffer und anschließend fünfmal mit 1 ml SET-Puffer durchgeführt. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden 20 µl des an die Sepharose gekoppelten Proteins mit 20 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt und über SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Das an die Sepharose gekoppelte Protein wurde sofort weiterverarbeitet.

5.5.9.2.3 Elution des Proteins von der Glutathion-Sepharose

Um das aufgereinigte rekombinante Protein von der Sepharose zu eluieren, wurde die proteingekoppelte Sepharose 1 h bei 4°C mit 10 ml GST-Elutionspuffer inkubiert. Anschließend wurde das gelöste Protein über eine Säule mit Fritte (*Superflow Columns* von *Qiagen*) von der Sepharose befreit und mit SDS-PAGE analysiert. Für den *in vitro* Translationsassay wurden die eluierten Proteine über Nacht in 50 mM Hepes pH 7,4 dialysiert und anschließend durch Filtrationszentrifugation über *Centricons* aufkonzentriert.

5.5.9.3 Aufreinigung von His₆-rekombinanten Proteinen aus E.coli

Die Aufreinigung von His₆-Proteinen erfolgte im Wesentlichen nach dem Protokoll des Herstellers (*QIAexpress Handbook, Qiagen*).

5.5.9.3.1 Bakterienlyse

Die Bakterien wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und anschließend renaturiert. Dazu wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem Lysepuffer B (denaturierend) pro g Bakteriensediment resuspendiert und 30 min bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert. Der Zellschrott wurde dann 30 min bei 10000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand entweder bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

5.5.9.3.2 Kopplung des rekombinanten Proteins an Ni-NTA-Agarose

Sämtliche Schritte wurden bei 4°C (Kühlraum) mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt. Vor Gebrauch wurde die Ni-NTA-Agarose (1 ml pro 4 ml Lysepuffer) mit dreimal 20 ml Lysepuffer B (denaturierend) in einer Säule mit Fritte (*Superflow Columns* von *Qiagen*) äquilibriert. Dann wurde die Agarose 1 h und 20 min bei 4°C und unter ständigem Invertieren mit dem Proteinlysate inkubiert. Die Agarose wurde in der Säule dreimal mit je 4 ml Lysepuffer B (denaturierend)/ml Agarose gewaschen. Anschließend erfolgten zweimal Waschen mit je 4 ml Puffer C (denaturierend) pro ml Agarose. Es folgte die Renaturierung, bei der innerhalb von 2 h jeweils 10 ml Puffer D pro ml Agarose mit absteigender Ureakonzentration (5, 4, 3, 2, 1 M) über die Säule gegeben wurde.

5.5.9.3.3 Elution des rekombinanten Proteins von der Ni-NTA-Agarose

Das renaturierte Protein wurde mit zweimal 5 ml Puffer D, versetzt mit 1 M Urea und 0,5 M Imidazol pro ml Agarose eluiert, wobei jeweils 20 min bei 4°C mit dem Elutionspuffer inkubiert wurde.

5.5.10 Pulldowns und Immunopräzipitationen

Sämtliche für diese Experimente verwendeten Puffer enthielten 1x Proteaseinhibitor (*Complete EDTA free tablets*).

5.5.10.1 Herstellung eines Mausgehirnlysats

Eine zwischen 2 und 4 Monate alte Maus wurde mit CO₂ betäubt und dekapitiert. Das Hirn wurde auf Eis präpariert, vom *Cerebellum* getrennt und in 2 ml eiskaltem Lysepuffer mit Hilfe von Kanülen homogenisiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat 20 min bei 4°C und 10000 g abzentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgenommen und für Experimente eingesetzt.

5.5.10.2 Pulldown mit GST-Fusionsproteinen

Die proteingekoppelte Glutathion-Sepharose wurde mit 1 ml Ripapuffer versetzt, vorsichtig durchmischt, 15 sec bei 800 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Jeweils 1 ml Mausgehirnlysate oder Zellysate in Ripapuffer wurde auf die proteingekoppelte Sepharose gegeben und 2 h bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose einmal mit Ripapuffer und dreimal mit Ripapuffer ohne Detergenzien wie oben gewaschen. Im Falle des S5a-Pulldowns wurde TBS-T-Puffer verwendet, der zusätzlich 1 µM Ubiquitininaldehyd und 50 µM MG-132 enthielt. Die Sepharose wurde anschließend mit 200 µl 1x SDS-Pobenpuffer versetzt und bis zur Analyse über SDS-PAGE und Western Blot bei -20°C aufbewahrt.

