

2. Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Clontech (Palo Alto, USA), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), NEB (Schwalbach), NEN (Köln), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Taufkirchen) bezogen.

2.1 Bakterienstämme

E.coli **DH5 α** (Stratagene): F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *phoA*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, λ ⁻

2.2 Hefestämme

AH109 (Clontech): MATa, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

2.3 Zellen

Zelllinien

HEK293	humane embryonale Nierenepithelzelllinie	ATCC CRL-1573
HeLa	humane Cervix-Karzinomzelllinie	ATCC CCL-2
HepG2	humane Hepatokarzinomzelllinie	ATCC HB-8065
PC12	neuroendokrine Phäochromozytom-Zelllinie der Ratte	ATCC CRL-1721

HEK293-Zellen, die stabil mit dem Chemokinrezeptor CCR5 transfiziert sind, wurden freundlicherweise von Dr. Thilo Mokros und Dr. Uta Höpken (AG Dr. Martin Lipp, MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Primärzellkulturen und Adenovirus

Neomycin-resistente embryonale Fibroblasten, die aus Kreuzungen von Wildtyptieren mit transgenen Neomycin-homozygoten Mäusen stammten (Joyner 1999), wurden freundlicherweise von Martin Sieber (AG Prof. Dr. Carmen Birchmeier, MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt. Für die ES-Zellkultur wurde die embryonale Stammzelllinie E14.1, die aus einer männlichen 129/Ola Maus-Blastozyste stammte (Kuhn *et al.*, 1991), verwendet und wurde dankend von Prof. Dr. Carmen

Birchmeier (MDC, Berlin) erhalten. Die Adenoviren für humanes EBAG9, AD-EBAG9/GFP, und AD-GFP wurden von Dr. Arne Engelsberg (AG Dr. Armin Rehm, MDC, Berlin) bereitgestellt. Die Expression von EBAG9 bzw. GFP steht unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

2.4 Mausstämme

Die verwendeten Mausstämme C57Bl/6, Balb/c und CB6F1 (F1-Hybrid aus Balb/c x C57Bl/6N) wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

2.5 Plasmide

Tab. 2.1 Ausgangsvektoren

Plasmid	Referenz	Beschreibung
pBluescriptII SK(-)	Stratagene	Klonierungsvektor im bakteriellen System, Amp ^r
pcDNA3.1(+)	Invitrogen	Eukaryotischer Expressionsvektor, Amp ^r , Neo ^r
pEGFP-N3	Clontech	Eukaryotischer Expressionsvektor mit GFP-tag 3' der MCS, Kan ^r , Neo ^r
pGEM-T Easy	Promega	Klonierungsvektor im bakteriellen System, Amp ^r
pGEX-4T-1	Amersham	Prokaryotischer Expressionsvektor mit GST-tag 5' der MCS, Amp ^r
pQE-32	Qiagen	Prokaryotischer Expressionsvektor mit His ₆ -tag 5' der MCS, Amp ^r
pSTBlue-1	Novagen	Klonierungsvektor im bakteriellen System, Amp ^r , Kan ^r
pTV-0	*	Rekombinationsvektor für ES-Zellen, Amp ^r , Neo ^r , konstruiert von Barbara Walter (Riethmacher <i>et al.</i> , 1995)
pTVFlox-0	*	weiterentwickelte Form des Vektors pTV-0 mit gefloxter Neo-Kassette

Hefepasmide

pACT2	Clontech	<i>prey</i> -Vektor mit GAL4-Aktivierungsdomäne 5' der MCS, Amp ^r , <i>Leu2</i> ⁺
pGADT7	Clontech	<i>prey</i> -Vektor wie pACT2
pGADT7-T	Clontech	Kontrollvektor, kodiert für das AD-SV40-T-Antigen-Hybridprotein
pGBKT7	Clontech	<i>bait</i> -Vektor mit GAL4-DNA-Bindungsdomäne 5' der MCS, Amp ^r , <i>Trp1</i> ⁺
pGBKT7-53	Clontech	Kontrollvektor, kodiert für das BD-p53-Hybridprotein
pGBKT7-Lam	Clontech	Kontrollvektor, kodiert für das BD-LaminC-Hybridprotein

* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Carmen Birchmeier (MDC, Berlin)

Tab. 2.2 Expressionsplasmide

Plasmid	Referenz	Beschreibung
pCB7-SNAP23	Koticha <i>et al.</i> , 1999 ^{*1}	murine SNAP23-cDNA im pCB7-Vektor (Amp ^r).
GST-SNAP29	R. Jahn ^{*2}	SNAP29-cDNA aus <i>Rattus norvegicus</i> im pGEX-KG-Vektor (abgeleitet vom pGEX-2T-Vektor, Amp ^r)
NPY-GST	Fukuda <i>et al.</i> , 2002a ^{*3}	humane cDNA von NPY-GST im pShooter-Vektor (Invitrogen, Amp ^r).
GST-SNAP25	Ilardi <i>et al.</i> , 1999 ^{*4}	SNAP25-cDNA im pGEX-4T-1-Vektor
GST-VAMP2	Ilardi <i>et al.</i> , 1999 ^{*4}	VAMP2-cDNA im pGEX-4T-1-Vektor
GST-Snapin S50D	Chheda <i>et al.</i> , 2001 ^{*4}	Snapin-cDNA mit einer Serin → Asparagin Austauschmutation an der Aminosäureposition 50

In dieser Arbeit generierte Expressionsplasmide (s.a. Kap. 3.1.14)

EBAG9-GFP C12/14S	Cystein → Serin Austauschmutante von EBAG9-GFP an Aminosäureposition 12 und 14
EBAG9-GFP C12/14/27S	Cystein → Serin Austauschmutante an Aminosäureposition 12, 14 und 27
EBAG9 Δ1-7-GFP	EBAG9-GFP (AS 8-213)
N-Flag-EBAG9	EBAG9 mit N-terminalen Flag-tag im pcDNA3.1(+)-Vektor
EBAG9-C-Flag	EBAG9 mit C-terminalen Flag-tag im pcDNA3.1(+)-Vektor
GST-SNAP23	SNAP23 im pGEX-4T-1-Vektor
pcDNA-Snapin	humane Snapin-cDNA im pcDNA3.1(+)-Vektor
GST-Snapin	Snapin im pGEX-4T-1-Vektor
GST-Snapin _{AS 21-82}	GST-Snapin (AS 21-82)
GST-Snapin Δ1-20	GST-Snapin (AS 21-136)
GST-Snapin Δ83-136	GST-Snapin (AS 1-82)
His ₆ -Snapin	Snapin im pQE-32-Vektor
BD-EBAG9	EBAG9 im pGBKT7-Vektor
BD-EBAG9 Δ1-30	BD-EBAG9 (AS 31-213)

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

^{*1} Dr. Giulia Baldini (Columbia University, NY)

^{*2} Dr. R. Jahn (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen)

^{*3} Dr. M. Fukuda (RIKEN, Hirosawa, Wako, Saitama, Japan)

^{*4} Dr. Zu-Hang Sheng (NIH, Bethesda, MY)

Tab. 2.3 Plasmide aus der Sammlung der AG Dr. Armin Rehm (MDC, Berlin)

Plasmid	Beschreibung (Engelsberg <i>et al.</i> , 2003)
EBAG9-GFP	humane EBAG9-cDNA im pEGFP-N3-Vektor (Clontech, Kan ^r)
EBAG9 Δ 1-27-GFP	Deletionsmutante von EBAG9-GFP (AS 28-213)
EBAG9 Δ 179-213-GFP	Deletionsmutante von EBAG9-GFP (AS 1-178)
EBAG9 Δ 30-213-GFP	Deletionsmutante von EBAG9-GFP (AS 1-29)
pcDNA-EBAG9	humane EBAG9-cDNA im pcDNA3.1(+)-Vektor
GST-EBAG9 Δ 1-30	humane EBAG9-cDNA (AS 30-213) im pGEX-2T-Vektor (Amersham, Amp ^r)

2.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ GmbH (Berlin-Buch) bezogen. Unterstrichene Basenabschnitte kennzeichnen Restriktionsschnittstellen.

Tab. 2.4 Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz (5' → 3')
eGFP-5'	GCTAGCGCTACCGGACTCAGA
eGFP-3'	GTCGCCGTCCAGCTCGACCAGG
pGEX-3'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pGBKT7-3'	TTCGCCCCGGAATTAGCTTGGCT
pGADT7-5'	TACCACTACAATGGATG
pGADT7-3'	GTGACCTGGCGGGGTTTTTCA
pTVflox-5'-5'	GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
pTVflox-3'-3'	TCTTGCAAAACCACACTGCTCGAC
pTVflox-3'-5'	GATTCGCAGCGCATCGCCTTCTAT
pTVflox-ex2-5'	AGGACAAACCGCCAGCAACAGTAA
pTVflox-ex2-3'	CCAGCAGTTAAAAGTACTAGGCAGTA
pTV0-5'	GTGAGCGCAACGCAATTAATGTGA
pTV0-3'	GATTCGCAGCGCATCGCCTTCTAT
T7	TAATACGACTCACTAGGG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
SP6	GATT TAGGTGACACTATAG

Tab. 2.5 Primer für Klonierung der Rekombinationsvektoren

Name	Sequenz (5' → 3')	Konstrukt
5'-Arm _{pst} -s	TTGCGTAACCAGAAAGCTCGCGTGTGTGTT	5'-Rekombinationsarm in pSTBlue-1
5'-Arm _{pst} -as	GAGAACACTGTTGCTAGGCAGGTACAAAC	
3'-Arm _{pem} -s	GGACATGACACCAACTATACGGAAAACCTCA	3'-Rekombinationsarm in pGEM-T easy
3'-Arm _{pem} -as	TTCTTGCCACGTATCTAAGTCACCTAATTC	
5'-Arm _{ptv} -s	CCATCGATGTTGTCACAACAGAGCTCTTCTTCC	5'-Rekombinationsarm in pTV-0
5'-Arm _{ptv} -as	ATAAGAATGCGGCCGAGCAGATCTGAGGGAGAAG GACAAA	
3'-Arm _{ptv} -s	ACGCGTCGACGCAGCCATTTAGTAACTTTCTGCTTGG	3'-Rekombinationsarm in pTV-0
3'-Arm _{ptv} -as	ACGCGTCGACTTTCAGTACTTCCTGCCTCCACCACTA	
loxP-s	CGGAATTCATAACTTCGTATAGCATA	loxP-Sequenz in pBluescript
loxP-as	ATAGTTTAGCGGCCGCATAACTTCGTATAATGTA	
mEBAG9-s	TTGCGTAACCAGAAAGCTCGCGTGTGTGTT	murine EBAG9-cDNA in pSTBlue-1
mEBAG9-as	GGAGAATCCTGGTGTCTGAACAGCTCAAT	

Tab. 2.6 Primer für Klonierung der Expressionsplasmide

Name	Sequenz (5' → 3')
EBAG9Δ1-7-GFP-s	GGGGTACCCACCATGTTATTTAAATTTTGT
EBAG9Δ1-7-GFP-as	CGGGATCCTGAAAGTTTCACACCAAT
EBAG9-C-Flag-s	CGGGATCCCACCATGGCCATCACCCAGTTT
EBAG9-C-Flag-as	GGAATTCCTATTACTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTAGTCTGAAAGTTTCA CACCAAT
EBAG9-N-Flag-s	CGGGATCCCACCATGGACTACAAGGACGACGACAAGATGGCC ATCACCCAGTT
EBAG9-N-Flag-as	CCGGAATTCATGTGTTATGAAAGTTTCAC
His ₆ -Snapin-s	CGGGATCCGTATGGCGGGGGCTGGTTC
His ₆ -Snapin-as	CCCAAGCTTTTATTTGCCTGGGGAGCCA
GST-SNAP23-s	GGGGATCCATGGATAATCTGTCCCCAGAGGAA
GST-SNAP23-as	GGAATTCCTTAACTATCAATGAGTTTCTTTGC
pcDNA-Snapin-s	GGGGTACCATGGCGGGGGCTGGTTCCGCC
pcDNA-Snapin-as	GGAATTCCTTTGCCTGGGGAGCCAGGG
GST-Snapin-s	CGGGATCCGCGGGGGCTGGTTCCGCC
GST-Snapin-as	GGAATTCCTTTGCCTGGGGAGCCAGGG
GST-Snapin _{AS21-82} -s	CGGGATCCGCGCCGCGACCTTTTCGCCGAA
GST-Snapin _{AS21-82} -as	GGAATTCCTTAAACATAGGGGTCAA
GST-SnapinΔ1-20-s	CGGGATCCGCGCCGCGACCTTTTCGCCGAA
GST-SnapinΔ1-20-as	GGAATTCCTTATTTGCCTGGGGAGCCA
GST-SnapinΔ83-136-s	CGGGATCCATGGCGGGGGCTGGTTC
GST-SnapinΔ83-136-as	GGAATTCCTTAAACATAGGGGTCAA
Snapin-GFP-s	GGGGTACCATGGCGGGGGCTGGTTCCGCC
Snapin-GFP-as	CGGATCCTTTGCCTGGGGAGCCAGG

Fortsetzung Tab. 2.6 Primer für Klonierung der Expressionsplasmide

Name	Sequenz (5' → 3')
F1	GCTAGCGCTACCGGACTCAGA
M1-C12/14S	TGCTAGGGAGGTAGAAAATTTAAA
M2-C12/14S	GCCAGATCTGGATATTAATCTCTT
M1-C27S	AGATTAATATCCAGATCTGGCAGA
M2-C27S	AAATTTTCTACCTCCCTAGCAACA
F2	CGGGATCCTGAAAGTTTCACACCAAT
BD-EBAG9-s	CCGGAATTCATGGCCATCACCCAGTTT
BD-EBAG9-as	CGGGATCCTTATGAAAGTTTCACACC
BD-EBAG9Δ1–30-s	CCGGAATTCGGCAGAGGACGGAAATTA

