

Material und Methoden

Materialien

Chemikalien und Zellkultur-Materialien

Laborchemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Amersham-Biosciences (Uppsala, Schweden), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Pierce (Rockford, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen. Zellkultur-Materialien wurden von den Firmen BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Biochrom KG (Berlin), Corning (New York), Nunc (Wiesbaden), PAA (Cölbe) und TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Antikörper

Antikörper	Konzentration bzw. Verdünnung für Anwendung			Hersteller
	IB	IF/FACS	IP	
<i>CEACAM1 (Ratte)</i>				
Maus mAb Klon Be9.2	ZKÜ 1:200	10 µg/ml	3-4 µg	AG Lucka, Berlin
Maus mAb Klon 5.4		10 µg/ml	3-4 µg	D. Hixson, Providence, USA
Kaninchen pAb αCC1/gp110		20 µg/ml	3-4 µg	AG Lucka, Berlin
Kaninchen pAb anti-CEACAM1-long-Zyto			3 µl Serum	
<i>CEACAMs (human)</i>				
Maus mAb Klon 4/3/17 CEACAM1/5	2 µg/ml	10 µg/ml	10 µg	F. Grunert, Genovac, Freiburg, Germany
Maus mAb Klon 18/20 CEACAM1/5	4 µg/ml			AG Lucka, Berlin
Maus mAb Klon 2D3 CEACAM1/5/6	2 µg/ml	10 µg/ml	3-4 µg	AG Lucka, Berlin
Maus mAb 16H10 CEACAM6	2 µg/ml	10 µg/ml	3-4 µg	F. Grunert, Genovac, Freiburg, Germany
Maus mAb 80H3 CEACAM8	2 µg/ml	2 µg/ml		Immunotech, Marseille, France
Maus mAb Col-1 CEACAM3/5	2 µg/ml	2 µg/ml	10 µl	J. Schlom, NCI, USA
<i>Zytoskelettale Antigene</i>				
anti-β-Aktin Maus mAb Klon AC-74	1:5000			Sigma, München
anti-β-Tubulin Maus mAb Klon TUB2.1	1:2000			Sigma, München

<u>Zytoplasmatische Antigene</u>				
anti-Talin Maus mAb Klon 8d4	1:1000			Sigma
anti-Paxillin Maus mAb Klon Nr. 349	1:5000	5µg/ml		BD Pharmingen
anti-FAK Maus mAb Klon 77	1:1000			BD Pharmingen
anti-FAK pAb Kaninchen	1:1000		2µg	Santa Cruz
anti-SMAD2/3 mAb Maus	1:1000	5µg/ml		BD Pharmingen
anti-phospho- Tyrosin mAb Maus PY99	1:1000	5µg/ml	1µg	Santa Cruz
anti-phospho- Tyrosin mAb Maus 4G10	1:1000			Upstate
anti SHP-2 mAb Maus Klon Nr. 79	1:1000		1µg	BD Pharmingen
anti-SHP-1 mAb Maus	1:1000			BD Pharmingen
anti-Vinculin Maus mAb Klon hVIN-1	1:1.00			Sigma
anti-p27 ^{Kip1}	1:1000			BD Pharmingen
anti-Caveolin pAb Kaninchen	1:500			Upstate
anti-SMAD1 pAb Kaninchen	1:1000	5µg/ml		Upstate
anti-phosphoErk1/2 pAb Kaninchen	1:500			Cell Signaling Technology
anti-Erk1 pAb Kaninchen	1:1000			Santa Cruz
<u>Oberflächenantigene</u>				
anti-α _v -Integrin pAb Ziege		5µg/ml		Santa Cruz
anti-α1-Integrin mAb Maus Klon 33.4		5µg/ml		AG Lucka
anti-α3-Integrin mAb Maus Ralph3.2	1:500	5µg/ml		
anti-CD49f mAb Ratte, α6-Integrin Klon GoH3		5µg/ml		BD Pharmingen
anti-VE-Cadherin pAb Ziege	1:1000		1µg	Santa Cruz
anti-β1-Integrin Maus mAb Klon Nr. 18	1:500			BD Pharmingen

anti-β3-Integrin Maus mAb		5µg/ml		Santa Cruz
anti-PECAM1 pAb Kaninchen	1:500			Santa Cruz
anti-α6-Integrin mAb Klon 4E9G8, rat spec.	1:500			DPC Biermann
anti-E-Selektin Maus mAb 5D11		8 µg/ml		R&D Systems
anti-TGF-beta Rezeptor, Type II pAb Kaninchen	1:200	5µg/ml		Upstate
<i>Fusionsanteile</i>				
Anti-c-myc-Epitop Maus mAb Klon 9E10	1 µg/ml	5µg/ml		Sigma, München
<i>Andere</i>				
Maus-anti- Kaninchen-IgG		10µg/ml		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

<i>Sekundäre Antikörper / Konjugate</i>				
Ratte-anti-Maus IgG- Peroxidase	1:5000			Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ratte-anti-Ziege IgG- Peroxidase	1:5000			Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Human IgG-Peroxidase	1:5000			Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Peroxidase	1:5000			Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Maus IgG- Cy2		1:100		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Maus IgG- RhodamineRed-X		1:100		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Cy2		1:100		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG-RhodamineRed-X		1:100		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Kaninchen-anti-Ziege IgG-RhodamineRed-X		1:100		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Maus-FITC		1:100		Sigma
Ziege-anti-Kaninchen- FITC		1:100		Sigma