5.5.10.3 *Pulldown* mit His₆-rekombinanten Proteinen

Die His₆-Proteinlösung wurde über Nacht bei 4°C in Kopplungspuffer dialysiert. Die NHS-Sepharose wurde nach Herstellerangaben aktiviert, indem sie viermal mit je 1 ml eiskalter 0,1 M HCl-Lösung gewaschen wurde. Dazu wurde die Lösung darauf geben, die Suspension kurz gemischt, und 1 min bei 800 g und 4°C abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen. Der gesamte Waschvorgang sollte insgesamt ca. 15 min dauern. Nach anschließendem, einmaligem Waschen mit Kopplungspuffer wurden 250 µl Sepharose mit 2 µg Protein in 1 ml Kopplungspuffer bei 4°C über Nacht unter ständigem Invertieren inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Sepharose 1 min bei 800g und 4°C abzentrifugiert und 1 h bei 4°C in 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 inkubiert, um nicht abgesättigte Bindungsstellen zu deaktivieren. Anschließend wurde wie oben insgesamt dreimal abwechselnd mit jeweils 1 ml 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 + 0,5 M Natriumchlorid und 0,1 M Natriumacetat + 0,5 M Natriumchlorid gewaschen. Die proteingekoppelte NHS-Sepharose wurde entweder sofort weiterverwendet oder in 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 mit 20 % Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Für einen *Pulldown* wurde die Sepharose mit jeweils 1 ml Ripapuffer wie oben gewaschen und anschließend mit Mausehirnlysate in Ripapuffer 3 h bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert. Dann wurde einmal mit Ripapuffer und dreimal mit Ripapuffer ohne Detergenzien gewaschen. Die Sepharose wurde in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE und Western Blot bei -20°C aufbewahrt.

5.5.10.4 Ko-Immunopräzipitation

Bei der Ko-Immunopräzipitation wurden Proteine und ihre Bindungspartner mittels an Protein-A-Sepharose gekoppelter spezifischer Antikörper aus Mausehirnlysate präzipitiert. Dazu wurde ein Mausehirnlysate in Immunopräzipitationspuffer hergestellt und davon jeweils 1 ml mit 15 µg Zink-Antiserum beziehungsweise 15 µg Serum nicht immunisierter Kaninchen für 1 h bei 4°C unter ständigem Invertieren inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit jeweils 30 µl Protein-A-Sepharose, die über Nacht bei 4°C in Immunopräzipitationspuffer äquilibriert worden war, 2 h bei 4°C inkubiert, die Sepharose 1 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert und dreimal analog zu dem oben beschriebenen *Pulldown* mit Immunopräzipitationspuffer ohne Detergenzien gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 50 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bis zur Analyse durch SDS-PAGE und Western Blot bei -20°C aufbewahrt.

5.5.10.5 RNA-*Pulldown* mit Dynabeads® Oligo (dT) 25

Die Kopplung der mRNA über PolyA-Sequenzen an die magnetischen *Dynabeads® Oligo (dT) 25 (Dyna)* erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll. Für das Sammeln der *Dynabeads* wurde die magnetische Einheit MPC-E 1 (*Dyna*) für Eppendorfreaktionsgefäße verwendet. 4 µg der *in vitro* transkribierten mRNA wurden für die Kopplung an 200 µl *Dynabeads* eingesetzt. Nach der Kopplung in *Binding Buffer* wurden die *Dynabeads* nach Herstellerprotokoll mit *Washing Buffer* gewaschen und 1 h bei 4°C unter ständigem Invertieren mit Lysat von Zellen, die in *Binding Buffer*, der 10 µM ZnCl₂ enthielt, lysiert worden waren, inkubiert. Die Zellen waren 48 h vorher ausgesät und entweder mit pEGFP-Zink (s. Kap. 6.2) transfiziert oder unbehandelt belassen worden. Nach dem *Pulldown* wurden die *Dynabeads* zweimal mit 1 ml *Binding Buffer*, der 10 µM ZnCl₂ enthielt, gewaschen. Dann wurden die RNA samt gebundener Proteine mit 20 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,4 nach Herstellerangaben eluiert. 2 µl des Überstands wurden mit 18 µl frischem H₂O verdünnt und durch RT-PCR mit Arg3.1- und

GAPDH-spezifischen Primern (*arggenomfor* und *arggenomrev*, beziehungsweise *gapdhfw1* und *gapdhrev*) analysiert. Das restliche Eluat wurde mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die *Dynabeads* wurden nach der Elution nach Herstellerangaben regeneriert und für bis zu drei weitere Versuche eingesetzt.