2.7 Antikörper**Tab. 2.7 Primärantikörper**

Name/Klon (anti-)	Isotyp/Spezifität	Quelle/Referenz
α1-Antitrypsin	Ziege polyklonal; anti-human	U.S. Biochemical
Actin	Kaninchen polyklonal	Sigma
B220-FITC/RA3-6B2	Ratte IgG _{2a} ; anti-Maus	BD Biosciences
Cathepsin D/1C11	Maus IgG ₁ mAK; anti-human	Zymed Laboratories
CD3ε/145-2C11	Hamster IgG ₁ mAK; anti-Maus	BD Biosciences
CD117/2B8	Ratte IgG; anti-Maus; PE-gekoppelt	BD Biosciences
DNP/SPE-7	Maus IgE mAK; anti-Dinitrophenyl (DNP)	ICN Biomedicals
EBAG9 Serum	Kaninchen polyklonal; anti-human	Engelsberg <i>et al.</i> , 2003
EEA1/14	Maus IgG ₁ mAK; anti-human	BD Biosciences
Flag M2	Maus IgG mAK; anti-Flag	Sigma
Flag M5	Maus IgG mAK; anti-Flag	Sigma
GFP-biotin	Ziege polyklonal; Biotin-gekoppelt	Vector Laboratories
GFP Antiserum	Kaninchen polyklonal	Ralf Schülein*
GM130/35	Maus IgG ₁ mAK; anti-Ratte	BD Biosciences
GST	Ziege polyklonal	Pharmacia
IFNγ/R4-6A2	Ratte IgG ₁ mAK; anti-Maus IFNγ	BD Biosciences
IFNγ-biotin/XMG1.2	Ratte IgG ₁ mAK; Biotin-gekoppelt	BD Biosciences
IgE-FITC/R35-72	Ratte IgG ₁ ; anti-Maus; FITC-gekoppelt	BD Biosciences

*¹ freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ralf Schülein (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie, Berlin)

Fortsetzung Tab. 2.7 Primärantikörper

Name/Klon (anti-)	Isotyp/Spezifität	Quelle/Referenz
MHC Klasse I/ W6/32 HL	Maus IgG _{2a} ; anti-humane MHC Klasse I schwere Kette	Barnstable <i>et al.</i> , 1978
p115/15	Maus IgG ₁ mAК; anti-Ratte	BD Biosciences
RANTES/53433	Ratte IgG ₁ mAК; anti-Maus	R&D Systems
RANTES-biotin	Ziege IgG polyklonal; Biotin-gekoppelt	R&D Systems
SNAP25	Kaninchen polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
Synaptophysin/7.2	Maus IgG ₁ mAК	Synaptic Systems
VAMP2/CI 69.1	Maus IgG ₁ mAК	Synaptic Systems

Tab. 2.8 Sekundärantikörper und Streptavidin-Konjugate

Name	Spezifität	Quelle/Referenz
anti-Kaninchen-HRP	Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L); Peroxidase-gekoppelt	Southern Biotechnology
anti-Maus-HRP	Ziege anti-Maus IgG (H+L); Peroxidase-gekoppelt	Southern Biotechnology
anti-Kaninchen-biotin	Ziege anti-Kaninchen IgGs; Biotin-gekoppelt	Dako
anti-Maus-biotin	Ziege anti-Maus IgGs; Biotin-gekoppelt	Dako
Alexa Fluor 568	Streptavidin-gekoppelt	Molecular Probes
Anti-Kaninchen-Alexa Fluor 568	Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L); Alexa Fluor 568-gekoppelt	Molecular Probes
Streptavidin-HRP	Peroxidase-gekoppelt	Dako

2.8 Häufig verwendete Puffer und Medien

Puffer und Lösungen, die hier nicht aufgeführt sind, finden sich unter den jeweiligen Methoden.

<u>DNA-Probenpuffer (10x):</u>	0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylene-Cyanol, 30% Glycerin
<u>LB-Medium:</u>	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l H ₂ O
<u>PBS(T)</u>	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , ad pH 7.2 (0.05% Tween-20)
<u>Protein-Probenpuffer (2x):</u>	125 mM Tris pH 6.8, 4% SDS, 0.002% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 5% β-Mercaptoethanol
<u>TBS</u>	50 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM NaCl
<u>TE:</u>	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, ad pH 7.4

Lysepuffer

<u>CHAPS-Puffer:</u>	25 mM Hepes pH 7.4, 140 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.5% CHAPS
<u>NP40-Puffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7.4, 5 mM MgCl ₂ , 0.5% NP-40
<u>RIPA-Puffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.25% Natriumdesoxycholat, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 10 mM NaF
<u>TX-100-Puffer:</u>	50 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.5% Triton X-100
	nur frisch dazu: 1 mM PMSF, 5 µg/ml Aprotinin

Hefemedien

<u>YPD-Medium:</u>	20 g/l Difco Pepton, 10 g/l Hefe-Extrakt, 2% Glucose
<u>SD-Medium (steril filtriert):</u>	1x DO-Aminosäuremix, 2% Glucose, 100 µg/ml Ampicillin

10x DO (dropout)-Aminosäuremix (steril filtriert):

200 mg/ml	Adenin-Hemisulfat	500 mg/ml	Phenylalanin
200 mg/ml	Arginin	2000 mg/ml	Threonin
200 mg/ml	Histidin	200 mg/ml	Tryptophan
300 mg/ml	Isoleucin	300 mg/ml	Tyrosin
1000 mg/ml	Leucin	200 mg/ml	Uracil
300 mg/ml	Lysin	1500 mg/ml	Valin
200 mg/ml	Methionin	67 g/l	<i>Yeast Nitrogen Base w/o amino acids</i> (Difco)

Für die Herstellung der Selektionsmedien, SD(-AS), wurde die entsprechende Aminosäure nicht zugegeben und für X-Gal-SD-Platten wurde zusätzlich 0.002% (w/v) X- α -Gal (Glykosynth, UK) zugesetzt.

Für die Herstellung von LB-, YPD- oder SD-Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar (Invitrogen) zugesetzt.

Zellkulturmedien

<u>DMEM-Medium:</u>	500 ml DMEM (PAA, Cölbe), 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml; PAA), 5 ml 200 mM Glutamin (PAA), 5 ml 100 mM Natrium-pyruvat (Gibco/BRL)
<u>RPMI-Medium:</u>	500 ml RPMI, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml 200 mM Glutamin, 5 ml 100 mM Natrium-pyruvat, 500 µl 50 mM β-Mercaptoethanol (Gibco/BRL)
<u>Trypsinlösung:</u>	0.05% Trypsin/0.02% EDTA (PAA)
<u>Einfriermedium:</u>	10% DMSO, 50% FCS, 40% Medium
<u>Fibroblasten-Medium:</u>	500 ml DMEM mit Glutamax-I (Gibco/BRL), 60 ml FCS (Sigma), 5.7 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/BRL), 5.7 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco/BRL), 1.2 ml 50 mM β-Mercaptoethanol
<u>ES-Zellkulturmedium:</u>	500 ml DMEM mit Glutamax-I, 90 ml FCS, 6 ml 100x nicht-essentielle Aminosäuren, 6 ml Penicillin/Streptomycin, 1.2 ml 50 mM β-Mercaptoethanol, 60 µl LIF*

* Zellkulturüberstand LIF-produzierender Zellen (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Carmen Birchmeier, MDC, Berlin)

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Allgemeine Standardmethoden sowie gängige Puffer und Lösungen, die im folgenden nicht näher beschrieben sind, wurden aus den Laborhandbüchern von Ausubel *et al.* (1989) und Sambrook und Russell (2001) entnommen.

3.1.1 Kultivierung von Bakterien und Hefen

Für die Amplifikation von Plasmiden und für die Expression von GST- oder His₆-Fusionproteinen wurden Bakterien des *E.coli* Stammes DH5 α in LB-Medium angeimpft oder auf LB-Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Die Selektion erfolgte wahlweise durch Zugabe von 100 μ g/ml Ampicillin (Roth, Karlsruhe) oder 30 μ g/ml Kanamycin (Roth). Die Handhabung und Kultivierung der Hefen erfolgte analog der Bakterien mit Hilfe der beschriebenen Medien und Aminosäureselektionsmarkern bei 30 °C.

3.1.2 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

(modifiziert nach Inoue *et al.*, 1990)

Für die Bereitstellung chemokompetenter Bakterien wurde eine 500 ml Kultur logarithmisch wachsender *E. coli*-Zellen bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.45-0.75 abzentrifugiert (1000 g, 10 min, 4 °C), in 180 ml TFB-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 40 ml TFB-Puffer aufgenommen, unter Schütteln 3 ml DMSO zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Bakterien wurden dann aliquotiert (50 μ l Portionen), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot kompetenter Bakterien zusammen mit der zu transformierenden DNA (10 μ l Ligationsansatz oder 5-20 ng Plasmid-DNA) für 30 min auf Eis inkubiert. Es schloß sich ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C an, wonach der Ansatz für 5 min auf Eis abgekühlt wurde. Nach Zugabe von 800 μ l LB-Medium und Inkubation für 60 min bei 37 °C wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

TFB-Puffer: 10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, ad pH 6.7

3.1.3 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

(modifiziert nach Dower *et al.*, 1988)

Die Transformation der aus Hefezellen isolierten *prey*-Plasmid-DNA (Kap. 3.2.2) wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Für die Herstellung der elektrokompenten Bakterien wurde eine 1 l logarithmisch wachsende *E.coli*-Kultur ($OD_{600} = 0.5-0.6$) zentrifugiert (4000 g, 15 min, 4 °C) und 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen jeweils einmal mit kaltem H₂O und 10% Glycerol gewaschen und in 3 ml 10% Glycerol resuspendiert. Die Bakterien wurden dann kurz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu Portionen von 50 µl bei –80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurden 50 µl der elektrokompenten Bakterien mit 2 µl Plasmid-DNA vermischt. Die Transformation erfolgte anschließend in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (0.2 cm Elektrodenabstand; BioRad, München) bei 2.5 kV, 25 µF, 200 Ohm mittels des „Bio-Rad Gene Pulser“ (BioRad). Anschließend wurde der Ansatz mit 800 µl LB-Medium 60 min bei 37 °C zur Regeneration inkubiert und auf LB-Agarplatten ausplattiert.

3.1.4 Isolation von DNA

3.1.4.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen

(modifiziert nach Birnboim und Doly 1979)

Die schnelle, analytische Präparation kleiner Mengen an Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der Alkalischen Lyse und wurde zur qualitativen Analyse auf das gewünschte Ligationsprodukt/Plasmid verwendet.

1.5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (13000 Upm, 30 s), das Zellpellet in 300 µl P1-Puffer resuspendiert, mit 300 µl P2-Puffer versetzt und 5 min bei RT lysiert. Nach Zugabe von 300 µl P3-Puffer wurde der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (13000 Upm, 20 min, 4 °C). Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde mit 0.7 Vol. Isopropanol gefällt (5 min auf Eis), zentrifugiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Abschließend wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in 50 µl H₂O gelöst.

P1-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 µg/ml RNase A
P2-Puffer: 200 mM NaOH, 1% SDS
P3-Puffer: 3 M Kaliumacetat pH 5.5

Die präparative Plasmidisolierung erfolgte über DNA-Affinitätssäulen mittels des „JETSTAR Plasmid Maxi-Kit“ (Genomed, Bad Oeyenhausen) nach Angaben des Herstellers.

Die Präparation von DNA aus BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Klonen wurde mittels des „QIAGEN® Large-Construct Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

3.1.4.2 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen

(modifiziert nach Ramirez-Solis *et al.*, 1992)

Zur Isolation der genomischen DNA aus ES-Zellen (s.a. Kap. 3.5.3) wurden die auf gelatinisierten 96-Loch-Platten gewachsenen Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 50 µl ES-Lysepuffer/Loch bei 60 °C ü.N. in einer Feuchtkammer lysiert. Anschließend wurde zu jedem Loch 100 µl eiskalter 100%iger Ethanol mit 1/20 Vol. 3 M Natriumacetat gegeben, die DNA für 30 min bei RT gefällt und viermal mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde an der Luft getrocknet und dann bei 4 °C gelagert oder sofort für die Southern-Hybridisierung mit Restriktionsendonukleasen verdaut (Kap. 3.1.6).

ES-Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0.5% N-Lauroylsarcosin,
200 µg/ml Proteinase K

3.1.4.3 Isolation genomischer DNA aus Geweben

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde 0.5-1 cm Schwanzspitze in 500 µl Gewebe-Lysepuffer ü.N. bei 55 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 10 min, RT) wurde der Überstand mit 500 µl Isopropanol gefällt und einmal mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde in 200 µl TE-PufferI gelöst, erneut durch Zugabe von 3 Vol. 100% Ethanol und 1/10 Vol. 5 M NaCl gefällt und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde dann luftgetrocknet und in 100 µl TE-PufferII für 2 h bei 55 °C gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Gewebe-Lysepuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 400 µg/ml
Proteinase K

TE-PufferI: 10 mM Tris/HCl pH 8.5, 1 mM EDTA

TE-PufferII: 10 mM Tris/HCl pH 8.5, 0.1 mM EDTA

3.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(modifiziert nach Saiki *et al.*, 1985)

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte und zur gerichteten Mutagenese, z.B. zum Einführen von Mutationen bzw. Schnittstellen, wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Um eine möglichst hohe Genauigkeit der DNA-Polymerisation zu gewährleisten, wurde eine Polymerase mit 3'-5'-*proof-reading*-Aktivität (PWO; Roche, Mannheim) gewählt.

Die Homologie-Bereiche des konstitutiven *Targeting*-Konstruktes wurden aufgrund ihrer Größe und der benötigten Genauigkeit der Amplifikation mit einer *Long-Range*-Polymerase hergestellt („Expand Long Template PCR System“; Roche).

Die PCR-Reaktionen wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten 10x konzentrierten Puffer durchgeführt.

3.1.6 Restriktionsverdau von DNA und Dephosphorylierung

Die Spaltung von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) in den mitgelieferten Puffern durchgeführt. Pro Mikrogramm Plasmid-DNA wurden 1-5 U Restriktionsenzym eingesetzt und mindestens 3 h oder ü.N. inkubiert. Für den Restriktionsverdau genomischer DNA von ES-Zellen und Geweben wurde der Restriktionsansatz zusätzlich mit 100 µg/ml BSA und 50 µg/ml RNase versetzt.