Geräte und sonstige Materialien

Brutschrank
Coulter Counter
Digitales Imaging System
ELISA-Reader
Feinwaage

Heraeus 6000, Kendro Laboratory Products
Coulter Particle Counter Z1
LAS-1000, Fujifilm, X-Ray
Sunrise, Tecan
Adventurer, Ohaus

FACScan	BD Biosciences Immunocytometry Systems
FPLC [®] System	Amersham Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Gel-/Blot-Apparaturen	Miniprotrean II, Biorad
Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5B, Kendro Laboratory Products
Laser-Scanning-Mikroskop	LSM410, Zeiss
Magnetrührer	IKAMAG, Roth
Mikroskop	Diavert, Leica
PCR-Cycler	Robo-Cycler Gradient 96, Stratagene
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf
Schüttel-Inkubator	Innova 4230 Shaker, Memmert
Sterilbank	Gelaire Class 100, Gelman Instruments
Thermomixer	5436, Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge fresco, Heraeus
Transilluminator	MWB-Biotech
Ultraschall Sonicator [™] W-375	Heat Systems-Ultrasonics, Inc.
Ultrazentrifuge	CP622, Sartorius
Wasserbad	GFL
Zentrifuge	Laborzentrifuge 3-10, Sigma
Digitale Spiegelreflexkamera	Nikon D100 (mit effektiv 6,1 Megapixeln)

Sonstige Materialien

Genitacin	PAA
Penicillin	PAA
Streptomycin	PAA
Protease-Inhibitor-Cocktail <i>for general use</i>	Sigma
Nitrozellulosemembran	Schleicher&Schüll
Permanox 8-Kammer-Objektträger	Nunc
Gelfiltration Superdex [®] 200 HR 10/30	Amersham
Protein-G-Sepharose	Amersham
Protein-A-Sepharose	Amersham
Sepharose-4B	Amersham
Accutase, Viralex	PAA
Trypsin/EDTA + Phenolrot	Gibco
Röntgenfilme Biomax ML	Kodak
Saponin	Merck
Methyl- β -cyclodextrin	Sigma
Reblot Plus Stripping Solution strong und mild	Chemikon

Detergenzien

von Sigma:	Brij35, Brij58, Brij76, Brij96/97, Brij98/99
von Roth:	Triton X100, Triton X114, CHAPS
von Merck:	Tween20, CHAPSO
von Calbiochem:	MEGA-10, Zwittergent 3-12, n-octyl- β -D-Glucopyranosid

Enzyme / Proteine, Marker und Kits

Laminin-1	Roche
Fibronectin	Sigma
Vitronectin	Roche
Matrigel	BD Biosciences oder Sigma
PLL	Sigma
Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin	Sigma
Cholera-Toxin-B-FITC	Sigma
Tomato-Lektin-AlexaFluor594	Vektor Laboratories
BrdU-Proliferation-ELISA-Kit-Colorimetric	Roche
Annexin-V	Immunotools
Propidiumiodid	Sigma
Lipofektamin2000	Invitrogen
BCA-Protein-Assay	Pierce
Celline-Nuceofector-Kit-V	Amaya Biosystems
Dual-Color Molecular Weight Marker (31, 36, 55, 61.5, 84, 116, 185)	BioRad, München, Deutschland
Gel Filtration Chromatography Standard 670, 158, 44, 17, 1.35 kD	Biorad, München, Deutschland
1 kb-Plus-DNA-Basenpaar-Leiter	Gibco-BRL, Detroit, USA

Wachstumsfaktoren

aFGF, acidic-Fibroblast-Growth-Factor, human, recombinant <i>E.coli</i>	Sigma
bFGF, basic-Fibroblast-Growth-Factor, human, recombinant <i>E.coli</i>	R&D
VEGF, Vascular-Endothelial-Growth-Factor, mouse, recombinant insect cells	Sigma
IFN- γ , Interferon-gamma, rat recombinant <i>E.coli</i>	Sigma
TNF- α , Tumor-Necrosis-Factor-alpha, mouse, recombinant <i>E.coli</i>	Sigma
EGF, Epidermal-Growth-Factor, human, recombinant <i>E. coli</i>	Serva
PMA, Phorbol-12-Myristate-13-Acetat	Sigma
TGF- β 1, Transforming-Growth-Factor- β 1, human recombinant <i>E. coli</i>	Sigma

Inhibitoren

Wortmanin	Sigma
Y-27632	Calbiochem
Genistein	Calbiochem
PP2	Calbiochem
Cytochalasin-D	Sigma
LPA	Sigma
Natriumvanadat	Roth
NaF	Fluka
NaP ₂ O ₅	Serva

Vektoren

pRC/CMV (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Dieser Vektor wurde für die Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen konzipiert. Er kann sowohl für transiente als auch für stabile Transfektionen (Selektionsmarker Neomycin) verwendet werden. Er trägt den *immediate-early enhancer promoter* des humanen Cytomegalovirus und gewährleistet so die konstitutive Expression auf einem hohen Niveau in verschiedenen Säugerzellen. Der Vektor trägt hinter der *multiple cloning site* (MCS) das Polyadenylierungssignal des Rinder-Wachstumshormons (BGH), um die mRNA zu stabilisieren und eine effiziente Beendigung der Transkription zu gewährleisten.