5.5.11 *In vitro* Translationsassay (Retikulozytenlysat)

Die *in vitro* Translation im RRL erfolgte im Wesentlichen nach Herstellerangaben. Zunächst wurden 1 µl *in vitro* transkribierte, *gecapte* mRNA (250 ng/µl) mit 2,2 µl 50 mM Hepes (pH 7,4) mit den entsprechendem GST-Fusionsproteinen (GST-Zink1, GST-ZN, GST-KRAB, GST-Linker, GST-ZF14) 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden 0,8 µl KCl-Lösung, 0,5 µl Mg(OAc)₂-Lösung, 6,7 µl H₂O, 2 µl ³⁵S-Methionin und 10 µl Kaninchenretikulozytenlysat zugegeben. Der Ansatz wurde 60 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl davon mit 5 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert. Die Stabilität der mRNAs im Retikulozytenlysat wurde über RT-PCRs mit den Primern *arg-sense* und *argrev* überprüft.

5.5.12 Herstellung von Sucrosedichtegradienten

Zur Herstellung von kontinuierlichen Sucrosedichtegradienten wurden zunächst zwei Lösungen aus Ribosomengradientenpuffer mit der niedrigsten und der höchsten Sucrosekonzentration des Gradienten angesetzt und auf Eis gekühlt. Dann wurden 5 ml der höher konzentrierten Sucroselösung in ein 14 ml-Ultrazentrifugen-Gefäß (*Beckmann*) gegeben und vorsichtig unter Vermeidung von Vermischung der beiden Phasen mit 5 ml der niedriger konzentrierten Sucroselösung überschichtet. Die Gefäße wurden ca. 1,5-2 h waagrecht bei RT gelagert, so dass durch Diffusion ein kontinuierlicher Gradient entstand.

Bei der Herstellung von diskontinuierlichen Sucrosedichtegradienten wurden jeweils 3 ml von 2 M, 1,6 M, 1,35 M und 0,25 M Sucroselösung in DEPC-behandeltem H₂O in einem 14 ml-Ultrazentrifugengefäß ohne Verwirbelung überschichtet und direkt für die Zentrifugation eingesetzt.

5.5.13 Ribosomenpräparation aus Mausgehirnlysat

Die Präparation erfolgte im Wesentlichen nach einem Protokoll in Siomi et al., 1996. Ein Mausgehirnlysat aus 2 Gehirnen in Ribosomenlysepuffer wurde 10 min auf Eis inkubiert, und anschließend mit Kaliumchloridstocklösung auf 100 mM KCl eingestellt. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 1500 g und 4°C zur Pelletierung der größeren Organellen wie Kerne und Mitochondrien wurde der Überstand auf kontinuierliche 5-47 %ige Sucrosedichtegradienten gegeben und 3 h bei 4°C und 200000 g im Ausschwingrotor zentrifugiert. Anschließend wurde der Gradient von oben ausgehend in ca. 14 gleiche Teile à 750 µl fraktioniert, die auf drei verschiedene Weisen analysiert wurden. Ca. 100 µl wurden für die Absorptionsmessung bei 260 nm verwendet. 300 µl wurden für die Proteinanalyse mit 150 µl Trichloressigsäure (TCA, 20 %) versetzt, gut durchmischt, 30 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 20000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Proteinpräzipitat wurde mit jeweils 1 ml Diethylether versetzt, 5 min bei RT und 20000 g abzentrifugiert, 10-15 min an der Luft getrocknet und anschließend mit 50 µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Anhand der Absorption bei

260 nm wurde die Proteinkonzentration abgeschätzt. Jeweils die gleiche Proteinmenge pro Fraktion (entspricht 25 µl der am niedrigsten konzentrierten Fraktion) wurde über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Aus den restlichen ca. 300 µl der Fraktionen wurde nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion die RNA mit Isopropanol gefällt und in 20 µl H₂O resuspendiert. Die Analyse erfolgte über Formamid-Agarosegelelektrophorese.