Bei Klonierung eines DNA-Fragmentes über eine Restriktionsschnittstelle, die mehrfach in der Sequenz des DNA-Abschnittes vorkommt, bedurfte es eines „partiellen Restriktionsverdaus“ (nach Ausubel *et al.*, 1989). Prinzip dabei ist es, durch eine verkürzte Inkubationszeit und eine Verdünnungsreihe des Restriktionsenzym einen unvollständigen Verdau der vorgelegten DNA zu erreichen.

Nach Linearisierung eines Vektors sollte die Religation des Vektors ohne Einbau eines DNA-Fragmentes verhindert und somit die Effizienz der Ligation erhöht werden. Dafür wurde der Restriktionsansatz für 30 min (37 °C) mit alkalischer Phosphatase (1 U/5 µg DNA; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) behandelt, welche die 5'-Enden des linearisierten Vektors dephosphoryliert. Danach wurde die Phosphatase durch 15-minütiges Erhitzen (75 °C) inaktiviert.

Zur Isolation und Aufreinigung von Spaltprodukten wurden die DNA-Fragmente anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (Kap.3.1.8) und aus dem Gel isoliert (Kap.3.1.9).

3.1.7 Herstellung von glatten Enden an DNA-Fragmenten

Wiesen die DNA-Fragmente, die ligiert werden sollten, keine übereinstimmenden Restriktionsschnittstellen auf, so mußte bei überhängenden Enden (*sticky ends*) ein glattes Ende (*blunt end*) erzeugt werden. Zu diesem Zweck wurde dem Restriktionsansatz 5 U T4-DNA-Polymerase (NEB) und 2 µl dNTPs (10 mM) zugesetzt und die Reaktion 15 min bei RT und 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min.

3.1.8 Standard-Agarosegelelektrophorese

Die Analyse und Reinigung von DNA erfolgte durch horizontale Elektrophorese in 0.8%-2%igen Agarosegelen (0.8-2 g Agarose/100 ml 1x TAE, 0.5 µg/ml Ethidiumbromid). Die zuvor mit 1/10 Vol. 10x DNA-Probenpuffer versetzten DNA-Proben wurden bei 4-8 V/cm Laufstrecke in 1x TAE-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Anregung des interkalierenden Ethidiumbromids mit UV-Licht (254-366 nm) analysiert. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich mit der 1 kb-Leiter von Gibco/BRL (Eggenstein), eine Mengenabschätzung mit dem Molekulargewichtsmarker SmartLadder (Eurogentec, Seraing, Belgien).

TAE-Puffer (50x): 2 M Tris, 5.71% (v/v) Eisessig, 50 mM EDTA pH 8.0

3.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurde das jeweilige DNA-Fragment unter einer UV-Quelle rasch mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Unter Verwendung des „QIAquick™ Gel-Extraction Kit“ (Qiagen) wurde danach die DNA aus dem Agarosegel extrahiert.

3.1.10 Ligation von DNA

Die Verknüpfung von Vektor-DNA mit dem zu klonierenden DNA-Fragment erfolgte in einem 20 µl Ligationsansatz (1 U T4-DNA-Ligase, 2 µl 10x Ligationspuffer; Roche) ü.N. bei 16 °C. Vektor- und Donor-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt, wobei die Vektormenge in jedem Fall 50-150 ng betrug.

3.1.11 Sequenzierung und Sequenzanalysen

Die Sequenzierung der Plasmide wurde von der Firma Invitex (Berlin-Buch) nach der Methode von Sanger *et al.* (1977) mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (Tab. 2.4) durchgeführt. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Blast-N Programm (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast). Für weitergehende Analysen wurde der ExPaSy-Server (www.expasy.ch) verwendet.

3.1.12 Statistische Auswertungen

Die statistische Signifikanz von Meßergebnissen wurde mit dem ungepaarten zweiseitigen T-Test nach Student ermittelt. Die Nullhypothese wurde bei $p < 0.05$ verworfen. Konfidenzen < 0.05 wurden mit einem Stern und < 0.01 mit zwei Sternen gekennzeichnet.

3.1.13 Southern-Hybridisierung (Southernblot-Analyse)

3.1.13.1 Transfer von DNA auf Membranen

(modifiziert nach Southern 1975)

Die zu analysierende und zuvor mit Endonuklease behandelte DNA wurde in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (Kap. 3.1.8). Das Gel wurde zunächst 10 min mit 0.25 M HCl depuriniert, dann 30 min in Denaturierungslösung und 10 min in Neutralisierungslösung geschwenkt. Der Transfer erfolgte anschließend ü.N. in einem Sandwich bestehend aus zwei Lagen Whatman-Papier (Schleicher&Schuell, Dassel) mit Kontakt zu einem 10x SSC-Reservoir, dem Gel, der Nylonmembran (Hybond-N, Amersham), zwei Whatman-Papieren und mit einem Gewicht beschwerten Stapel Saugpapier. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen und die DNA mit UV-Licht (150 mJoule/cm²) fixiert.

<u>Denaturierungslösung:</u>	0.5 M NaOH, 1 M NaCl
<u>Neutralisierungslösung:</u>	0.5 M Tris/HCl pH 7.4, 3 M NaCl
<u>SSC-Lösung (20x):</u>	3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat

3.1.13.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Unter Verwendung des „Prime-It[®] II Random Primer Labeling Kits“ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) wurden 20 ng Plasmid-DNA mit 50 µCi [α -³²P]dATP oder [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol; NEN, Köln) nach Angaben des Herstellers markiert. Die Trennung der nun radioaktiv markierten DNA-Sonde von nicht eingebauten Nukleotiden erfolgte mit „MicroSpin[™] G-50 Columns“ (Amersham, Freiburg).

3.1.13.3 Hybridisierung

Die Hybridisierung der Nylonmembran wurde mit der „ExpressHyb[™] Hybridization Solution“ (Stratagene) in einem Rollerofen durchgeführt. Die Membran wurde zunächst 10 min bei 68 °C mit Hybridisierungslösung prähybridisiert und dann mit der radioaktiv markierten Sonde, die zuvor mit 1.5 mg Lachsspermien-DNA (Stratagene) aufgeköcht (5 min) wurde, inkubiert. Nach der Hybridisierung für 1 h bei 68 °C wurde die Membran einmal mit 2x SSC/0.1% SDS (20 min, RT), einmal mit 0.5x SSC/0.1% SDS (20 min, RT) und zweimal mit 0.2x SSC/0.1% SDS (30 min, 65 °C) gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit einer *Phosphoimager*-Platte entwickelt (Kap. 3.3.5).

3.1.14 Klonierungen

Alle in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte wurden durch Sequenzierung und, bei Vorliegen eines entsprechenden Promotors, nach Transfektion in HEK293-Zellen mittels Westernblot-Analysen verifiziert.

3.1.14.1 Klonierung der Expressionskonstrukte und murinen EBAG9-cDNAs

Bei der Cysteinmutante von EBAG9-GFP, EBAG9-GFP C12/14S, wurden nach dem Prinzip der „Overlap-Extension-PCR“ in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen Punktmutationen in die EBAG9-GFP-cDNA eingeführt, wodurch die Cysteine an Aminosäureposition 12 und 14 durch Serine ausgetauscht wurden (Abb. 3.1).

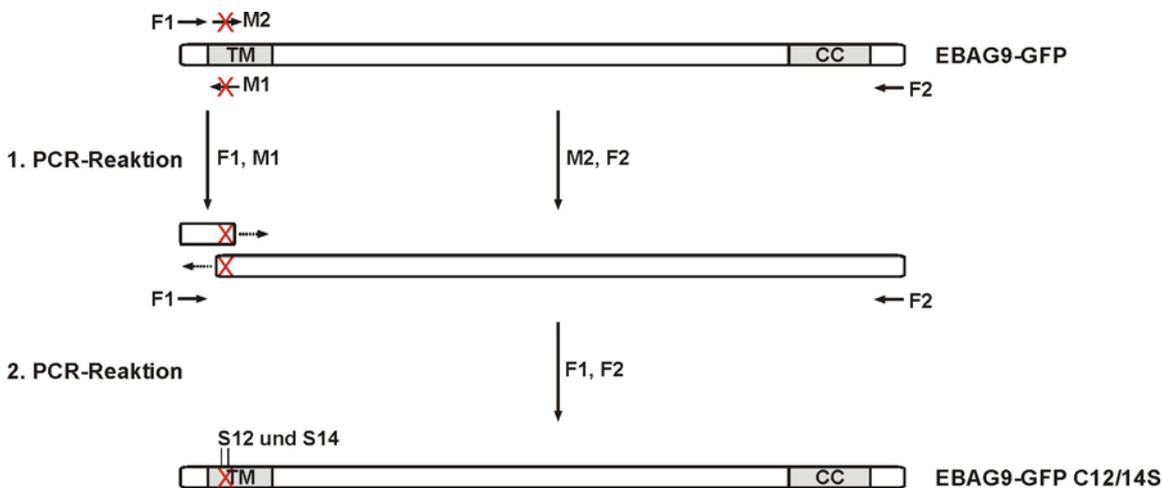


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Mutagenese durch „Overlap-Extension“-PCR.

Dargestellt ist die Generierung der Cystein-defizienten Mutante EBAG9-GFP C12/14S. M1 und M2, mutagene Primer. F1 und F2, Flankenprimer. TM, putative Transmembrandomäne; CC, putative *coiled-coil*-Domäne. Die Mutation wurde mit einem Kreuz markiert.

Dabei wurden unter Verwendung der mutagenen Primer M1 (M1-C12/14S) und M2 (M2-C12/14S) mit entgegengesetzter Orientierung und den zwei Flankenprimer F1 und F2 in der ersten PCR-Reaktion zwei überlappende DNA-Fragmente amplifiziert. Die so gebildeten Fragmente wurden dann zusammen in einer zweiten PCR eingesetzt, wobei die überlappenden Enden als Primer dienten und nur die äußeren Primer (F1 und F2) zugegeben wurden. Anschließend wurde diese mutierte cDNA über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *BamHI* in den pEGFP-N3 Vektor kloniert.

Die Austauschmutante EBAG9-GFP C12/14/27S, in der alle drei Cysteinreste des EBAG9-Moleküls durch Serine ausgetauscht sind, wurde wie oben mittels „Overlap-Extension-PCR“ generiert unter Verwendung von EBAG9-GFP C12/14S als Matrize und der mutagenen Primer M1-C27S und M2-C27S.

Die übrigen in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide (Tab. 2.2) wurden mittels Standard-PCR mit den in Tab. 2.6 aufgeführten Primern generiert. Die Ligation in den entsprechenden Vektor erfolgte über die durch die Primersequenz festgelegten Restriktionsschnittstellen. Für die Klonierung der Snapinkonstrukte diente die im Hefe-2-Hybrid-System aus der humanen cDNA-Bibliothek isolierte vollständige Snapin-cDNA (Kap. 4.1) als Matrize.

Die murinen cDNAs von EBAG9 wurden aus einer Hoden-cDNA-Bank der Firma Clontech („Multiple Tissue cDNA Panels“) amplifiziert und mittels des „pSTBlue-1 Perfectly Blunt™ Cloning Kit“ (Novagen) ungerichtet in den Vektor pSTBlue-1 kloniert.

3.1.14.2 Klonierung des konstitutiven *Targeting*-Konstrukts (s.a. Kap. 4.11.2)

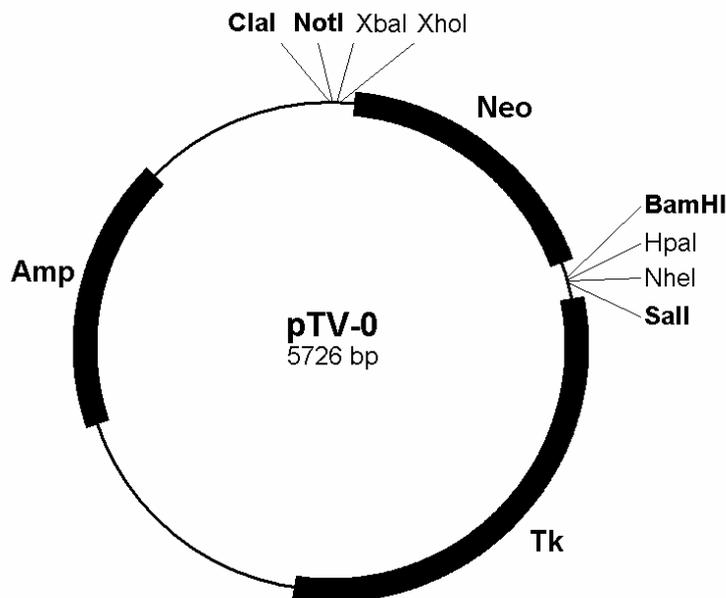


Abb. 3.2 Der Ausgangsvektor pTV-0 für die konstitutive Geninaktivierung.

Dargestellt sind die Restriktionsschnittstellen, die jeweils nur einmal im Vektor schneiden. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind fett markiert. Amp, Ampicillin-Resistenz; Neo, Neomycin-Kassette (positiver Selektionsmarker); Tk, Thymidinkinasegen (negativer Selektionsmarker).

Der Rekombinationsvektor für die konstitutive Geninaktivierung von EBAG9 basiert auf dem Vektor pTV-0 (Abb. 3.2), der neben einem Neomycin-Resistenzgen zudem eine Thymidinkinasekassette besitzt. Aus dem BAC-Klon P3 (Kap. 4.11.1) wurde der 5'-Rekombinationsarm mit den

Primern 5'-Arm_{pst}-s und 5'-Arm_{pst}-as amplifiziert und in den Vektor pSTBlue-1 unter Verwendung des „pSTBlue-1 Perfectly Blunt™ Cloning Kit“ (Novagen) kloniert (5'-Arm/pSTBlue-1). Der 3'-Rekombinationsarm wurde mittels „Long Range“-PCR (Kap. 3.1.5) mit den Primern 3'-Arm_{pgem}-s und 3'-Arm_{pgem}-as in den pGEM-T Easy-Vektor (3'-Arm/pGem-T) kloniert. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden die Homologiebereiche mit den Primern 5'-Arm_{ptv}-s und 5'-Arm_{ptv}-as bzw. 3'-Arm_{ptv}-s und 3'-Arm_{ptv}-as mit Restriktionsschnittstellen versehen und über die Restriktionsschnittstellen *ClaI/NotI* für den 5'-Rekombinationsarm bzw. über *Sall* für den 3'-Rekombinationsarm in den Vektor pTV-0 ligiert.