Rac1-Konstrukte

Eukaryontische Expressionsvektoren mit Rac1-Konstrukten wurden von Dr. Keith Burridge (Chapel Hill, NC, USA) bezogen. Rac1-Sequenzen (wt Rac1, die dominant-negative Mutante T17N Rac1 und die dominant-aktive Mutante Q61L Rac1) wurden im dortigen Labor mit EcoR1 und Xho1 in pCMV-myc kloniert, wodurch Rac1-myc-Fusionsproteine entstanden.

Versuchstiere

Wistar-Ratten wurden zur Präparation von Hirnen und zur Gewinnung von Zellen und für Gewebeschnitte eingesetzt. Das schnell wachsende, chemisch induzierte, stark dedifferenzierte Morris-Hepatom-7777 wächst in syngenen Buffalo-Ratten. Nach intramuskulärer Injektion in den Hinterlauf adulter Ratten wächst das Hepatom in ca. 4 Wochen zu einem mehr als Kirschkorn großen Tumor heran. Wistar- und Buffalo-Ratten entstammten der eigenen Zucht.

Eukaryontenzelllinien

RBE (*Rat-Brain-Endothelial Cells*, generiert am Karolinska-Institut, Stockholm, Schweden) Endotheliale Zelllinie aus dem Rattenhirn, generiert nach der Methode von J. Folkman (unter Hilfestellung von Y. Cao, vormals Mitarbeiter im Labor von J. Folkman). In Schweden transfiziert mit CEACAM1-long und -short (in pRAX) Diese Zellen wurden für Adhäsions-, Membranmikrodomänen- und TGF- β -Untersuchungen verwendet. (Die schwedischen Klone sind nur schwach exprimierend). In Berlin zusätzlich transfiziert mit CEACAM1-long, -short, Δ Cyto, und -long-Tyrosinmutanten sowie einer Leervektor-Kontrolle (alle in pRC/CMV). Diese Zellen wurden in der AG Lucka im Rahmen dieser Arbeit verwendet und charakterisiert (stark exprimierende Klone für: Adhäsions-, Migrations-, Membranmikrodomänen-, Zellkontakt-Formation sowie TGF- β -Studien). (siehe auch Transfektion von Eukaryontenzellen)

PC12 (ATCC, Rockville, USA)

Diese Zelllinie stammt aus einem transplantierbaren Pheochromocytom des Nebennierenmarks der Ratte. Die Zellen differenzieren nach NGF-Stimulation reversibel in einen neuronalen Phänotyp mit Neuriten. Die Zellen exprimieren endogen CEACAM1-long und CEACAM1-short sowie lösliche Isoformen.

IEC-6-Zellen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland)

Epithelzellen aus dem Ratten-Dünndarm. Keine kontinuierlich wachsende Zelllinie. Zellen wachsen adhärent mit epithelialer Morphologie im Monolayer und zeigen Kontaktinhibition. Die Zellen exprimieren endogen CEACAM1-long und CEACAM1-short sowie mindestens eine lösliche Isoform.

NBT-II-Zellen (ATCC, Rockville, USA)

Die *Nara-Bladder-Tumor-Zelllinie* entstammt einem 1971 chemisch induziertem Blasenkarzinom. Die Zellen zeigen eine pflastersteinartige, epitheliale Morphologie. Sie exprimieren funktionelle Desmosomen, E-Cadherin und endogen CEACAM1 (short und long-Isoform). Im nicht-konfluenten Zustand können diese Zellen durch aFGF oder EGF Stimulation transdifferenzieren. Hierbei werden während der Transdifferenzierung interzelluläre Adhäsionskomplexe gelöst und es kommt zur Umorganisation des Zytoskeletts und einem motilem Phänotyp der Zellen. Dieser Transition (Übergang von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp), die während der Tumorgenese von Karzinomen beobachtet werden kann, wird eine Rolle bei der Metastasierung zugeschrieben wird.

HT-29-Zellen (ATCC, Rockville, USA)

Humanes Adenokarzinom aus dem Kolon. Generiert 1964 aus dem primären Tumor einer 44-jährigen kaukasischen Patientin. Die Zellen wachsen mit epithelialer Morphologie im Monolayer, in großen Kolonien.

HeLa-Zellen (ATCC, Rockville, USA und Karolinska Institute)

Humanes epithelioides Cervixkarzinom, etabliert 1951. Heute diagnostiziert als Adenokarzinom. Die Zellen zeigen eine epithelartige Morphologie und wachsen im Monolayer. HeLa-Transfektanten transfiziert mit humanem CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8 kommen aus dem Labor von B. Öbrink, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden.

MTC- und MTLn3-Zellen (R. Lichtner, Schering AG, Berlin, Deutschland)

Die Zelllinien MTC und MTLn3 stammen aus dem Rattenbrust-Adenokarzinom 13762 NF, wobei die MTC-Zelllinie direkt aus dem Ausgangstumor abgeleitet wurde, die MTLn3-Zelllinie aus einer spontanen Lungenmetastase.

*"Je planmäßiger die Menschen vorgehen,
desto wirksamer vermag sie
der Zufall zu treffen".*

FRIEDRICH DÜRRENMATT

Methoden

Viele der verwendeten Methoden sind gebräuchliche Arbeitsweisen in molekularbiologisch- oder biochemisch arbeitenden Laboratorien, die in üblicher oder leicht abgeänderter Form angewendet wurden. Auf eine detaillierte Referenzliste bezüglich der Methoden wurde daher verzichtet. Eine Zusammenfassung der Methoden und Referenzen finden sich in "Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology 1+2" im Verlag Wiley wiedergegeben.