5.5.14 Fraktionierung von Mausgehirnlysat

Die Fraktionierung erfolgte nach einem Protokoll in Feng et al., 1997. Ein Mausgehirnlysat aus 2 Gehirnen in Fraktionierungspuffer wurde 5 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert, dann der Überstand 10 min bei 10000g und 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wiederum wurde auf einen diskontinuierlichen Sucroседichtegradienten gegeben und 2 h bei 200000 g im Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Fraktionen beziehungsweise Interphasen, die in Abb. 5.1 dargestellt sind, wurden anschließend mit einer Kanüle (Sterican 20 G x 1,5, Braun) abgenommen. Fraktion 4, das Sediment der freien Polysomen, wurde über Nacht bei 4°C in 1 % SDS gelöst. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Fraktionen in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Es wurden jeweils 3 µg in einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert.

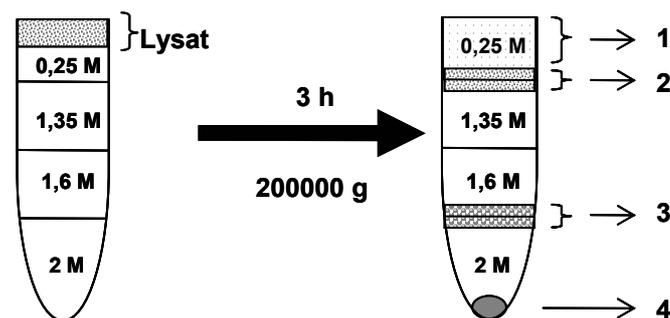


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Fraktionierung

Dargestellt ist der vierschichtige diskontinuierliche Sucroседichtegradient, der für die Fraktionierung des Mausgehirnlysat verwendet wurde, sowie die nach der Zentrifugation erhaltenen subzellulären Fraktionen (1 bis 4) in den entsprechenden Phasen beziehungsweise Interphasen. Der große Pfeil symbolisiert die Zentrifugation, die 3 h bei 200000g durchgeführt wurde. (0,25 M; 1,35 M; 1,6 M; 2 M), Sucrosekonzentrationen in den einzelnen Schichten des Gradienten; (1), Zytosol; (2) Membranen geringer Dichte (Plasmamembranen, Golgi-Membranen, glattes endoplasmatisches Retikulum); (3) Membranen hoher Dichte (rauhes endoplasmatisches Retikulum); (4) freies Polysomensediment.

5.5.15 Analyse des Translationsinitiationskomplexes

1 µl der ³⁵S-markierten mRNA (~ 2x 10⁶ counts per minute) wurde mit 1 µl Proteinlösung in 50 mM Hepes pH 7,4 (abgeschätzt 10 x molarer Überschuss zur mRNA) versetzt und ca. 30 min auf Eis gelagert. Währenddessen wurden 42 µl Coupled TNT Mastermix und 3 µl Methionin mit 5 µl Cycloheximidstocklösung 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA-Proteinlösung dazu gegeben und weitere 5 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl eiskaltem Ribosomenlysepuffer abgestoppt. Dann wurde der gesamte Ansatz über einen kontinuierlichen Sucroседichtegradienten (5-25 %, Volumen 10 ml) 3 h bei 200000 g im

Ausschwingrotor zentrifugiert. Von oben ausgehend wurde der Gradient in gleiche Teile fraktioniert und jeweils die Absorption bei 260 nm und die Radioaktivität in *counts per minute (cpm)* gemessen. Das Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Bei einem dieser Experimente wurde der Gradient dabei in 16 gleiche Teile fraktioniert und bei zwei weiteren Experimenten in 20 gleiche Teile. Zur statistischen Auswertung wurde die Summe der *cpm* der Fraktionen des 80S-Initiationskomplexes gebildet (Fraktionen 8-11 bei 16 Fraktionen und Fraktionen 7-13 bei 20 Fraktionen), in Prozent der Summe der *cpm* aller Fraktionen umgerechnet und die Werte mit einem einseitigen, ungepaarten Student-t-Test mit Hilfe des Computerprogramms Excel analysiert (Tabelle der *cpm*-Werte s. Kap. 9.1.1).

5.5.16 Zellkernpräparation

Zunächst wurde ein Mausgehirnlysat aus 2 ml Homogenisierungspuffer mit Hilfe eines Potter S Homogenisierers hergestellt. Die vollständige Homogenisierung wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft. 2 ml Lysat wurden mit 3,6 ml 1,8 M Sucrose in Homogenisierungspuffer (ohne DTT und TritonX-100) versetzt und auf ein 1,8 M Sucrosekissen gegeben. Nach einer 45minütigen Zentrifugation bei 38000 g im Ausschwingrotor befanden sich die Zellkerne als Sediment am Boden des Zentrifugengefäßes und wurden in 500 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen.