3.1.14.3 Klonierung des konditionellen *Targeting*-Konstrukts (s.a. Kap. 4.11.4)

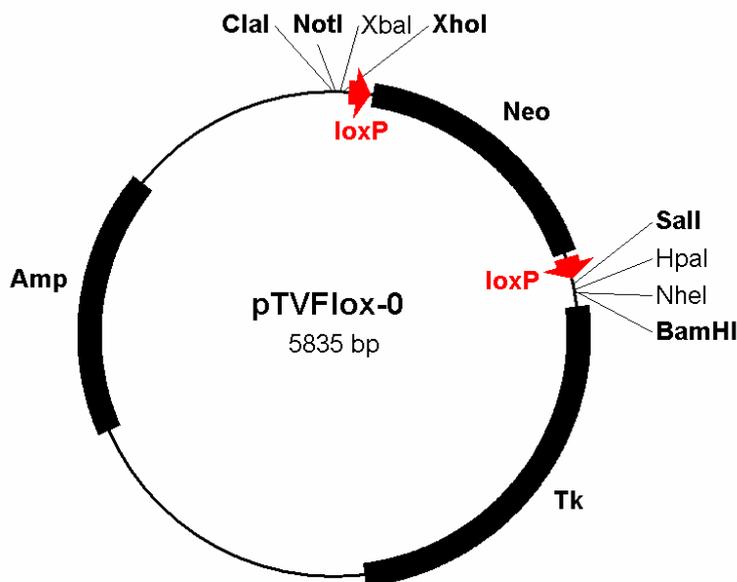


Abb. 3.3 Der konditionelle Rekombinationsvektor pTVFlox-0.

Dargestellt sind die Restriktionsschnittstellen, die jeweils nur einmal im Vektor schneiden. Die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind fett markiert. Amp, Ampicillin-Resistenz; loxP, loxP-Erkennungssequenz für Cre-Rekombinase; Neo, Neomycin-Kassette (positiver Selektionsmarker); Tk, Thymidinkinase (negativer Selektionsmarker).

Für die Konstruktion des induzierbaren Rekombinationsvektors wurde ein 12 kb großes *Apal/BamHI*-Fragment aus dem BAC-Klon P3 in pBluescriptII SK umklontiert. Als 5'-Rekombinationsarm wurde ein partielles *EcoRI/SacI*-Fragment (2.2 kb) verwendet, am 3'-Ende mit einem loxP-Element versehen und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *ClaI/NotI* in den konditionellen Rekombinationsvektor pTVFlox-0 (Abb. 3.3) eingefügt. Ein *SacI/EcoRV*-Fragment (5 kb), das die Exons 2-4 des EBAG9-Gens enthält, wurde *blunt* in den Vektor pSTBlue-1

subkloniert, der zuvor mit *SacI*/*AvrII* linearisiert und mit glatten Enden versehen wurde. Anschließend wurde das Fragment stromaufwärts der Neomycin-Kassette unter Verwendung der Schnittstellen *NotI*/*XhoI* in pTVFlox-0 ligiert. Der 3'-Rekombinationsarm, ein *EcoRV*/*BamHI*-Fragment mit einer Länge von 3.8 kb, wurde ebenfalls zunächst in pSTBlue-1 subkloniert und dann stromabwärts der bereits geflochtenen Neomycin-Kassette über die *SalI*-Schnittstelle des Vektors pTVFlox-0 integriert. Die Abb. 3.4 zeigt die Klonierungsstrategie.

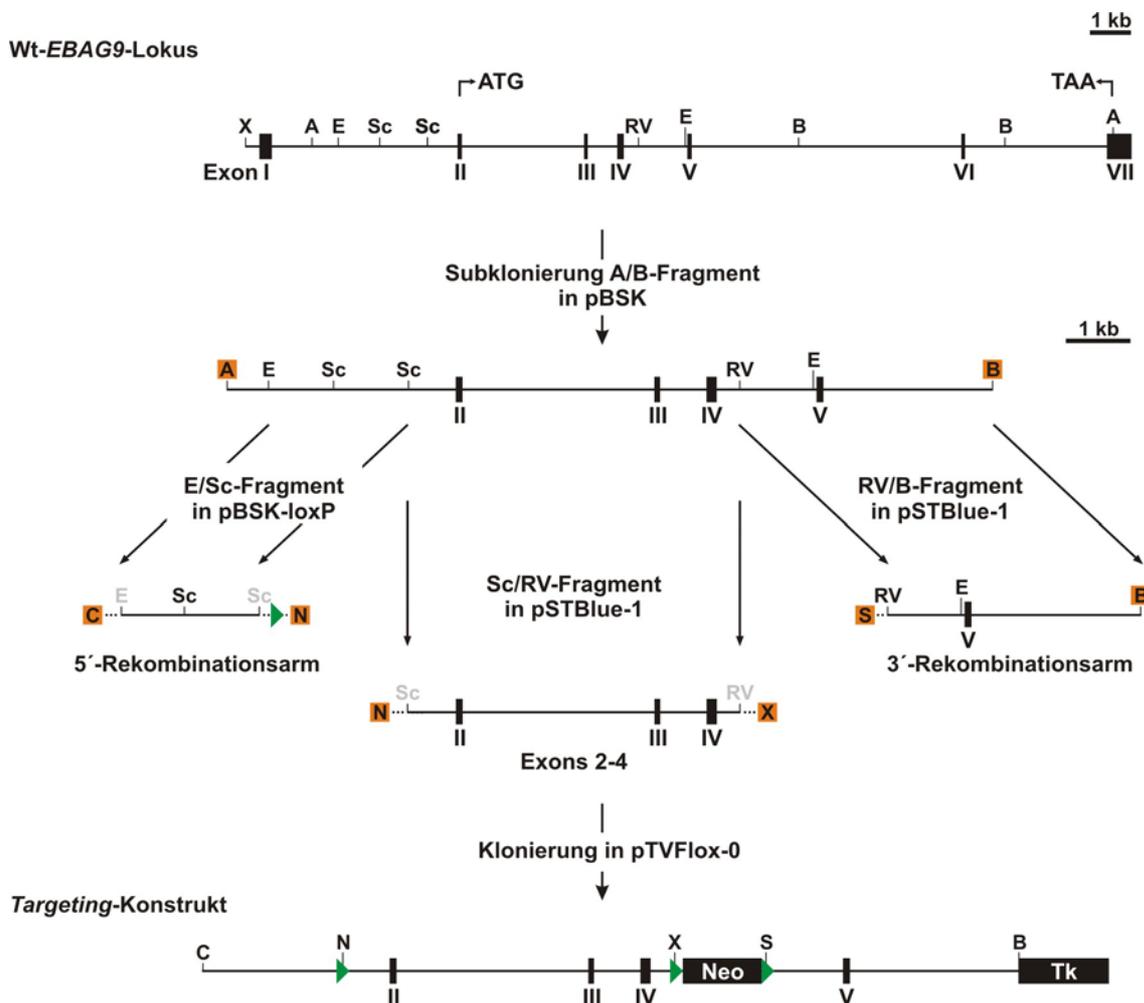


Abb. 3.4 Klonierung des induzierbaren Targeting-Konstrukts.

Schematische Darstellung der Struktur des Wt-EBAG9-Lokus und der einzelnen Klonierungsschritte zur Herstellung des konditionellen Rekombinationsvektors. Die Exons sind durch schwarze Boxen und die Introns durch Linien repräsentiert. Die gestrichelten Linien stellen Sequenzbereiche der Klonierungsvektoren dar. Die loxP-Sequenzen sind durch grüne Dreiecke hervorgehoben. Neo, Neomycin-Kassette; Tk, Thymidinkinasegen; pBSK, pBluescriptII SK; A, *ApaI*; B, *BamHI*; E, *EcoRI*; N, *NotI*; RV, *EcoRV*; S, *SalI*; Sc, *SacI*; X, *XhoI*.

3.1.14.4 Klonierung der 5'-und 3'-Sonde für die Southernblot-Analyse

Zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellen für die konstitutive und induzierbare Geninaktivierung von EBAG9 wurde eine $\approx 610\text{bp}$ große 5'-Sonde stromaufwärts des Rekombinationsvektors (5' von Exon 2) verwendet. Dieser Basenabschnitt wurde über die *EcoRI/SacI*-Restriktionsschnittstellen aus 5'-Arm/pSTBlue-1 (Kap. 3.1.14.2) in pBluescriptII SK kloniert.

Ein 660bp-Fragment stromabwärts des *Targeting*-Konstrukts (3' von Exon 5) wurde unter Verwendung der Schnittstellen *EcoRV/EcoRI* aus 3'-Arm/pGem-T (Kap. 3.1.14.2) in pBluescriptII SK umklont und als 3'-Sonde für die Southernblot-Analyse benutzt.

3.2 Das Hefe-2-Hybrid-System

Zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen wurde das Hefe-2-Hybrid-System unter Verwendung der Plasmide des „MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3“ (Clontech) angewendet (Fields und Song 1989).

Grundlage für diese Methode ist die räumliche Trennung der funktionellen Domänen des Transkriptionsfaktors GAL4. Die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD) wird durch den *bait*-Vektor pGBKT7 (*Trp1*⁺) kodiert und wird mit der cDNA eines bekannten Proteins X (*bait*: engl. Köder) fusioniert. Die DNA-Bindungsdomäne erkennt die *upstream activating sequence* (UAS) stromaufwärts der GAL4 kontrollierten Gene. Die cDNAs einer cDNA-Bibliothek (*preys*: engl. Beute) werden mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) verknüpft, welche durch die *prey*-Vektoren pGADT7 oder pACT (*Leu2*⁺) kodiert werden. Die Aktivierungsdomäne interagiert mit Komponenten des RNA-PolymeraseII-Komplexes und induziert dadurch die Transkription dieser Gene, wenn die beiden Domänen in räumliche Nähe gebracht werden. Werden beide Konstrukte in Hefezellen des Stammes AH109 exprimiert, der auxotroph für die Biosynthese von Trp, Leu, Ade und His ist, und kommt es zu einer Interaktion zwischen dem *bait*-Protein X und einem *prey* der cDNA-Bank (Protein Y), so wird der GAL4-Transkriptionsfaktor rekonstituiert. Dies führt dann zur Transkription der unter Kontrolle des GAL4-Transkriptionsfaktors stehenden Reportergene (*His3*, *Ade2*, *Mell*, *lacZ*). Diese Hefeklonen können dann auf Histidin/Adenin-freiem Nährmedium wachsen und lassen sich durch X- α -Gal blau anfärben (Abb. 3.5B). Die Interaktionsstärke läßt sich zudem durch einen quantitativen β -Galaktosidase-Test (Kap. 3.2.3) bestimmen. Die physikalisch getrennten Domänen alleine sind hingegen nicht in der Lage, die Transkription von Genen einzuleiten (Abb. 3.5A).

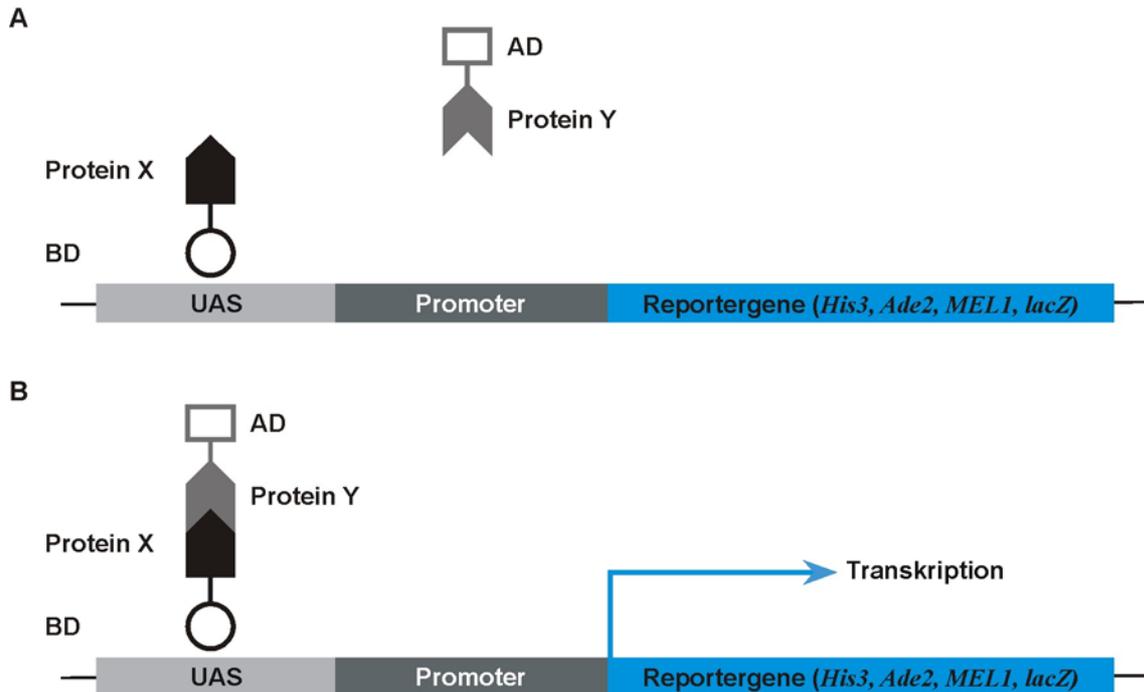


Abb. 3.5 Modell des Hefe-2-Hybrid-Systems.

(A) Die beiden Fusionsproteine BD-Protein X, bestehend aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne (BD) und Protein X und AD-Protein Y, bestehend aus der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) und Protein-Y werden im Hefestamm AH109 exprimiert. Das Hybridmolekül BD-Protein X bindet an die UAS (*upstream activating sequence*), was alleine - ohne Interaktion mit AD-Protein Y - aber nicht zu einer Expression der Reportergene führt. (B) Die Interaktion des Hybrids AD-Protein Y mit BD-Protein X führt zur Ausbildung eines voll funktionsfähigen Transkriptionsaktivators und initiiert die Transkription der Reportergene.

In dieser Arbeit wurde humanes EBAG9 als *bait* im Vektor pGBKT7, der die GAL4 DNA-Bindungsdomäne enthält, verwendet (BD-EBAG9). Als cDNA-Bibliothek diente die „brain cDNA library“ von Clontech, die in dem GAL4-Aktivierungsdomäne enthaltenden *prey*-Vektor pACT2 kloniert vorlag (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Hans-Jörg Schäffer, MDC, Berlin).