Zellbiologische Methoden

Alle Säuger-Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden mit sterilen Werkzeugen und sterilen Lösungen in der keimfreien Atmosphäre einer Zellkulturwerkbank durchgeführt.

Das Passagieren von adhärent wachsenden Zellen erfolgte kurz vor der Konfluenz im Verhältnis 1:3 bzw. 1:4. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS (*phosphate-buffered saline*) + 0,05% EDTA kurz gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung für die benötigte Zeit bis zum Ablösen inkubiert (NBT-II-Zellen mit Viralex bis zu 15 min bei 37°C). Die Zellen wurden dann vom Schalenboden abgelöst und in 15 ml-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 900 rpm für 3 min wurde das Zellpellet in Medium aufgenommen, und in Aliquots auf neue Kulturschalen / -flaschen verteilt.

PC12-Zellen wuchsen in Suspension in Kulturflaschen. Je nach Zelldichte wurden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert und 1:2 verdünnt. Dazu wurden die Suspensionszellen bei 900 rpm für 3 min zentrifugiert und das Zellpellet wird in Medium aufgenommen und verdünnt in Kulturflaschen weitergezogen.

Die Hybridomzellen zur Produktion des mAk Be9.2 wurden in Serum-haltigem Medium kultiviert, bis die Zellen dicht gewachsen waren. Die Zellen wurden gewaschen, in Serum-freies Medium überführt und weiter kultiviert, bis die Zellen anfangen abzusterben. Das Medium wurde gesammelt, für 5 min bei 3.500 rpm zentrifugiert und steril filtriert. Die Antikörper wurden durch Affinitätschromatographie mit Protein-G-Säulen gereinigt.

Nährmedien und Puffer für die Säuger-Zellkultur

<i>Medium für RBE-Zellen:</i>	450	ml	RPMI-Medium
	50	ml	Fötale Kälberserum, inaktiviert
	50	MU	Penicillin
	50	mg	Streptomycin
	220	mg	L-Glutamin
<i>Medium für PC12-Zellen:</i>	450	ml	RPMI-Medium
	50	ml	Pferdeserum, inaktiviert
	50	MU	Penicillin
	50	mg	Streptomycin
	220	mg	L-Glutamin

<i>Medium für HeLa-Zellen:</i>	450	ml	RPMI-Medium
	50	ml	Fötale Kälberserum, inaktiviert
	50	MU	Penicillin
	50	mg	Streptomycin
	220	mg	L-Glutamin
<i>Medium für HT-29-Zellen:</i>	450	ml	RPMI-Medium
	50	ml	Fötale Kälberserum, inaktiviert
	50	MU	Penicillin
	50	mg	Streptomycin
	220	mg	L-Glutamin
<i>Medium für NBT-II-Zellen:</i>	450	ml	DMEM-Medium, high Glucose
	50	ml	Fötale Kälberserum, inaktiviert
	50	MU	Penicillin
	50	mg	Streptomycin
	220	mg	L-Glutamin
	1	mM	Pyruvat
<i>Medium für IEC-6-Zellen</i>	225	ml	DMEM-Medium, high Glucose
	225	ml	RPMI-Medium
	50	ml	Fötale Kälberserum, inaktiviert
	50	MU	Penicillin
	50	mg	Streptomycin
	220	mg	L-Glutamin
	1	mM	Pyruvat
50	U/ml	Insulin	
<i>Medium für MTC-/MTLn3-Zellen</i>	450	ml	α -MEM-Medium
	50	ml	Fötale Kälberserum
	50	MU	Penicillin
	50	mg	Streptomycin
	220	mg	L-Glutamin

PBS-Puffer für die Zellkultur

150	mM	NaCl
3	mM	KCl
8	mM	Na ₂ HPO ₄
1	mM	KH ₂ PO ₄

mit H₂O bidest. auf 1 l, pH 7,2
mit NaCl Osmolarität auf 300 mosm einstellen

PBS/EDTA

0,5 g EDTA (=1,34 mM)
in 1 l PBS lösen

Transfektion von DNA in Eukaryonten-Zellen

In RBE-Zellen wurden verschiedene Isoformen und Mutanten des CEACAM1 der Ratte mit Hilfe von Lipofectamin-2000 stabil transfiziert. Hierbei bindet die DNA an kationische Lipide in Liposomen. Diese Komplexe werden von den Zellen aufgenommen und ein Bruchteil der eingesetzten Vektor-DNA Menge gelangt in den Zellkern und integriert in die zelluläre DNA. $1,3 \times 10^6$ RBE-Zellen wurden auf 3,5 cm Schalen in Medium ohne Antibiotikum ausplattiert und kultiviert, bis 90% Konfluenz erreicht war. Zur Transfektion wurden 10 μ l Lipofektamin-2000 und 4 μ g der entsprechenden Plasmid-DNA in jeweils 250 μ l Opti-MEM-Medium (Gibco) gelöst und getrennt für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden beide Ansätze gemischt und für 20 min zur Bildung der DNA-Lipid-Komplexe inkubiert. Der Mix wurde anschließend direkt auf die Zellen gegeben und nach 5 h wurden die Zellen gewaschen bzw. das Medium gewechselt. Die Klonierung der transfizierten Zellen erfolgte durch limitierte Verdünnung in 96-Loch-Mikrotiterplatten. Die Zellen wurden soweit verdünnt, dass sich rein statistisch eine Zelle je Loch in 200 μ l Selektionsmedium befand. Einzelne Zellen konnte im Zeitraum von einigen Tagen zu einer Population heranwachsen, wurden in größere Kulturschalen überführt und die Proteinexpression mittels Immunblot und/oder FACS-Analyse überprüft.

Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung von Ratten-CEACAM1-long, -short, -Tyrosinmutanten und der Δ Cyto-Mutante findet sich in (Budt et al., 2002a). In Schweden wurden RBE-Zellen mit CEACAM1-short und long-cDNA in pRAX-Vektor transfiziert (Olsson et al., 1995).

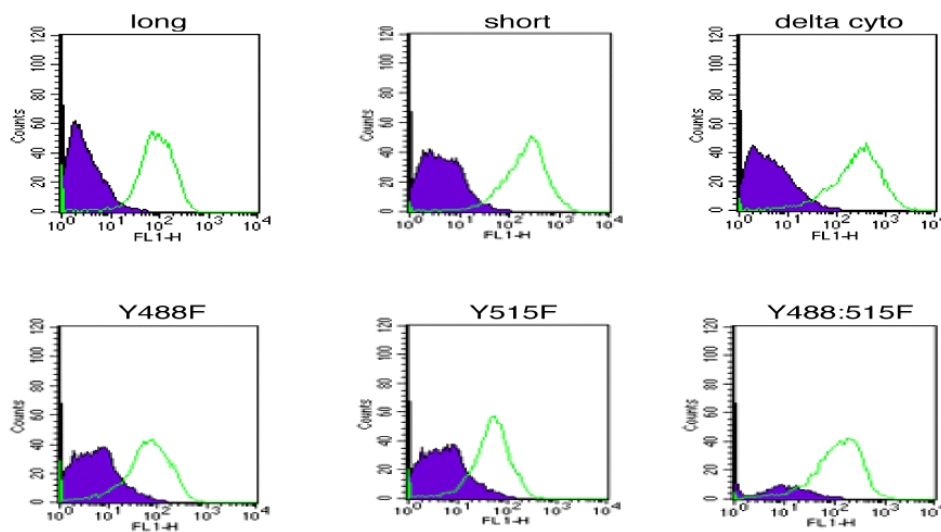


Abb. 75: Darstellung der Oberflächenexpression von CEACAM1-Isoformen oder -Mutanten in RBE-Zellen nach Transfektion, Selektion und Klonierung in der Durchflusszytometrie. Exemplarisch ist die Oberflächenexpression von CEACAM1-Molekülen auf einem der in dieser Arbeit verwendeten RBE-Klone, gezeigt. In blau: Isotyp-IgGs (Negativ-Kontrolle), in grün: CEACAM1-Isoformen bzw. -Mutanten dargestellt mit mAb Be9.2 und FITC-konjugierten sekundär-Antikörpern. long, short, Δ Cyto - CEACAM1-Isoformen mit langer, kurzer oder keiner zytoplasmatischen Domäne; Y488F, Y513F, Y488:513F - Tyrosin Einzel-, oder Doppelmutanten der langen CEACAM1-Isoform.

Selektionsmedien für transfizierte RBE-Zellen

RPMI-Medium wie oben angegeben, mit zusätzlich 600 μ g/ml Geneticin, später, für die Langzeit-Kultivierung 200-300 μ g/ml G-418 bzw. vor Versuchen kein G-418.

Transfektion durch Nukleofektion

Zur transienten Überexpression der Rac1-Konstrukte wurde die Transfektionsmethode der Firma Amaxa gewählt. Die Methode der Nukleofektion von Amaxa kombiniert die Elektroporation von Zellen mit optimierten Puffern eines jeden Zelltyps, um eine hohe Transfektionsrate bei hoher Überlebenswahrscheinlichkeit zu gewährleisten. (Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Versuchsschritte findet sich im Begleitheft der Firma bzw auf deren Homepage: www.amxa.com). Nicht konfluente Zellen wurden trypsiniert und vereinzelt. 2×10^6 Zellen wurden mit 2 µg Vektor-DNA in speziellen Transfektionspuffern (hier: Puffer V) gemischt und sofort mit dem entsprechenden Program des Nukleofektors (U-29) elektroporiert. Die transfizierten Zellen wurden sofort mit warmen RPMI-Standard-Medium (ohne G418) gemischt und vorsichtig ausplattiert. Nach 8 h konnten überexprimierte Rac1-Fusionsproteine im Western-Blot nachgewiesen werden.

Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Pelletierte Zellen können in Serum (Pferdeserum oder fötales Kälberserum respektive) oder mit Einfriermedium (20% FCS oder HS) mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und langsam eingefroren werden. Die Zellsuspension wird in Einfrier Röhrchen überführt und für einige Stunden bei -20°C gefroren oder, in Papiertücher umwickelt, direkt auf -80°C gebracht. Danach können sie bei -80°C (Wochen bis Monate) oder für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Gefrorene Zellpellets werden rasch aufgetaut und kurz vor dem vollständigen Auftauen vorsichtig in vorgewärmtes Medium pipettiert. Durch Pelletieren bei 900 rpm für 3 min wird das DMSO entfernt. Das Pellet wird in Medium resuspendiert und in Flaschen bzw. Schalen kultiviert.