5.5.17 PSD-Aufreinigung

Die PSD-Aufreinigung wurde durch Dr. Niels Plath in unserem Labor durchgeführt und ist in seiner Dissertation (Plath, 2004) beschrieben.

5.6 Immunohistochemische Arbeitsmethoden und *in situ* Hybridisierung

5.6.1 Herstellung von Paraformaldehydschnitten des Mausgehirns

Die Mäuse wurden mit CO₂ betäubt und auf einer Styroporplatte fixiert. Das (noch schlagende) Herz wurde freipräpariert, eine Kanüle (G24) in die linke untere Herzkammer eingeführt und die rechte obere Herzkammer aufgeschnitten, so dass ein offener Kreislauf entstand. Mit einer peristaltischen Pumpe (Durchflussgeschwindigkeit 15 ml/min) wurde die Maus über die Kanüle zunächst mit ca. 25ml Vorspüllösung und dann mit 100-150 ml 4 % Paraformaldehyd in PBS (für Lichtmikroskopie) beziehungsweise 4 % Paraformaldehyd und 1 % Glutaraldehyd in PBS (für Elektronenmikroskopie) perfundiert. Anschließend wurde das Gehirn präpariert und über Nacht bei 4°C in 4 % Paraformaldehyd in PBS nachfixiert. Am nächsten Tag wurde das Gehirn entweder in PBS überführt und für einige Tage bei 4°C gelagert oder direkt am Vibratom geschnitten. Für koronale Schnitte wurde das *Cerebellum* mit Hilfe eines Rasiermessers glatt abgetrennt, das Gehirn auf die entstandene Fläche gestellt und dünn mit (abgekühlter) 2 %iger Agarose übergossen. Dann wurde das in Agarose eingebettete Gehirn mit Sekundenkleber auf dem Schneideteller des Vibratoms befestigt. Die Schnitte wurden mit einer Dicke von 25 µm bis 35 µm (für Lichtmikroskopie) beziehungsweise von 50 µm (für Elektronenmikroskopie) angefertigt und in PBS bei 4°C gelagert.

5.6.2 Immunohistochemie mit DAB

Die Schnitte wurden frei schwebend in Flüssigkeit behandelt (so genannte *free floating* Methode), dazu wurden *24-well-plates* verwendet, die kontinuierlich auf einem Orbitalschüttler geschwenkt wurden. Die Schnitte wurden mit Hilfe vorne zugeschmolzener Pasteurpipetten und dünner Pinsel umgesetzt und zunächst viermal 5 min in ca. 1,5 ml PBS gewaschen, wobei die Schnitte kontinuierlich untertauchen sollten. Dann wurden sie durch eine Alkoholreihe (10 % - 20 % - 40 % - 20 % - 10 % Ethanol in PBS, jeweils 5 min Inkubation) permeabilisiert. Die Inaktivierung endogener Peroxidasen erfolgte 30 min mit 0,3 % H₂O₂ in PBS. Dabei kam es zur Blasenbildung, auf Grund dessen die Schnitte nach 15 min erneut untergetaucht werden mussten. Anschließend wurden die Schnitte dreimal 5 min in ca. 1,5 ml PBS gewaschen. Nach 30 min Inkubation in Blockierlösung (DAB) wurde der erste Antikörper über Nacht bei RT in Antikörperverdünnungslösung (DAB) inkubiert (antikörperspezifische Verdünnung). Daran anschließend wurden die Schnitte viermal 5 min in ca. 2 ml PBS gewaschen und mit dem zweiten Antikörper (spezifisch für Kaninchen-IgG, biotinyliert) 1 h bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (viermal 5 min in ca. 1,5 ml PBS) erfolgte eine Inkubation für 1,5 h mit dem ABC Elite Kit. Die Komponenten A (Avidin) und B (biotinylierte Peroxidase) wurden zuvor je 1: 500 in PBS verdünnt und 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde wieder einmal 5 min mit ca. 1,5 ml PBS und dreimal 5 min mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) gewaschen. Während des letzten Waschschrifts wurde die DAB-Färbelösung angesetzt. Dazu wurden jeweils eine H₂O₂-Puffertablette und eine DAB-Tablette in 5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) aufgelöst. Die Schnitte wurden ca. 10 bis 15 min in der Färbelösung inkubiert. Eine Intensivierung der Färbung konnte durch Nickelverstärkung erreicht werden, indem vorab zur Färbelösung 500 µl 3 % Nickelammoniumsulfatlösung und 50 µl 1 M Imidazol gegeben wurde. Die Färbung wurde unter dem Stereomikroskop beobachtet und durch Auswaschen mit 50 mM Tris-HCl gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend noch drei- bis viermal mit 50 mM Tris-HCl gewaschen und dann möglichst faltenfrei auf Objektträger aufgezogen. Nach einer Trocknungsphase über Nacht bei RT und anschließender Entwässerung in einer Alkoholreihe (30 %, 60 %, 80 %, 100 % Ethanol, Xylol, jeweils 1-2 min) wurden die Schnitte mit DPX eingedeckelt und über Nacht trocknen gelassen.