3.2.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

(modifiziert nach Gietz *et al.*, 1992)

Der Hefestamm AH109 wurde in 1 ml YPD-Medium bei 30 °C ü.N. unter Schütteln angezogen und am nächsten Tag in 4 ml YPD-Medium verdünnt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.5 wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 Upm, 5 min, RT), einmal mit LiAc-Puffer gewaschen und in 100 µl LiAc-Puffer resuspendiert. Für die Transformation wurden 12 µl Hefesuspension, 8 µl *bait*-Plasmid-DNA (100 ng/µl) und 45 µl PEG-Lösung gemischt und kurz gevortext. Nach einer Inkubation für 90 min bei 30 °C unter Schütteln (300 Upm) erfolgte ein Hitzeschock unter Zugabe

von 1/10 Vol. DMSO für 15 min bei 42 °C. Die Zellen wurden dann einmal mit H₂O gewaschen und auf SD(-Trp)-Agarplatten ausplattiert.

Die sequentielle Transformation der cDNA-Bibliothek erfolgte prinzipiell wie die Transformation der *bait*-Plasmid-DNA. Eine 1 l SD(-Trp)-Flüssigkultur des *bait*-Plasmid tragenden Hefeklons wurde auf eine OD₆₀₀ von 0.5 eingestellt und in 8 ml LiAc-Puffer aufgenommen. Die Transformation erfolgte unter Zugabe von 500 µg der cDNA-Bibliothek, 20 mg Lachssperma-DNA und 60 ml PEG-Lösung. Anschließend wurden die Hefen auf dreißig 150 mm-SD(-Trp, -Leu, -His, -Ade, X-α-Gal)-Agarplatten ausgestrichen, und nach 3-4 Tagen konnten die putativen Interaktionsklone isoliert werden. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurden Verdünnungen von 1:1000, 1:10000 auf SD(-Trp, -Leu) ausgestrichen.

LiAc-Puffer: 0.1 M LiAc/TE pH 7.5
PEG-Lösung: 40% PEG4000 in LiAc-Puffer

3.2.2 Plasmidisolation der *prey*-Plasmide aus Hefen

Die Interaktionsklone (3.2.1) wurden in 5 ml SD(-Leu)-Medium bei 30°C ü.N. kultiviert und am folgenden Morgen abzentrifugiert (4000 g, 10 min, RT). Das Zellpellet wurde in 0.2 ml Hefe-Lysepuffer resuspendiert und mit 0.2 ml Phenol/Chloroform (1:1) und 0.3 g Glas-Beads (Sigma) versetzt. Der Ansatz wurde 2 min stark gevortext und dann bei 13000 Upm für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde dann mit 0.7 Vol. Isopropanol gefällt (13000 Upm, 20 min, 4 °C), das DNA-Pellet zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 10 µl H₂O gelöst. 2 µl der *prey*-Plasmid-DNA wurde dann in elektrokompetente Bakterien durch Elektroporation (Kap. 3.1.3) transformiert und anschließend die Plasmid-DNA isoliert.

Hefe-Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 2% TX-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0

3.2.3 Quantitative Bestimmung der β-Galaktosidaseaktivität

Die Affinität zweier Bindungspartner korreliert mit der Aktivierung der Reportergene und läßt sich daher anhand der β-Galaktosidaseaktivität abschätzen. Dabei wird der Umsatz von ONPG (o-Nitrophenylgalactopyranosid) zu o-Nitrophenyl photometrisch analysiert.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden drei verschiedene Kolonien des Hefeklons in 2 ml-Kulturen ü.N. angezogen und am nächsten Morgen mit 8 ml Selektionsmedium versetzt. Nach einer weiteren 3-5-stündigen Inkubation wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt und sollte in der Regel zwischen 0.3 und 0.8 liegen. Dann wurden 1.5 ml der Kulturen abzentrifugiert (2000 Upm,

5 min) und in 0.3 ml Z-Puffer resuspendiert (Konzentrationsfaktor=5). Durch mehrfaches Einfrieren in flüssigem Stickstoff (1 min) und Auftauen (37 °C, 1 min) wurden die Zellen permeabilisiert und 0.1 ml dieser Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden die Reaktionsansätze mit 0.7 ml Z-Puffer (mit 50 mM β -Mercaptoethanol) und 0.16 ml ONPG-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer; Sigma) versetzt und bis zur Gelbfärbung bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.4 ml 1 M Na_2CO_3 abgestoppt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (13000 Upm, 10 min) entfernt. Die Enzymaktivität des Überstandes wurde durch Messung der Extinktion bei 420 nm ermittelt und mit folgender Formel berechnet (t = Reaktionszeit in min, $V = 0.1 \text{ ml} \cdot \text{Konzentrationsfaktor}$):

$$\beta\text{-Galactosidaseaktivität [U]} = 1000 \cdot \frac{OD_{420}}{OD_{600} \cdot V \cdot T}$$

Z-Puffer: 60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , ad pH 7.0

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellung rekombinanter Fusionsproteine

Für die bakterielle Expression von GST-Fusionsproteinen und von His₆-Fusionsproteinen in *E.coli* DH5 α wurden die Vektoren pGEX-4T-1 (bzw. pGEX-2T) (Amersham) bzw. pQE-32 (Qiagen) verwendet, welche den entsprechenden Fusionsanteil N-terminal kodieren.

Eine 200 ml Bakterienkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 kultiviert, bevor die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert wurde. Nach 3 h Induktion wurden die Bakterien abzentrifugiert (3000 g, 15 min, 4 °C) und in 10 ml TBS-Puffer aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Ultraschall (10 Impulse bei 50% Leistung) und anschließender Inkubation mit 0.5% TX-100 (30 min, 4 °C). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (7000 g, 30 min, 4°C) entfernt. Für die Aufreinigung der GST- und His₆-Fusionsproteine wurden die Überstände mit 200 μl äquilibrierter Glutathion-Sepharose bzw. Ni²⁺-Nitrilotriessigsäure (NTA)-Agarose 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit dem gebundenen GST-Fusionsprotein bzw. die NTA-Agarose im Komplex mit dem His₆-Fusionsprotein abzentrifugiert (5000 g, 1 min, 4 °C). Nach fünfmaligem Waschen mit TBS wurden die Sepharose- bzw. NTA-Agarose-Proteinkomplexe in 400 μl TBS aufgenommen und in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2 *In vitro* Transkription und Translation

In vitro Transkription

Die *in vitro* Transkription ermöglicht die zellfreie Synthese von mRNA im µg-Maßstab von einer Matrizen-DNA. Die dafür geeigneten Vektoren (pBluescriptII SK(-), pcDNA3.1(+), pGEM-T Easy, pSTBlue-1) besitzen einen T3, T7 oder SP6-Promotor. Zur Erhöhung der Transkriptionseffizienz und Transkriptbegrenzung wurde die Matrizen-DNA zuvor mittels Restriktionsverdau linearisiert (Kap. 3.1.6) und im Agarosegel aufgereinigt (Kap. 3.1.9). Anschließend erfolgte die Transkription mit dem „Riboprobe[®] *in vitro* Transcription System“ (Promega, Mannheim) gemäß Herstellerangaben und nachfolgender Rezeptur (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Ein typischer Transkriptionsansatz

Transkriptionspuffer (5x)	20 µl
100 mM DTT	10 µl
RNasin (40 U/µl)	2.5 µl
ATP, CTP, GTP, UTP (je 2.5 mM)	20 µl
Matrizen-DNA (1-2 µg/µl)	1 µl
RNA-Polymerase (20 U/µl)	2 µl
DEPC-H ₂ O	44.5 µl

Der Ansatz wurde 90 min bei 37 °C inkubiert, wobei nach 30 min nochmals 10 U RNA-Polymerase zugegeben wurde. Zum Entfernen der Matrizen-DNA wurde der Ansatz mit 2 U DNase versetzt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Der Transkriptionsansatz wurde dann mit 2.5 Vol. 100% Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5.2 versehen und 60 min bei -80 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (13000 Upm, 10 min, 4 °C) und viermaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die RNA in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

In vitro Translation

Die *in vitro* Translation der zuvor transkribierten mRNA erfolgte mit Hilfe von Kaninchen-Retikulozytenlysat, welches alle für die Proteinbiosynthese notwendigen Komponenten enthält. Gleichzeitig wurden die synthetisierten Proteine mit [³⁵S]Methionin/Cystein (1175 Ci/mmol; PerkinElmer) markiert. Die Translation wurde in 90 min bei 30 °C unter Verwendung des „Flexi[®]

Rabbit Reticulocyte Lysate System“ (Promega) durchgeführt. Einen typischen Translationsansatz zeigt die Tab. 3.2. Die mRNA wurde vor der Translation für 4 min bei 65 °C denaturiert.

Tab. 3.2 Ein typischer Translationsansatz

Retikulozytenlysat	17.5 µl
Aminosäure-Mix ohne Methionin	0.5 µl
RNasin (40 U/µl)	0.5 µl
2.5 M KCl	0.8 µl
[³⁵ S]Methionin/Cystein (10 µCi/µl)	2 µl
mRNA aus Transkription	1 µl ≈ 1 µg
DEPC-H ₂ O	1.5 µl

Die so synthetisierten Proteine wurden für Bindungsexperimente eingesetzt (Kap. 3.4.6) oder sofort in einer SDS-PAGE (Kap. 3.3.3) mit anschließender Autoradiographie (Kap. 3.3.5) analysiert.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(modifiziert nach Laemmli 1970)

Die Proben wurden vor dem Gellauf mit 2x Protein-Probenpuffer versetzt und für 5 min gekocht. Die Proteintrennung wurde in der Regel in einem 12.5%igem Trenngel durchgeführt, ein 4.5%iges Sammelgel diente der Fokussierung der Proben. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „Rainbow™ coloured protein molecular weight marker, high molecular weight range“ (Amersham) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laemmli-Laufpuffer bei 5-8V/cm. Trenn- und Sammelgele wurden gemäß den nachstehenden Rezepturen hergestellt (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamidgelen

	12% Trenngel	4.5% Sammelgel
H ₂ O	16.75 ml	7.5 ml
Rotiphorese® Gel30 (30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid; Roth)	20.75 ml	1.875 ml
1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 0.4% SDS	12.5 ml	-
0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 0.4% SDS	-	3.125 ml
10% APS	250 µl	90 µl
TEMED (Roth)	25 µl	9 µl

10x Laemmli-Laufpuffer: 250 mM Tris, 2.5 M Glycin, 1% SDS

3.3.4 Coomassiefärbung

Zur Kontrolle von rekombinanten Proteinen wurde das SDS-PAGE-Gel 2 h in Coomassie-Lösung geschwenkt und danach mehrere Stunden lang entfärbt. Anschließend wurde das Gel in einem Gelrockner für 2 h auf Whatman-Papier (Schleicher&Schuell) bei 68 °C unter Vakuum getrocknet.

Coomassie-Lösung: 0.25% w/v Coomassie-Brilliant Blue R (Sigma), 10% Essigsäure, 45% Methanol
Entfärbelösung: 10% Essigsäure, 20% Ethanol

3.3.5 Autoradiographie

Radioaktive Proteine oder radioaktiv-markierte DNA-Fragmente wurden durch Exposition von Röntgenfilmen (Kodak X-OMAT AR) bei -80 °C und anschließender fotografischer Entwicklung oder durch Auflegen einer *Phosphoimager*-Platte (Fuji) sichtbar gemacht. Die *Imager*-Platte wurde danach mit dem „Fujix BAS 2000 Phospho-Imager“ (Fuji) analysiert.

Zur Erhöhung der Nachweisgrenze von [³⁵S]-markierten Proteinen wurde nach Beendigung des elektrophoretischen Laufes das Gel mit dem Szintillator PPO (2,5-Diphenyloxazol; Roth) behandelt. Dafür wurde das Gel zuvor durch zweimalige Behandlung (30 min) mit DMSO entwässert und anschließend 1 h mit PPO (220 g/l DMSO) inkubiert. Durch nachfolgendes 30-minütiges Wässern wurde das PPO ausgefällt. Im folgenden Schritt wurde das Gel getrocknet (s. oben).

Für [³H]palmitylierte Proteine hingegen wurde der Szintillator Salicylat verwendet. Dafür wurde das Gel 1 h fixiert (10% Essigsäure, 10% Methanol), anschließend dreimal für 30 min gewässert und 30 min in 1 M Salicylat geschwenkt.

3.3.6 Immunblot (Westernblot-Analyse)

3.3.6.1 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Westernblot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einer SDS-PAGE wurden die Proteine im Naßverfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell) in einer „Trans-Blot®SD“ Westernblotkammer (BioRad) gemäß Herstellerangaben bei 80 mA ü.N. oder bei 400 mA für 2 h in Westernblot-Transferpuffer transferiert.

Westernblot-Transferpuffer: 20% Methanol, 1x Laemmli-Laufpuffer (Kap. 3.3.3)

3.3.6.2 Immunologische Identifizierung von Proteinen

Die Nitrozellulosemembran wurde zunächst 30 min in PBST mit 5% Milchpulver geschwenkt, um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen. Danach wurde die Membran mit dem Primärantikörper nach Herstellerangaben in 1% Milchpulver/PBST verdünnt und 1 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 15 min mit PBST wurde die Membran dann mit dem sekundären, in der Regel Peroxidase-gekoppelten Antikörper 1 h geschüttelt und anschließend mit PBST gewaschen (4x 15 min). Der Chemilumineszenznachweis der Proteine erfolgte mit dem ECL-System nach Angaben des Herstellers (Amersham). Abschließend wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT LS) exponiert und entwickelt.

Um die Membran für verschiedene Analysen verwenden zu können, wurde diese in 0.1 M Glycin (pH 2.5) für 30 min geschwenkt und dadurch auf der Membran gebundene Antikörper abgelöst. Nach zweimaligem Waschen mit H₂O konnte die Membran erneut verwendet werden.