Adhäsionsassay

Die Fähigkeit von Zellen, auf Matrixproteinen zu adhären, kann im Adhäsionsassay getestet werden. Die Zahl der adhären Zellen wird nach Färbung der Zellen photometrisch im ELISA-Reader quantifiziert. Es wurden 96-Well-Mikrotiterplatten (TPP) über Nacht bei 4°C mit je 20 µg/ml Matrixprotein (Laminin-1, Fibronectin, Kollagen-I, Kollagen-IV bzw. 2 µg/ml Vitronectin oder einer 1:20 Verdünnung Matrigel, oder als unspezifischer Vergleichsansatz: Poly-L-Lysin) in PBS beschichtet. Die Platten wurden 1x mit PBS gewaschen und mit 1% BSA für 4 h bei RT blockiert. Nach 1x Waschen mit PBS wurden pro Loch 3×10^4 Serum-starvierte Zellen (1 h) in 100 µl Serum-freiem Medium ausplattiert. Die Adhäsion erfolgte unterschiedlich lange, die deutlichsten morphologischen Unterschiede ergaben sich aber zum Zeitpunkt von 75 min, so dass dieser Zeitwert verwendet wurde. Anschließend wurden die Platten vorsichtig ausgeschlagen und zur Quantifizierung der Zellen mit PBS gewaschen bzw direkt (10-20 min) mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 0,1% Kristallviolett für 25 min bei RT gefärbt. Die Farbe wurde aus der Platte geschlagen und gründlich mit H_2O bidest. gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die gefärbten Zellen zur Dokumentation fotografiert (Digitalkamera im Phasenkontrast des Mikroskops) oder mit 0,5% Triton X-100 in H_2O bidest. lysiert. Die OD_{570} (Optische Dichte bei 570 nm) konnte nach ca. 1 h bestimmt werden. Pro Versuchsansatz wurden für jeden Wert mindestens vier Wells zur Auswertung herangezogen, aus denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden. Für die Darstellung Adhäsions-vermittelter morphologischer Unterschiede zwischen RBE/wt und RBE/CEACAM1-Zellen wurden die Zellen nach dem Fixieren für die indirekte Immunfluoreszenz vorbereitet (siehe unten).

Lösungen für die Färbung von Zellen

<i>Fixierlösung:</i>	1% Glutardialdehyd oder 4% PFA in PBS
<i>Kristallviolett-Färbelösung:</i>	0,1% Kristallviolett in H ₂ O bidest., filtrieren

Indirekte Immunfluoreszenz

Die Lokalisation zellulärer Proteine kann durch die indirekte Immunfluoreszenz untersucht werden. Dazu werden primäre Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine eingesetzt, die durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte sekundäre Antikörpern detektiert und sichtbar gemacht werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT, nur bei längeren Aufbewahrungszeiten im Kühlraum. Die Zellen werden je nach Vorbehandlung mit PBS gewaschen (nur wenn unbedingt Serumproteine entfernt werden mußten) oder direkt mit 4% Paraformaldehyd / PBS fixiert (10 min oder länger, RT). Zur Färbung intrazellulärer Proteine wurde mit 4% Paraformaldehyd + 0,025% Saponin / PBS permeabilisiert und fixiert (10 min, RT). Nach 1x Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS abgesättigt (über Nacht oder mindestens 1 h). Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte über Nacht oder für 2 h bei RT, anschließend wurden die Proben mindestens 3x mit PBS gewaschen und mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörpern für 2 h im Dunkeln inkubiert. FITC-gekoppeltes Cholera-Toxin-B oder Phalloidin-TRITC wurden während der 2. Inkubationsphase im Dunkeln mit dazugegeben. Nach 5x Waschen mit PBS werden die Objektträger kurz angetrocknet und anschließend mit Elvanol unter Objektgläsern eingedeckt. Die Ergebnisse wurden am Axiovert-200 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) bzw. am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM410 von Zeiss) dokumentiert. Das LSM kann im Gegensatz zum normalen Fluoreszenzmikroskop durch Anwendung des konfokalen Prinzips die exakte dreidimensionale Lage eines Signals darstellen. Unter der Einstellung Pinhole 20 wurde die Kolo-kalisierung der Proteine (CEACAM1-long / SHP-2 und CEACAM1-long F-Aktin) visualisiert.

Die Färbung von Gewebeschnitten erfolgte ähnlich: Die 20 µm dicken Schnitte wurden auf Gelatine-beschichtete Glasobjektträger aufgebracht und erneut mit 4% PFA fixiert. (Die Gewebeproben sind bereits über Nacht in 4% Paraformaldehyd fixiert worden und zur besseren Durchführung anschließend mit 30% Zuckerlösung beschwert worden, bis die Organe in der Lösung absinken. Alle Schritte bei 4 °C. In Zuckerlösung sind die fixierten Organe über Wochen stabil bei 4 °C lagerbar). Die Gewebeschnitte wurden bei -20°C gelagert. Zum Färben wurden die Schnitte aufgetaut, gut getrocknet (am besten unter dem Luftfluss einer Sterilbank) und, wenn nötig, für 15 min mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und anschließend mit 1% BSA für mindestens 1 h blockiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgt über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde gut gewaschen, mindestens 3x je 10 min mit viel PBS. Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundäntikörper wurden für 2 h bei RT mit den Gewebeschnitten inkubiert und anschließend mit viel PBS und unter häufigen wechseln gut gewaschen. Die getrockneten Schnitte wurden wie oben beschrieben eingedeckelt und analysiert.