5.6.3 Immunogoldfärbung

Für die Immunogoldfärbung wurden die Schnitte ebenso wie bei der DAB-Färbung *free floating* behandelt. Zunächst wurden sie viermal jeweils 5 min in 1,5 ml PBS gewaschen. Dann wurde 15 min in 1 % Natriumborhydrid in PBS permeabilisiert. Nach fünfmaligem Waschen in ca. 1,5 ml PBS erfolgte eine Alkoholreihe (10 %, 20 %, 40 %, 20 %, 10 % Ethanol in PBS, jeweils 10 min Inkubation) und 30 min Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierlösung (IG). Dann wurde der erste Antikörper (Verdünnung antikörperspezifisch) in Antikörperverdünnungslösung A (IG) über Nacht bei RT inkubiert. Nach zweimal 5 min Waschen in 1,5 ml Antikörperverdünnungslösung A (IG) und zweimal 5 min Waschen in 1,5 ml Antikörperverdünnungslösung B (IG) wurden die Schnitte mit dem zweiten Antikörper (spezifisch für Kaninchen-IgG, goldgekoppelt) in Antikörperverdünnungslösung B (IG) 2 h bei RT inkubiert. Dann wurde dreimal 5 min in 1,5 ml Gold-Antikörperverdünnungslösung B (IG) und zweimal in 1,5 ml PBS gewaschen, 15 min in 2 % Glutaraldehyd in PBS nachfixiert und über Nacht bei RT in PBS inkubiert.

Am nächsten Tag wurde dreimal 5 min in 1,5 ml PBS, fünfmal 15 min in 150 mM Natriumcarbonatlösung gewaschen und 1,5 h bei RT in einem Teil *Gummi arabicum* (vor Gebrauch 10 min 20000 g abzentrifugieren) und einem Teil *IntensSETM* (bestehend aus zwei Komponenten, die 1:1 zusammengemischt wurden) inkubiert. Dann wurde sechsmal 10 min in 150 mM Natriumcarbonatlösung gewaschen. Die nächsten Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zunächst erfolgte eine 10-minütige Inkubation in 9 Teilen 0,05 % Goldchlorid in H₂O und 0,5 Teilen 3 M Natriumacetatlösung, danach wurde 5 min in 150 mM Natriumacetatpuffer gewaschen, 15 min in Natriumthiosulfatlösung fixiert und dreimal 10 min in 200 mM Hepespuffer gewaschen. Für lichtmikroskopische Anwendungen wurden die Schnitte nach diesem Schritt auf Objektträger aufgezogen und wie oben weiterbehandelt. Für elektronenmikroskopische Analysen wurden die Schnitte 30 min bei RT in 1 % Osmiumlösung in PBS auf Eis inkubiert, sechsmal 5 min in 1,5 ml PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C in PBS gelagert. Am nächsten Tag erfolgte eine Alkoholreihe (jeweils 20 min in 30, 50, 70, 90 und zweimal 100 % Ethanol in PBS). Die Schnitte wurden über Nacht bei RT in einer 1:1-Mischung aus Epon (Epoxyharz) und 100 % Ethanol bei RT offen stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 bis 5 h bei RT in Epon (Epoxyharz) inkubiert. Die Schnitte wurden zwischen zwei Blätter *Overhead*-Folie gelegt, mit Aluminiumfolie umwickelt, mit einem Gewicht beschwert und 48 h bei 60°C inkubiert. Die folgenden Schritte wurden von Saskia Siegel (Technische Assistentin von Dr. Michaela Schweizer, ZMNH) durchgeführt. Von den Schnitten wurden Ultradünnschnitte (60 nm) angefertigt und diese auf Kupfer-Grids aufgezogen. Nach Kontrastierung mit 5 % Uranylacetatlösung, wurden sie dreimal 5 min mit PBS gewaschen und 2 min in Bleicitratlösung inkubiert. Nach dreimal 5 min Waschen in PBS wurden die Schnitte getrocknet und dann elektronenmikroskopisch ausgewertet.