3.3.7 *In vitro*-Kinasereaktion

Für den insgesamt 25 µl großen Phosphorylierungsansatz wurden 1 U/µl PKA (Promega) oder CKII (NEB) für 10 min bei 30 °C im entsprechenden Kinasepuffer inkubiert. Danach wurden 2 µCi [γ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol; PerkinElmer) und jeweils 2 µg der GST- bzw. His₆-Fusionsproteine zugesetzt und die Reaktion für 30 min bei 30 °C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde aufgereinigtes Casein (Sigma) mitgeführt. Durch Zugabe von 2x Protein-Probenpuffer wurde die Reaktion abgestoppt und die Proteine danach in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung angefärbt (Kap. 3.3.4). Der Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat wurde autoradiographisch visualisiert und anschließend quantifiziert (Kap. 3.3.8). Die Phosphorylierungsniveaus der einzelnen Proteine wurden auf die im Gel geladenen Proteinmengen unter Berücksichtigung der Molaren Masse normalisiert.

<u>PKA-Kinasepuffer:</u>	40 mM Tris/HCl pH 7.4, 2 mM Mg-Acetat, 80 µM ATP
<u>CKII-Kinasepuffer</u>	20 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 80 µM ATP

3.3.8 Quantifizierung von Protein-Banden

Die densitometrische Auswertung von Proteinbanden wurde unter Verwendung des Computerprogrammes „Tina 2.0“ (Raytest) durchgeführt. Die ausgelesenen Intensitätswerte wurden um die Hintergrundintensität korrigiert.

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von Säugetierzellen (s.a. Kap. 2.8)

Die Kultivierung von Zellen erfolgte bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in der Regel in DMEM-Medium mit 10% FCS (inaktiviert für 20 min bei 55°C; PAA, Cölbe). PC12-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% PS (Pferdeserum; PAA) und 10% FCS auf Kollagen-beschichteten Kulturplatten (10 µg/ml Kollagen Typ I (Sigma) in 0.1 M Essigsäure) kultiviert, embryonale Fibroblasten und Stammzellen hingegen in speziellen Medien (Kap. 2.8). Aus Mausgeweben isolierte Primärzellen (T-Zellen oder Mastzellen) wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 1:3 bis 1:5 passagiert, wofür adhärenente Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsinlösung vom Boden gelöst und in frischem Medium resuspendiert wurden. Zur Kryokonservierung wurden Zellen in einer Konzentration von ca. 5×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

3.4.2 Transfektion von Säugetierzellen

Zur transienten Expression von Fremdgenen in HEK293- oder HeLa-Zellen wurden $2-5 \times 10^6$ Zellen in 500 µl serumfreiem DMEM mit 10-20 µg DNA in einer Elektroporationsküvette (0.4 cm Elektrodenabstand; BioRad) vermischt. Nach Elektroporation bei 170 V und 960 µF wurden die Zellen auf 100 mm- oder 150 mm-Kulturplatten ausgesät. Nach in der Regel 16-36 h wurden die Zellen für Experimente verwendet. Für Palmitoylierungsexperimente wurden HEK293-Zellen unter Verwendung des Fugene6-Reagenz (Roche) transfiziert.

PC12-Zellen wurden mit „Lipofectamin 2000“ (Invitrogen, Karlsruhe) mit einem DNA:Lipid-Verhältnis von 1:3 in OptiMEM (Gibco/BRL) transfiziert.

3.4.3 Isolierung und Kultivierung primärer muriner Zellen

3.4.3.1 Isolierung von Milzzellen und Aktivierung von T-Zellen *in vitro* (MLR)

Die Milz einer Maus wurde steril präpariert und in PBS mit dem Stempel einer sterilen 2 ml Einmalspritze zerrieben. Die Zellen wurden zentrifugiert (1200 Upm, 3 min), einmal mit PBS

gewaschen und in Erythrozyten-Lysepuffer für 3 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Medium aufgenommen und auf eine Dichte von 4×10^6 /ml eingestellt.

Zur Aktivierung von T-Zellen wurde eine gemischte Lymphozyten-Reaktion durchgeführt (*mixed lymphocyte reaction*, MLR). Als Stimulatorzellen wurden Milzzellen aus Balb/c Mäusen (d-Haplotyp), die zuvor mit einer ^{137}Cs -Quelle bestrahlt (3000 rad) wurden, in einem Verhältnis von 1:1 mit den *Responderzellen* zusammengegeben und 5 Tage in aufrecht stehenden 25 cm²-Kulturflaschen in einer Dichte von 4×10^6 Zellen/ml inkubiert. Die Aufreinigung von T-Zellen aus einer MLR erfolgte über einen Ficoll-Gradienten. Dazu wurden die Zellen über 7 ml Ficoll (Biocoll; Biochrom, Berlin) geschichtet und für 30 min zentrifugiert (1800 g, RT, ohne Bremse). Der Lymphozytenring (Interphase) wurde entnommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. CD8⁺-T-Zellen wurden anschließend durch Depletion von CD4⁺-T-Zellen und B-Zellen mit Hilfe von magnetischen anti-CD4- bzw. anti-B220-Micro-Beads (Dynabeads; Dynal, Hamburg) nach Angaben des Herstellers angereichert.

Erythrozyten-Lysepuffer (10x): 1.55 M NH₄Cl, 0.1 M KHCO₃, 1 mM EDTA, ad pH 7.4

3.4.3.2 Isolierung und Anreicherung von Mastzellen aus dem Knochenmark

Nach Abtöten einer Maus wurden die Ober- und Unterschenkelknochen freipräpariert und mit einem Skalpell vom Muskel befreit. Anschließend wurden die Knochen in 70% Ethanol sterilisiert, in PBS überführt und angeschnitten. Das Knochenmark wurde dann mit einer Medium-gefüllten Spritze herausgespült und in RPMI-Medium resuspendiert.

Zur Anreicherung und Ausreifung der Mastzellpopulation wurden die Zellen für vier Wochen in RPMI-Medium mit 50 U/ml IL-3 (PeproTech, Rocky Hill, USA) und 12.5 ng/ml SCF (PeproTech) kultiviert. Durch Plattenadhärenz wurde ein Großteil von B-Zellen, dendritischen Zellen und Monozyten depletiert, wofür alle 7 Tage die nicht-adhärenenten Zellen in neue Kulturflaschen umgesetzt wurden. Die nicht-adhärenenten Zellen enthalten vor allem Mastzellen und deren Vorläufer. Der Ausreifungsgrad und Reinheitsgrad wurde anschließend in der Durchflußzytometrie unter Verwendung der Mastzellmarker CD117 und FcεR1 analysiert (Kap. 3.4.10).

3.4.4 Metabolische Markierung von Proteinen mit Radioisotopen

3.4.4.1 Pulse-Chase-Experimente und EndoH-Verdau

$0.5-1 \times 10^7$ Zellen wurden 60 min in 5 ml RPMI-Medium (5% FCS) ohne Methionin und Cystein (PAA) ausgehungert. Nach Zentrifugation (1200 Upm, 2 min) wurden die Zellen in 500 μ l Methionin- und Cystein-freiem RPMI resuspendiert. Die Markierung mit 250 μ Ci [35 S]Methionin/Cystein (1175 Ci/mmol; PerkinElmer) erfolgte für 10-30 min (*Pulse*) und wurde durch Zugabe von Medium (1 ml/Zeitpunkt) mit einem Überschuß an unmarkiertem Methionin (1.5 mM) und Cystein (0.5 mM) unterbunden. Zu unterschiedlichen Zeiten (*Chase*) wurde 1 ml der Ansätze entnommen und sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in NP40-Lysepuffer solubilisiert und das gewünschte Protein immunpräzipitiert (Kap. 3.4.9).

Für die Untersuchung des ER-Golgi-Transports wurden die Immunpräzipitate der MHC Klasse I schweren Ketten mit der Endoglykosidase H (EndoH_f; NEB) nach Angaben des Herstellers verdaut.

3.4.4.2 Markierung mit [32 P]Orthophosphat

2×10^6 HEK293-Zellen wurden mit Hepes-Puffer (20 mM Hepes pH 7.2, 140 mM NaCl) gewaschen und in phosphat- und serumfreiem DMEM-Medium kultiviert. Nach 1 h wurden die Zellen in 1 ml frischem Medium mit 500 μ Ci [32 P]Orthophosphat (ICN, Eschwege) resuspendiert und 1 h bei 37 °C inkubiert, wonach sich eine 10-minütige Stimulation mit 30 ng/ml PMA oder 40 μ M Forskolin (Calbiochem, Bad Soden) anschloß oder sie blieben unstimuliert. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und in RIPA-Lysepuffer lysiert.

3.4.4.3 Markierung mit [3 H]Palmitinsäure

2×10^6 Zellen wurden in DMEM-Medium (mit 5% an Aktivkohle absorbiertem FCS) ü.N. ausgehungert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen für 4 h mit 400 μ Ci/ml [9,10- 3 H]Palmitinsäure (57 Ci/mmol; PerkinElmer) inkubiert. Die in ethanolischer Lösung vorliegende Palmitinsäure wurde dazu zuvor in einer Speedvac eingeengt und in einem kleinen Volumen DMSO gelöst. Nach Beendigung der Markierung wurden die Zellen in TX-100-Lysepuffer solubilisiert.

3.4.5 Herstellung von Zellysaten

Zur Präparation von Zellysaten/Zellextrakten wurden die Zellen geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte wahlweise in eiskaltem CHAPS-, NP40-, RIPA- oder TX-100-

Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (Kap. 2.8) für 30 min bei 4 °C unter Rotation. Zellkerne und andere unlösliche Zellbestandteile wurden durch eine Zentrifugation (13000 g, 10 min, 4 °C) entfernt. Das Zellsolubilisat wurde entweder sofort in einer SDS-PAGE analysiert oder für (Ko-)Immunpräzipitationsanalysen (Kap. 3.4.9) und *in vitro*-Bindungsexperimente (Kap. 3.4.6) verwendet. Wenn erforderlich wurde die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit dem „BIO-RAD Protein Assay“ (BioRad) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde BSA als Standard verwendet.

3.4.6 Bindungsexperimente mit GST-Fusionsproteinen (GST-Pulldown)

Für die Bindungsassays mit GST-Fusionsproteinen wurden entweder Zellysate oder *in vitro* translatierte Proteine verwendet. Das Volumen der *in vitro* Translationsansätze wurde dafür mit 500 µl Lysepuffer aufgefüllt.

Zellysate oder *in vitro* Translationsansätze wurden im jeweiligen Lysepuffer mit an Glutathion-Sepharose-gekoppelten GST-Fusionsproteinen bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach Zentrifugation (13000 Upm, 1 min) wurde die Sepharose drei- bis sechsmal mit Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch Zusatz von 2x Protein-Probenpuffer und 5-minütigem Kochen von der Sepharose gelöst. Die Analyse erfolgte nach Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE autoradiographisch (Kap. 3.3.5), in einem Immunblot (Kap. 3.3.6) oder durch Coomassie-Färbung (Kap. 3.3.4).

3.4.6.1 GST-Pulldown von *in vitro* translatierten Proteinen (s.a. Kap. 4.2)

In vitro translatiertes und [³⁵S]-markiertes EBAG9 wurde für 3 h mit 3 µg des angegebenen GST-Fusionsproteins (GST, GST-Snapin, GST-SNAP25 oder GST-VAMP2) in NP40-Lysepuffer inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose gründlich mit NP40-Lysepuffer gewaschen.

3.4.6.2 Pulldown unter Verwendung von Zellysaten (s.a. Kap. 4.3 und 4.4)

Für die GST-Bindungsexperimente mit EBAG9-GFP wurden die Zellysate von transient transfizierten HEK293-Zellen in CHAPS-Lysepuffer (mit 0.5% CHAPS) solubilisiert. Anschließend wurden 300 µg Proteinlysate für 1 h mit 4.5 µg des angegebenen GST-Fusionsproteins in 1 ml CHAPS-Lysepuffer (0.3% CHAPS) inkubiert.

Für die *Pulldown*-Assays mit Snapin-GFP wurden die transfizierten Zellen in TX-100-Lysepuffer (0.5% TX-100) lysiert. Die Inkubation der Zellysate mit den GST-Fusionsproteinen und das Waschen der Sepharose erfolgte in TX-100-Lysepuffer mit 0.1% TX-100.

3.4.6.3 Kompetitiver Bindungsassay (s.a. Kap. 4.10)

Eine konstante Menge an *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-markiertem Snapin wurde zusammen mit ansteigenden Mengen an *in vitro* translatiertem EBAG9 bei 4 °C inkubiert. Nach 30 min wurde zu diesen Ansätzen 10 µg GST-SNAP25 oder GST-SNAP23 gegeben und weitere 60 min inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose gründlich mit TX100-Lysepuffer gewaschen.

3.4.7 Gelfiltration

2x10⁷ PC12-Zellen wurden in Lysepuffer solubilisiert (4 °C, 30 min). Das Zellysate wurde anschließend zentrifugiert (13000 Upm, 10 min, 4 °C) und auf eine Superdex200 16/60 Säule (Amersham) aufgetragen, die zuvor mit Elutionspuffer äquilibriert wurde. Die Superdex-Säule mit einem Gelvolumen von 120 ml hat eine optimale Auftrennung von Molekülen in einem Bereich von 2000 bis 15 kD. Die Elution erfolgte über ein FPLC-System (BioRad) mit einer Flußrate von 0.3 ml/min und wurde mit einem UV-Detektor (280 nm) kontrolliert. Die Eluate wurden zu jeweils 1.5 ml fraktioniert, mit 20% TCA gefällt und anschließend in Immunblots analysiert. Zur Abschätzung des Molekulargewichts dienten die Proteinstandards Ferritin (440 kD), Aldolase (158 kD), Ovalbumin (43 kD) und Ribonuclease A (14 kD) (BioRad). Das Ausschlußvolumens (V₀) wurde mit Blue Dextran (2000 kD) bestimmt.