Lösungen für Immunfluoreszenz-Analysen

<i>Fixierlösung:</i>	4% Paraformaldehyd in PBS für die Zellkultur
<i>Permeabilisierungslösung:</i>	0,025% Saponin bzw. 0,2% Triton X-100 für Gewebeschnitte
<i>Blockierlösung:</i>	1% BSA

Elvanol: 3 g Polyviol
in 40 ml PBS lösen und 16 h rühren lassen
15 ml Glycerin zugeben und weitere 16 h rühren lassen, 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren, Überstand zur Weiterverwendung dekantieren
1 mg Phenylendiamin / ml Gesamtvolumen zugeben und lichtgeschützt lösen, pH auf 8 einstellen, 250 µl Mercaptoethanol zugeben und lösen, Ansatz aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

Manipulationen während der Adhäsion

Während der Adhäsion von RBE-Zellen auf Laminin-1 oder Fibronectin wurden den Serum-starvierten Zellen zur Darstellung einer direkten Beteiligung von CEACAM1 mAb Be9.2 oder pAb α CC1-Antikörper bzw entsprechende Ig-Isotyp-Kontrollantikörper (je 50µg/ml) zugesetzt. Die Morphologie der Zellen (wt und CEACAM1-long) wurde anschließend in der indirekten Immunfluoreszenz analysiert. Die Beteiligung von Rho wurde durch Zugabe von Serum (10%) oder LPA während der gesamten Adhäsionsdauer (75 min, 50 oder 500 ng/ml) bzw durch Zugabe des ROCK-Inhibitors Y27632 (10µg/ml) für die gesamten 75 min oder für die letzten 30 min während der Adhäsion analysiert. Für Rac1-Experimente wurden RBE-Zellen (wt und CEACAM1-long) 8 h vor dem Ausplattieren auf die Matrixproteine nach Angaben des Herstellers durch Nucleofection mit Rac1-wt- bzw N17Rac1- oder L61Rac1-DNA transfiziert. Die Zellen durften sich für 7 h unter normalen Kulturbedingungen erholen, wurden für 1 h Serum-starviert und anschließend wie üblich in der Adhäsion getestet. Die Adhäsionsmorphologie wurde durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Die Länge der Zellfortsätze wurde mit Hilfe der ZeissVision-Software gemessen und statistisch ausgewertet.

Durchflusszytometrie/FACS (*fluorescence-activated cell scanning*)

Bei der Durchflusszytometrie müssen die vereinzelt Zellen nacheinander eine Messzelle passieren, in der sie von einem Laser angestrahlt werden. Über die von der Zelle verursachte Streuung des Lichtes erhält man Auskünfte über die Größe sowie Granularität der Zelle. Die Zellen können außerdem mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt werden, so daß man weitere Informationen über Zellart, Zustand und exprimierte Proteine der Zelle erhalten kann. Das FACS-Gerät von BD Biosciences Immunocytometry Systems verfügt über einen Argon-Laser, der eine Anregungswellenlänge von u.a. 488 nm generiert. Es stehen drei verschiedene Emissionskanäle zur Verfügung, so daß bis zu drei verschiedene Fluorochrome eingesetzt werden können, wenn ihre Anregung im Bereich von 488 nm und ihre Emission in nicht überlappenden Bereichen liegt (z.B. Fluorescein-Isothiocyant-FITC und Tetramethylrhodamine-Isothiocyant-TRITC bzw. Phycoerythrin-PE). Über die Inkorporation von Propidiumiodid (PI), das in Nukleinsäuren interkaliert, kann das Zellzyklus-Stadium bzw die Viabilität der Zellen bestimmt werden. Für die FACS-Analyse wurden pro Ansatz 10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen müssen in Trypsin+PBS/EDTA gut vereinzelt werden. Vereinzelt Zellen wurden mit primären Antikörpern für 1 h auf Eis inkubiert, 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper für 1 h auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und mittels FACScan

(Becton Dickinson) analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit Isotyp-Kontrollantikörpern, oder nur mit sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörpern inkubiert wurden. Für die Färbung mit PI wurden die Zellen 20 min vor dem Messen mit einer 1:100 Verdünnung (10 µg/ml) auf Eis gefärbt, gewaschen und sofort gemessen, da das PI sonst auch in lebende Zellen eindringt.

Für die Annexin-V Färbung ist zu beachten, dass Annexin-V Kalzium-abhängig Phosphatidylserin bindet. Alle Schritte, auch die Messung selbst, müssen daher in Ca²⁺-enthaltenen Puffern (5 mM) durchgeführt werden. Immunotools verschiebt einen eigenen speziellen Puffer mit Annexin-V-FITC.

***In vitro* Angiogenese auf Matrigel**

Matrigel wurde über Nacht im Kühlraum aufgetaut und mit kalter Pipettenspitze pipettiert. 80 µl je 96Well wurden Luftblasen-frei verteilt und für 30-60 min bei 37 °C im Inkubator geliegt. 3 x 10⁴ Zellen in 100 µl einer Einzelzellsuspension wurden anschließend auf die Oberfläche gegeben und über einen Zeitraum von 24 h beobachtet. Durch fotografieren im Phasenkontrast konnte die Netzwerkausbildung der Zellen dokumentiert werden.

***In vitro* Monolayer-Wundheilung**

Für Wundheilungs-Assays wurden konfluent gewachsene Zellen 24 Stunden nach dem Ausplattieren durch Abkratzen von Zellen mit einer Pipettenspitze "verwundet". Der entstandene, Zell-freie Spalt hatte eine Breite von ca. 300 µm. Zelltrümmer wurden durch mehrmaliges waschen mit vorgewärmten Medium entfernt. Bilder wurden bei 20-facher Vergrößerung mit einem Nikon-TMS Mikroskop aufgenommen, das mit einer Nikon-F-601 Kamera ausgestattet war.