5.6.4 *In situ* Hybridisierung von Gehirndünnschnitten

5.6.4.1 Herstellung von Gehirndünnschnitten

Die Maus wurde mit CO₂ betäubt und dekapitiert. Das Gehirn wurde auf Eis präpariert (für koronale Schnitte wurde das *Cerebellum* abgetrennt) und mit der Schnittfläche nach unten möglichst gerade auf einer Münze, die mit *Tissue-Tek (Miles)* versehen worden war, platziert. Die Münze wurde auf einen Kronkorken gelegt, der in flüssigem Stickstoff stand, so dass das Gewebe langsam von unten durchfror. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Das gefrorene Gehirn wurde am Kryostaten 16 µm dick geschnitten, die Schnitte auf SuperFrost-Objektträger aufgezogen und bei RT getrocknet. Die Schnitte wurden ebenfalls bei -80°C gelagert.

5.6.4.2 Vorbereitung der Schnitte

Die Schnitte wurden aufgetaut und bei RT trocknen gelassen. Dann wurden sie 15 min in 4 % PFA fixiert, dreimal 5 min in PBS gewaschen und bei RT mit der Beschriftung nach unten getrocknet. Anschließend wurden sie 3 min bei RT in 0,1 M Triethanolamin pH 8 inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein zweites Gefäß vorbereitet, in dem 0,1 M Triethanolamin pH 8 unter Rühren mit 350 µl Essigsäure-Anhydrid versetzt wurde. Der Rührvorgang wurde dann sofort gestoppt und die Schnitte darin 10 min bei RT inkubiert (Acetylierung). Danach wurden sie in einer Alkoholreihe (jeweils 3 min Inkubationszeit) mit 30, 50, 80, 95 und 100 % Ethanol dehydratisiert.

5.6.4.3 Hybridisierung

Nach 15-20 min Trockenzeit wurden Deckgläser mit jeweils ~100 µl Hybridisierungsmix beschichtet und die Objektträger schräg von oben darauf gelegt, so dass sich die Deckgläser an die Objektträger ansaugten. Nach Abdichtung der Ränder mit DPX und anschließender Trocknung erfolgte die Hybridisierung für mindestens 18 h bei 55°C.

5.6.4.4 Waschen

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger 15 min auf RT abgekühlt, das DPX mit einer Pinzette abgenommen und die Schnitte 20 min in 4x SSC bei RT auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Dabei lösten sich die Deckgläser ab. Die unbedeckten Objektträger wurden dann noch zweimal 10 min in 4x SSC bei RT auf dem Orbitalschüttler gewaschen. Dann wurden der auf 37°C vorgewärmten RNase-Puffer mit RNaseA versetzt und die Objektträger 30 min bei 37°C darin inkubiert. Danach erfolgten drei 15minütige Waschschrte bei RT unter ständigem Schütteln nacheinander in 2x, 1x und 0,5x SSC. Nach 30 min Inkubation bei 55°C in vorgewärmten 0,1x SSC erfolgten weitere 10 min Waschen in 0,1x SSC bei RT. Nach der anschließenden Dehydratisierung (5 min 70 % Ethanol und 5 min 95 % Ethanol) wurden die Schnitte an der Luft trocknen gelassen. Die Filmexposition (*Biomax MR* Film) erfolgte 1-3 Tage bei RT.

5.6.4.5 Dipping der hybridisierten Schnitte

Zur besseren Signalauflösung wurden die radioaktiv hybridisierten Schnitte nach der Filmexposition in einer Photo-Emulsion entwickelt. Sämtliche Arbeiten mit der Photo-Emulsion erfolgten in absoluter Dunkelheit. Die *NTB-2 Nuclear Tracking Emulsion* wurde im Wasserbad auf 42°C-45°C erwärmt und mit dem gleichen Volumen an 0,3 M Ammoniumacetat versetzt. Die hybridisierten Schnitte auf den Objektträgern wurden unter Vermeidung von Luftblasen in die vorbereitete Photo-Emulsion getaucht und überschüssige Flüssigkeit abtropfen gelassen. Zum Trocknen über Nacht wurden die Objektträger schräg aufgestellt. Am nächsten Tag wurden sie in ein mit Trocknungsmittel (Molekularsieb) versehenes Gefäß gestellt, lichtdicht verschlossen und 14 Tage bei 4°C exponiert. Nach der Exposition wurden die Schnitte innerhalb von 7 h bei RT aufgewärmt, 4 min in der Entwicklerlösung D19 inkubiert, kurz in H₂O getaucht und 8 min in Fixierer inkubiert. Nach ca. siebenmaligem Waschen mit H₂O wurden sie 1 min in Methylgrünfärbelösung inkubiert, viermal in H₂O gewaschen, an der Luft getrocknet und mit DPX eingedeckelt.