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 50mM NaCl, 0.2% CHAPS

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM NaCl und 1 mM MgCl₂, 0.5% CHAPS

3.4.8 Subzelluläre Fraktionierung

(modifiziert nach Rehm und Ploegh 1997)

Für drei Tage mit NGF (150 ng/ml) stimulierte PC12-Zellen wurden in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und in einem Glas-Teflon-Homogenisator (B. Braun, Melsungen) durch 35 Stöße homogenisiert. Das Zellhomogenisat wurde anschließend zentrifugiert (800 g, 10 min, 4 °C), um Zellkerne und Zelltrümmer zu entfernen. Der resultierende postnukleäre Überstand (PNS, *postnuclear supernatant*) wurde mit Saccharose versetzt (Endkonzentration: 40% (w/v) Saccharose in 10 mM Tris/HCl 7.4) und über eine 50%ige Saccharosefraktion (1 ml) aufgetragen. Der Ansatz wurde dann mit einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten (jeweils 2 ml: 35, 25, 15 und 0% Saccharose) überschichtet und 16 h bei 4 °C und 170000 g (SW41 Rotor) zentrifugiert. Von der

Oberfläche beginnend wurden Fraktionen von 750 µl abgenommen, mit 20% TCA gefällt und in 2x Protein-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse der Fraktionen erfolgte in Immunblots.

Homogenisierungspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 7.4, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA und 1 mM PMSF

3.4.9 Immunpräzipitation und Koimmunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ermöglicht die spezifische Isolation bestimmter Proteine aus einem Zellextrakt-Gemisch. Liegen zwei oder mehrere Proteine *in vivo* im Komplex vor, können so auch assoziierte Proteine isoliert werden (Koimmunpräzipitation).

Für die klassische Immunpräzipitation wurde das Zellsolubilisat zunächst durch Inkubation mit 100 µl Pansorbin[®] und 5 µl Maus- oder Kaninchenserum (30 min, 4 °C, Rotation) von unspezifisch bindenden Bestandteilen befreit und zentrifugiert (13000 g, 2 min, 4 °C). Die spezifische Immunpräzipitation aus diesem Überstand erfolgte dann mit 5 µg Antigen-spezifischem Antikörper und 50 µl Protein A-Sepharose für mindestens 1 h bei 4 °C (Rotation). Nach kurzer Zentrifugation (13000 g, 1 min) und fünfmaligem Waschen mit 1x NET-Puffer wurden die Immunpräzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

Die Koimmunpräzipitation von Proteinkomplexen erfolgte aus TX-100-Extrakten mit 5 µg des angegebenen Antikörpers und 50 µl Protein A-Sepharose unter Zugabe von 1 ml Bindungspuffer. Nach einer 3-stündigen Inkubation bei 4 °C wurde die Sepharose dreimal mit Bindungspuffer gewaschen und die Protein-Protein-Assoziationen in einem Immunblot analysiert.

10x NET-Puffer: 500 mM Tris/HCl pH 7.4, 1.5 M NaCl, 50 mM EDTA, 5% NP40

Bindungspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 0.1% BSA, 0.1% TX-100

3.4.10 Durchflußzytometrie (FACS-Analysen)

Die zu analysierenden Zellen wurden in eine Rundboden-Mikrotiterplatte überführt, abzentrifugiert (300 g, 2 min) und einmal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Für den Nachweis intrazellulärer Proteine wurden die Zellen zunächst mit 5% Paraformaldehyd/PBS fixiert (15 min, 4 °C), zweimal gewaschen und für 5 min mit 0.0025% Digitonin/PBS permeabilisiert. Es folgte eine 1-stündige Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Antikörperserum (5% in FACS-Puffer) der Spezies des zweiten Antikörpers. Die anschließende Antikörperfärbung erfolgte bei 4 °C in einem Volumen von 100 µl mit 0.5-10 µg/ml des jeweiligen Antigen-spezifischen Antikörpers (in FACS-Puffer). Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion der Antigene entweder über einen direkt an den Primärantikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff (FITC, PE oder Cy5) oder über eine

Zweischrittfärbung mittels eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörpers (anti-Immunglobulin). Anschließend wurden die Zellen mit dem Durchflußzytometer „FACSCalibur“ (Becton-Dickinson) analysiert und mit dem Programm „WinList 3.0“ (Verity) oder „Cell Quest“ (BD Biosciences, Heidelberg) ausgewertet.

FACS-Puffer: PBS, 0.5% BSA, 0.01% NaN₃

3.4.11 Immunfluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden ü.N. auf sterilen Deckgläschen oder Objektträgern angezogen (Roth), am nächsten Tag einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min in 5% PFA/PBS fixiert. Nach Permeabilisierung für 10 min mit 0.05% TX-100/PBS wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden für 1 h in 5% BSA/PBS mit Antiserum (5%), das der Spezies des Sekundärantikörpers entstammte, blockiert.

Die Inkubation mit einem Antigen-spezifischen Antikörper erfolgte für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4 °C in einer 1:100 Verdünnung (in 1% BSA/PBS) oder nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper (Alexa Fluor™ 568) oder mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Immunglobulin) und anschließend mit Streptavidin-gekoppeltem Alexa Fluor™ 568 inkubiert. Die Zellen wurden dann 4x mit PBS gewaschen, mit einem Tropfen Mowiollösung überschichtet und durch ein Deckgläschen abgedeckt. Die konfokale Analyse erfolgte mit einem inversen „Laserscanning“ LSM510-Mikroskop (Zeiss) mit den folgenden Konfigurationen: GFP: $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, BP $\lambda_{\text{em}} = 496-517$ nm; YFP: $\lambda_{\text{exc}} = 514$ nm, BP $\lambda_{\text{em}} = 517.7-646$ nm, Alexa: $\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm, BP $\lambda_{\text{em}} = 560-646$ nm. Die Bildverarbeitung wurde mit den Programmen „LSM Image Browser“ (Zeiss), „Photoshop“ (Adobe) und „Corel Draw“ (Corel) durchgeführt.

Für die Fluoreszenzmikroskopie von PC12-Zellen wurden diese – wenn angegeben - für drei Tage in Ab- oder Anwesenheit von 150 ng/ml *nerve growth factor* (NGF, Sigma) inkubiert. Die Immunfärbung wurde - wie für HEK293-Zellen beschrieben - durchgeführt. Die Kolokalisationsstudien von EBAG9 mit VAMP2 und Synaptophysin (Abb. 4.13) in PC12-Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Tatiana Reimer (AG Dr. Armin Rehm, MDC, Berlin) durchgeführt.

Mowiollösung: 0.2 M Tris/HCl pH 8.5, 50% Glycerin, 20% w/v Mowiol 4-88 (Calbiochem)

3.4.12 Elektronenmikroskopie

Der Pankreas wurde nach der Entnahme in 2% Glutaraldehyd/PBS (EM-grade) für drei Tage bei 4 °C fixiert, anschließend in PBS gewaschen und 2 h bei RT mit 1% Osmiumtetroxid/PBS osmiert. Über eine Alkoholreihe und Propylenoxid wurden die Pankreasstücke dehydriert und Poly/Bed (früher Epon) eingebettet. Ultradünnschnitte davon wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit dem EM Zeiss 910 mikroskopiert. Die digitalen Bilder wurden mit einer „1k x 1k high speed slow scan CCD Kamera“ (Proscan) und der „analySIS 3.2 software“ (Soft Imaging System, Münster) aufgenommen und ausgewertet.

Die Ultradünnschnitte und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.39A) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Bettina Erdmann (MDC, Berlin) angefertigt.

3.4.13 Histologie und Immunhistochemie von Gewebeschnitten

3.4.13.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Für eine histologische Untersuchung wurden die entnommen Organe in Plastischälchen mit „Tissue-Tec“ (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und bis zum Anfertigen der Gefrierschnitte bei -80 °C aufbewahrt. Die Kryoschnitte wurden mit einer Dicke von 8 µm an einem Kryostat (Microm HM560) angefertigt, auf silanisierte Objektträger (Roth) überführt und ü.N. bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entweder sofort gefärbt oder bei -20 °C eingefroren.

3.4.13.2 Hämatoxylin/Eosin(H/E)-Färbung und Immunfluoreszenzfärbung von Kryoschnitten

Nach Rehydrierung der Gefrierschnitte für 10 min in PBS wurden diese 10 min in Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Hämatoxylin bindet aufgrund seiner positiven Ladung an DNA und dient der Zellkernfärbung. Dann wurden die Schnitte 10 min im warmen Leitungswasser gebläut. Die anschließende Plasmafärbung erfolgte mit Eosin für 3-5 min, welches aufgrund seiner Negativladung an positiv geladene Bereiche in Proteinen im Zytoplasma der Zellen bindet. Es folgten nun Waschrinne in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe in Ethanol: 1 min 60%, 1 min 75% und 1 min 100% Ethanol. Um eine dauerhafte Übersichtung mit Einschlussmedium zu ermöglichen, folgten zwei Waschrinne à 5 min in Xylen. Nach kurzem Trocknen des Gewebeschnitts wurde dieser mit Canadabalsam überschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Kerne erscheinen im Durchlichtmikroskop violett, das Zytoplasma ist rosa bis rot angefärbt.

<u>Hämatoxylin-Lösung:</u>	1 g Hämatoxyl / 1 l H ₂ O, 0.2 Na-iodat, 50 g Kaliumaluminiumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure
<u>Eosin-Lösung</u>	1% Eosin yellow in 70% EtOH, + 5 Tropfen Essigsäure

Die Immunfluoreszenzfärbung der Gefrierschnitte erfolgte wie in Kap. 3.4.11. Zur Anwendung kam ein biotinylierter anti-CD3ε-Antikörper bzw. FITC-markierter anti-B220-Antikörper.

3.4.14 Endozytose-Experimente

Die mit dem humanen Chemokinrezeptor CCR5 stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden in einer 24-Loch-Kulturplatte in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Loch ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit eiskaltem Bindungsmedium (BM) gewaschen und in 250 µl BM mit 125 pM [¹²⁵I]RANTES-Lösung (2200 Ci/mmol; NEN, Köln) für 2 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Ligand durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem BM entfernt. Durch Zugabe von warmem BM und Inkubation der Kulturplatte bei 37 °C wurde die Internalisierung induziert und nach 10 oder 45 min abgestoppt, indem die Platte auf Eis gestellt wurde. Für den Nullwert (t = 0) wurden die Zellen nicht auf 37 °C erwärmt. Zwei Löcher für jeden Zeitpunkt wurden zweimal für 3 min mit eiskaltem BM gewaschen und in 400 µl 0.2 M NaOH lysiert (Gesamtzellaktivität). Die verbliebenen zwei Kavitäten wurden zweimal mit eiskaltem, saurem Waschpuffer gewaschen, um Zelloberflächen-gebundenes [¹²⁵I]RANTES zu entfernen, und anschließend ebenfalls lysiert (Säure-resistente Aktivität). Abschließend wurden die Zellysate in einem Gammazähler analysiert. Die Endozytose/ Internalisierung wurde als der prozentuale Anteil des internalisierten Liganden (Säure-resistente Aktivität) an der „Gesamtzellaktivität“ berechnet, abzüglich der Hintergrundaktivität zum Zeitpunkt t = 0.

<u>Bindungsmedium (BM):</u>	RPMI 1640 ohne Bikarbonat, 0.2% BSA, 10 mM Hepes pH 7.4
<u>Waschpuffer:</u>	RPMI 1640 ohne Bikarbonat, 0.2% BSA, 10 mM MES/HCl pH 2.5

3.4.15 Ca²⁺-regulierte Exozytose von NPY-GST in PC12-Zellen

(modifiziert nach Fukuda *et al.*, 2002a)

Jeweils drei 60 mm-Kulturplatten mit 3×10^6 PC12-Zellen wurden zusammen mit dem Reporterplasmid pShooter-NPY-GST (3 µg) und EBAG9-GFP, EBAG9-GFP C12/14/27S oder als Kontrolle mit GFP (jeweils 2 µg) unter Verwendung des Lipofectamin-Reagenz (Kap. 3.4.2) transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen zur Stimulation der Sekretion in Hochkaliumpuffer mit 56 mM KCl (Regulierte Exozytose) oder in Niedrigkaliumpuffer mit 5.6 mM KCl (basale

Sekretion) inkubiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37 °C wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen in NP40-Lysepuffer solubilisiert. Sowohl das sezernierte als auch das im Zellysate befindliche NPY-GST wurde anschließend mit Glutathion-Sepharose präzipitiert. Nach fünfmaligem Waschen der Sepharose mit NP40-Lysepuffer wurden die Proteinkomplexe in einer SDS-PAGE aufgetrennt und in einem Immunblot mit einem anti-GST Antikörper analysiert.

Hochkaliumpuffer: 15 mM Hepes/KOH pH 7.4, 95 mM NaCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂,
5.6 mM Glucose

Niedrigkaliumpuffer: 15 mM Hepes/KOH pH 7.4, 145 mM NaCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂,
5.6 mM Glucose

3.4.16 Ca²⁺-regulierte Exozytose von [³H]Norepinephrin in intakten PC12-Zellen

(modifiziert nach Shin *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 1996)

PC12-Zellen (60 mm-Kulturplatten) wurden entweder alleine mit 8 µg EBAG9-GFP, EBAG9 Δ30-213-GFP oder GFP (Kontrolle) transfiziert oder zusammen mit 8 µg EBAG9-GFP und 4 µg His₆-Snapin-pcDNA. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen in Triplikaten zu je 1x10⁵ Zellen in 24-Loch-Platten umgesetzt und ü.N. mit 0.5 µCi/ml [³H]Norepinephrin (12 Ci/mmol; Amersham) mit 0.5 mM Ascorbinsäure beladen. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen 3x mit RPMI-Medium ohne FCS (mit 0.2% BSA) gewaschen und die Sekretion wie in Kap. 3.4.15 induziert. Nach 10-minütiger Stimulation wurden die Zellen zentrifugiert (1000 g, 8 min, 4 °C), und zur Bestimmung des zellulären Inhalts an Norepinephrin wurden die Zellen für 1 h in 1% TX-100 lysiert. Sowohl das sezernierte als auch das im Zellysate befindliche [³H]Norepinephrin wurde anschließend mittels Szintillationsmessung ermittelt. Die Ca²⁺-abhängige Freisetzung des Norepinephrins wurde aus der Differenz der prozentualen Freisetzung unter depolarisierenden Bedingungen (56 mM KCl) und der basalen Sekretion (5.6 mM KCl) errechnet und auf die GFP-Kontrolle (100%) normalisiert.

3.4.17 Exozytose-Experimente mit T-Zellen

Nach Aktivierung und Anreicherung der CD8⁺-T-Zellen (Kap. 3.4.3.1) wurden diese in RPMI-Medium (ohne FCS) mit 1% BSA aufgenommen und auf eine Konzentration von 1x10⁶/ml eingestellt. Zur Stimulation der Sekretion von Granzym A und der β-Hexosaminidase bzw. von IFN_γ und RANTES wurden jeweils in Triplikaten 100 µl der T-Zellsuspension in 96-Loch-Rundbodenplatten umgesetzt, die zuvor ü.N. bei 4 °C mit 5 µg/ml anti-CD3ε-Antikörpern (in PBS) beschichtet worden waren. Als Kontrolle für die basale Sekretion dienten Löcher, die nur mit PBS

versehen wurden. Nach 0, 2 oder 4 h Inkubation der Zellen bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Gesamtzymaktivität von Granzym A und der β -Hexosaminidase erfolgte aus Zellextrakten zum Zeitpunkt $t = 0$, wofür diese Reaktionsansätze mit 0.4% TX-100 (in Medium) versehen und 1 h bei 4 °C inkubiert wurden.

3.4.17.1 Bestimmung der Granzym A- und β -Hexosaminidase-Aktivität

(modifiziert nach Stinchcombe *et al.*, 2001a)

Die Granzym A-Aktivität wurde durch Umsetzung des Substrates N^α -Benzyloxycarbonyl-L-lysine Thiobenzyl Ester (BLT, Calbiochem) in der Gegenwart von 5,5'-Dithio-*bis*-(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB, Calbiochem) ermittelt. Dafür wurden 30 μ l des Überstandes (Kap. 3.4.15) für 1-3 h bei 37 °C mit 100 μ l der Granzym A-Substratlösung (0.2 mM BLT, 0.2 mM DTNB, 0.2% TX-100 in PBS) inkubiert. Die Konzentration des entstandenen Produkts wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt und entspricht direkt der Enzymaktivität.

Die Bestimmung der β -Hexosaminidaseaktivität erfolgte durch eine 1-stündige Inkubation von 30 μ l des Überstandes mit 1 mM des Substrates 4-Methylumbelliferyl-2-acetamido-2-desoxy- β -D-glucopyranosid (Calbiochem; in 0.1 M Natriumcitrat pH 4.6, 0.2% TX-100), das durch die β -Hexosaminidase in einen fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird. Im Spektralphotometer wurde die Fluoreszenz der Proben mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm gemessen. Die Werte wurden um eine Medium-Probe korrigiert.

3.4.17.2 Bestimmung von IFN γ durch ELISA

Der Nachweis von IFN γ im Kulturüberstand von T-Lymphozyten wurde mit einem enzymgekoppelten Immuntest (ELISA) durchgeführt. Eine 96-Loch-Rundbodenplatte wurde zunächst mit 50 μ l/Loch des *Capture*-Antikörpers (1 μ g/ml anti-Maus IFN γ in Karbonatpuffer) beschichtet und ü.N. bei 4 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer (PBST) wurde die Plastikwandung mit 200 μ l/Loch Assaypuffer blockiert (30 min, RT). Dann wurde der zu testende Lymphozytenüberstand bzw. die Verdünnungsreihe des Standards (rekombinantes murines IFN γ) in Assaypuffer angesetzt, 50 μ l in jedes Loch gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde dann 5x gewaschen und mit 50 μ l/Loch des biotinylierten *Detection*-Antikörper (1 μ g/ml anti-Maus IFN γ -Biotin in Assaypuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal gewaschen und 50 μ l HRP-gekoppeltes Avidin (1:250 in Assaypuffer; BD Biosciences) für 20-30 min in jedes Loch gegeben. Nach gründlichem Waschen (>9x) wurde die Platte mit

50 µl/Loch einer HRP-Substratlösung (BD OptEIA™ substrate reagent set; BD Biosciences) für 20-30 min inkubiert. Nach Entwicklung des Standards wurde die Reaktion mit 50 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die Umsetzung des Substrats in einem ELISA-Reader MR5000 (Dynatech) bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt (Referenz: 570 nm). Aus den Eichpunkten erhält man nach linearer Regression die den Proben entsprechenden Proteinkonzentrationen.

<u>Assaypuffer:</u>	10% FCS in PBS
<u>Karbonatpuffer:</u>	0.1 M NaHCO ₃ , 34 mM Na ₂ CO ₃ , ad pH 9.6
<u>Standardreihe:</u>	1000-16 pg/ml, 1:2 Verdünnungen

3.4.17.3 Bestimmung von RANTES durch ELISA

Die Quantifizierung von RANTES erfolgte prinzipiell wie in Kap. 3.4.17.2 beschrieben. Davon abweichend wurde die 96-Loch-Rundbodenplatte mit 2 µg/ml *Capture*-Antikörper (anti-RANTES in Assaypuffer; R&D Systems) beschichtet. Für die Detektion wurde der *Detection*-Antikörper (anti-RANTES-Biotin in Assaypuffer; R&D Systems) in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt.

<u>Assaypuffer:</u>	1% BSA in PBS
<u>Standardreihe:</u>	rekombinantes murines RANTES (R&D Systems); 4000-31 pg/ml, 1:2 Verdünnungen

3.4.18 Exozytose-Experimente mit Mastzellen

Für die Stimulation der Exozytose ausgereifter Mastzellen (Kap. 3.4.3.2) mit dem Ca²⁺-Ionophor A23187 wurden die Zellen jeweils in Triplikaten zu je 1x10⁵ in 96-Loch-Rundbodenplatten überführt. Nach kurzer Zentrifugation (1200 Upm, 2 min) wurden die Zellen in Tyrode-Puffer mit 0-0.9 µM A23187 (Calbiochem) aufgenommen und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Stimulation wurde die Platte sofort auf Eis gestellt und der Überstand abgenommen. Die Bestimmung der β-Hexosaminidase-Aktivität erfolgte wie in Kap. 3.4.17.1.

Zur Bestimmung der Serotonin-Sekretion wurden 6x10⁶ Mastzellen zunächst ü.N. in 15 ml RPMI-Medium mit 25 µCi [³H]Serotonin (5-Hydroxy[G-³H]tryptamine; 13.3 Ci/mmol; Amersham Biosciences) und 1 µg/ml eines DNP-spezifischen IgE-Antikörpers beladen. Am nächsten Morgen wurden die Zellen 2x mit Tyrode-Puffer gewaschen und die Zellen jeweils in Triplikaten zu je 1x10⁵ in 96-Loch-Rundbodenplatten überführt. Die Exozytose wurde anschließend entweder mit A23187 (s.o.) induziert oder durch Zugabe von 0-200 µM des multivalenten Antigens DNP-BSA (in Tyrode-Puffer), das die Quervernetzung der an den FcεRI-Rezeptors gebundenen IgE-

Antikörper vermittelt. Nach einer 10-minütigen Stimulation wurde der Überstand abgenommen und der [³H]Serotoningehalt mittels Szintillationsmessung bestimmt. Die Zellen selbst wurden mit 200 µl 1% TX-100 versetzt und für 30 min bei RT inkubiert und zur Bestimmung des zellulären Serotoningehalts herangezogen.

Tyrode-Puffer: 10 mM HEPES pH 7.4, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.4 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5.6 mM Glucose, 0.1% BSA

3.5 Knockout-Technik bei Mäusen

3.5.1 Kultur primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten, sog. *Feeder*, tragen zu optimalen Kulturbedingungen und Aufrechterhaltung der Omnipotenz der ES-Zellen bei und dienen als Matrix für deren Wachstum.

Kryokonservierte Fibroblasten wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad schnell aufgetaut und mit warmem Fibroblasten-Medium (Kap. 2.8) versetzt. Nach Zentrifugation (1100 Upm, 2 min, RT) wurden die Zellen in 20 ml Medium auf 150 mm-Kulturplatten ausgesät. Konfluent gewachsene Fibroblasten wurden 1:3 oder 1:4 passagiert, wofür die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit 5 ml Trypsinlösung (37 °C) inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Medium versetzt, abzentrifugiert und erneut ausgesät.

Vor der Verwendung als *Feeder* für ES-Zellen wurden die Fibroblasten mit 10 µg/ml Mitomycin C (Sigma) behandelt (37 °C), um deren Zellteilung irreversibel zu blockieren. Nach 2-stündiger Inkubation wurden die wachstumsinaktivierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen und auf Gelatine-beschichteten 100 mm-Kulturplatten ausgesät.

3.5.2 Kultur und Transfektion embryonaler Stammzellen

Eingefrorene ES-Zellen wurden in ES-Zellkulturmedium (Kap. 2.8) aufgenommen, sorgfältig vereinzelt und in 100 mm-Kulturplatten auf Fibroblasten weiterkultiviert. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt und je nach Dichte der Zellen alle ein bis zwei Tage passagiert (1:3 bis 1:6), um ein konfluentes Wachstum der ES-Zellen und die damit einhergehende Differenzierung zu verhindern.

Für die Transfektion wurden 1×10^7 exponentiell wachsende ES-Zellen in 800 µl PBS und 20-40 µg linearisierter Rekombinationsvektor in einer Elektroporationsküvette (Gene-Pulser Küvette 0.4 cm, BioRad) vereinigt. Nach Elektroporation bei 300 V, 1200 µF (2 ms Impuls) wurden die Zellen auf vier mit Fibroblasten bewachsenen 100 mm-Kulturplatten ausgesät.

3.5.3 Selektion und Isolation embryonaler Stammzellklone

Die Positivselektion homolog rekombinierter ES-Zellklone erfolgte über die Neomycinresistenz des Rekombinationsvektors durch Zugabe von 400 µg/ml Geneticin (Sigma) am zweiten Tag nach der Elektroporation. Ab dem vierten Tag wurde zusätzlich 2 µM Gancyclovir zugesetzt, was eine Negativselektion/Elimination der ES-Zellklone ermöglichte, die den Rekombinationsvektor zufällig integriert hatten. Nach 7-10 Tagen konnten resistente Klone isoliert werden. Die Stammzellklone wurden dazu einmal mit PBS gewaschen, mit PBS überschichtet und dann unter dem Lichtmikroskop mit einer Pipettenspitze in etwa 25 µl PBS in eine 96-Loch-Platte überführt. Die Zellen wurden danach für 5 min mit 25 µl Trypsinlösung inkubiert (37 °C), nach Zugabe von 50 µl ES-Zellkulturmedium sorgfältig vereinzelt und anschließend auf 96-Loch-Platten mit Fibroblasten überführt. Zwei bis drei Tage später wurden die Zellen auf zwei neue 96-Loch-Platten passagiert, die eine Hälfte auf neue *Feeder*-Zellen zur späteren Kryokonservierung und die andere Hälfte auf Gelatine-behandelte Platten. Die auf Fibroblasten gewachsenen ES-Zellen wurden nach zwei bis drei Tagen bei Erreichen ausreichend großer Einzelkolonien eingefroren. Dazu wurden die Klone einmal mit PBS gewaschen, mit 25 µl Trypsinlösung inkubiert (5 min, 37 °C) und nach Zugabe von 75 µl Einfriermedium (10% DMSO, 50% FCS, 40% ES-Zellkulturmedium) gut vereinzelt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die für die DNA-Isolierung vorgesehene Platte wurde bis zur Konfluenz weiterkultiviert, um eine ausreichende Zellzahl zu erreichen. Homolog rekombinierte ES-Zellklone wurden mittels Southern-Hybridisierung (Kap. 3.1.13) ermittelt. Anschließend konnte auf die kryokonservierte 96-Loch-Platte zurückgegriffen werden, um korrekt rekombinierte Klone wieder in Kultur zu nehmen.

3.5.4 Superovulation und Präparation von Blastozysten

(modifiziert nach Hogan *et al.*, 1994)

Um möglichst viele Blastozysten für die spätere Injektion der homolog rekombinierten ES-Zellklone zu erhalten, wurden ca. 25 Tage alte C57Bl/6-Weibchen durch Hormonabgabe (intraperitoneal) zur Superovulation gebracht. Zunächst wurde den Tieren 100 µl 50 U/ml PMS/PBS (*Pregnant Mare's Serum*, Intergonan, Intervet GmbH, Tönisvorst) verabreicht. Zwei Tage später erfolgte die Injektion von 100 µl 50 U/ml HCG/PBS (humanes Chorion-Gonadotropin, Ovogest, Intervet) und die Verpaarung mit C57Bl/6-Männchen. Am nächsten Morgen wurde eine erfolgreiche Kopulation mit einem Vaginalpfropf angezeigt und als Tag 0.5 *post coitum* (p.c.) gleichgesetzt. Drei Tage später (3.5 p.c.) wurden die Blastozysten aus den präparierten Eileitern mittels einer Mundkapillare mit Blastozysten-Medium (30 mM Hepes pH 7.2 in Fibroblasten-

Medium) herausgespült. Bis zur Injektion der ES-Zellen wurden die so isolierten Blastozysten unter Silikonöl DC200 (Serva, Heidelberg) bei 37 °C inkubiert.

3.5.5 Injektion embryonaler Stammzellen in Blastozysten und Uterustransfer

(modifiziert nach Bradley und Robertson 1986)

Die Injektion der ES-Zellen in die Blastozysten erfolgte an einem Axiovert 10 Mikroskop (Zeiss) mit Mikromanipulator (Brindi AG, Basel bzw. Eppendorf, Hamburg). Halte- und Injektionsnadeln wurden von Eppendorf (Hamburg) bezogen.

Die injizierten Blastozysten wurden in pseudoträchtige CB6F1-Weibchen transferiert (Hogan *et al.*, 1994). Diese erhält man durch die Kopulation mit vasektomierten Männchen. Der Hormonaushalt dieser scheinchwangeren Weibchen entspricht dem eines trächtigen Tieres. 2.5 Tage p.c. pseudoschwangere Leihmütter wurden betäubt (50 µl Ketavet und 50 µl Rompun pro 10 g Körpergewicht; Pharmazeutische Handelsgesellschaft mbH, Garbsen), die Eileiter freigelegt und sechs bis acht Blastozysten mit der Mundkapillare in jede Eileiterseite transferiert. Nach dem Transfer wurde das Peritoneum (Bauchfell) genäht und das Fell mit einer Wundklammer verschlossen.

Die Injektion und der Uterustransfer wurde freundlicherweise von Frau Kathrin Rudolph (AG Prof. Carmen Birchmeier, MDC, Berlin) durchgeführt.