5.7 Methoden der sekundären Zellkultur

Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂.

5.7.1 Auftauen von sekundären Zellen

Ein Kryogefäß (2 ml) der in HEK293-Medium, das 20 % DMSO enthielt, unter flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurde in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut und sofort in 10 ml vorgewärmtes

Medium gegeben. Die Zellen wurden 3 min bei RT und 800 g abzentrifugiert, in 1 ml Medium vorsichtig resuspendiert und in eine vorbereitete Zellkulturflasche mit 30 ml vorgewärmten Medium gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um das restliche DMSO zu entfernen.

5.7.2 Passagieren von sekundären Zellen

Zellen wurden bei 70 %iger Konfluenz passagiert, in der Regel alle 2-3 Tage. Dazu wurden die Zellen zunächst zweimal vorsichtig mit ca. 10 ml PBS gewaschen und anschließend maximal 5 min bei 37°C und 5 % CO₂ mit 2 ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension 3min bei 800 g und RT zentrifugiert und das Sediment sorgfältig in HEK293-Medium resuspendiert. Ein Aliquot wurde zur Identifikation der lebenden Zellen mit Trypan-Blau-Lösung gefärbt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Es wurden 5×10^5 lebende Zellen pro 6 cm-Schale ausgesät.

5.7.3 Einfrieren von sekundären Zellen

Die ca. 80-90 % konfluenten Zellen wurden nach dem Passagieren in 5 ml HEK293-Medium mit 20 % sterilem DMSO resuspendiert, jeweils 1 ml davon in Kryogefäße gefüllt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

5.7.4 Transfektion von sekundären Zellen

Die Zellen wurden passagiert und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 50-70 % mit FuGENE6 nach Herstellerangaben transfiziert. Dabei wurden jeweils 2,5 µg DNA und 6 µl FuGENE6 für eine 6-cm-Schale eingesetzt. Die Transfektion erfolgte 5 h in serumfreiem HEK293-Medium, dann wurde FBS bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugegeben und 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ bis zur Zellyse inkubiert.

5.7.5 Herstellung eines Zellysats

Die 6-cm-Zellkulturschalen wurden 48 h nach der Transfektion auf Eis gestellt und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach vollständigem Entfernen des PBS wurden die Zellen mit eiskaltem Lysepuffer versetzt, mit Hilfe eines Zellschabers vom Kulturschalenboden abgelöst, die Suspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, 1 h auf Eis inkubiert und dann 20 min bei 20000 g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

5.8 Tierversuche

Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigt (Nr. G0241/02).

Die GRF1-*Knockout*-Mäuse stammten aus dem Labor von Riccardo Brambilla (San Raffaele Forschungsinstitut, Universität Mailand, Italien), waren männlich und 8 Wochen alt. Die für die immunohistochemischen Färbungen verwendeten Arg3.1-*Knockout*-Mäuse waren 8-12 Monate alt und

männlich und wurden in der Tierzucht des UKE Hamburg beziehungsweise am FEM in Berlin gehalten. Alle anderen verwendeten Versuchstiere waren 8 bis 16 Wochen alte männliche C57BL/6J Mäuse und wurden von *Jackson Laboratory* bezogen.

5.8.1 Induktion von epileptischen Anfällen

Kainat wurde in einer Konzentration von 4 mg/ml in PBS gelöst und intraperitoneal injiziert. Zur Auslösung von epileptischen Anfällen wurden ca. 25-30 mg Kainat pro Gramm Körpergewicht injiziert. Ungefähr 30 min nach Kainatinjektion entwickelten die Tiere Krämpfe, die 2-4 h anhielten. Mäuse, die für Kontrollexperimente eingesetzt wurden, erhielten eine Injektion des entsprechenden Volumens PBS.

Zur Tötung wurden die Mäuse mit CO₂ betäubt und dekapitiert.