Proliferationsassay

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens von Zellen wurde der colorimetrische BrdU-Cell-Proliferation-ELISA von Roche eingesetzt, der auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) beruht. Die Zellen werden bis zu 24 h mit 10 µM BrdU unter Zellkulturbedingungen inkubiert (Markierung der Zellen) und nach Fixieren und Lysieren der Zellen wurde das eingebaute BrdU über einen Peroxidase-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper detektiert und quantifiziert.

Der Assay wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten (PAA) durchgeführt, die unbeschichtet, oder mit 20 µg/ml Matrixproteinen beschichtet eingesetzt wurden. Pro Loch wurden 1x10⁴ Zellen in 100 µl Medium mit 10% oder 1% Serum und bei Bedarf mit Wachstumsfaktoren unterschiedlicher Konzentration eingesetzt. Im Falle der Matrixprotein-abhängigen Proliferation wurde den Zellen gleich mit dem ausplattieren BrdU zugesetzt (für 24 h), im Falle der Wachstumsfaktor-abhängigen Proliferation erst 12 h später, unter erneuter Stimulation mit frischen Wachstumsfaktoren (für 8 h). Die Platten wurden nach Beendigung der Inkubation ausgeschlagen, getrocknet (1 h 60 °C) und nach der Beschreibung des Herstellers (Roche) entwickelt. Zuerst mit 200 µl/Well FixDenat für 30 min bei RT fixiert, dann 100 µl/Well Anti-BrdU-Peroxidase-gekoppelten Antikörpern (10 µl/ml) für 90 min bei RT inkubiert. Die Platte wurde ausgeschlagen, mit 3x mit 200 µl/Well 1x Waschpuffer (10x washing-buffer 1:10 mit H₂O bidest. verdünnt) gewaschen und bis zur bevorzugten Farbentwicklung bei RT

mit 100 µl/Well Substratlösung (Tetramethylbenzidin) inkubiert. Anschließend wurde die Platte zur Quantifizierung des Substratproduktes bei 405 nm im ELISA-Reader vermessen. Pro Versuchsansatz wurden für jeden Wert mindestens drei Wells zur Auswertung herangezogen, aus denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden. Als Negativkontrollen wurden Wells ohne Zellen analysiert sowie Wells mit Zellen, denen kein BrdU zugesetzt wurde.

Lösungen für den Proliferationsassay

Bestandteile des Kits „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ von Roche:

<i>BrdU-labeling reagent 1000x:</i>	10 mM 5-Brom-2'-desoxyuridin in PBS, pH 7,4, steril
<i>FixDenat:</i>	Fixierungs- und Denaturierungslösung
<i>Anti-BrdU-POD:</i>	Maus mAb anti-BrdU Peroxidase-gekoppelt
<i>Antibody dilution solution:</i>	Verdünnungslösung für den Antikörper, wahlweise kann auch PBS verwendet werden
<i>Washing buffer 10x:</i>	10x PBS
<i>Substrate solution:</i>	TMB Tetramethyl-benzidine

Unlöslichkeit von CEACAM1 während der Adhäsion und Koimmunpräzipitation von Talin

5 x 10⁶ Serum-starvierte RBE-CEACAM1-Transfektanten oder Vektor Zellen wurden für 60 min auf Laminin-1 oder Fibronectin adhären gelassen bzw für 1 h als Einzelzellsuspension unter Drehen in einem nicht-adhären Zustand gehalten. Die Zellen wurden direkt während der Adhäsion mit Lysispuffer (0,5% TX-100 in HBSM für Unlöslichkeitsstudien und 1% TX-100 in HBSM + 1 mM CaCl₂ für Koimmunpräzipitationsexperimente) abgeschabt bzw durch Zentrifugation pelletiert und lysiert. Nach 1 h Solubilisation auf Eis wurden die Proben in der Minizentrifuge bei 13.000 rpm zentrifugiert. Für die Darstellung der Interaktion mit Talin wurden CEACAM1-Moleküle aus dem Überstand immunpräzipitiert (siehe auch Immunpräzipitation von Proteinen) und die Präzipitate im Western-Blot auf Anwesenheit von Talin, (-Actinin, Vinculin, Paxillin oder Integrinuntereinheiten hin untersucht. Zur Darstellung der Unlöslichkeit von CEACAM1 wurden die unlöslichen Zellbestandteile nach Zentrifugation mit reduzierenden 2x Probenpuffer aufgeköcht und anschließend mit Benzonase (1:100 oder 0,5 µl je Ansatz) zur DNA-Degradation behandelt. Aliquots der Pellets wurden im Immunblot auf Anwesenheit von CEACAM1 hin analysiert und zur Darstellung gleicher Proteinnengen je Spur mit anti(-Aktin bzw anti(-Tubulin Antikörpern entwickelt.

Erk1/2-Aktivierung während Integrin-vermittelter Adhäsion

5 x 10⁵ RBE-wt oder CEACAM1-exprimierende Zellen wurden wie oben beschrieben auf Laminin-1 oder Fibronectin (3,5 cm Schale) adhären gelassen. Nach 15, 30, 45 oder 60 min Adhäsion wurden die Zellen direkt mit heißem reduzierenden 2x Probenpuffer versetzt und abgeschabt. Nach Benzonase-Verdau zellulärer DNA wurden Aliquots der Proben im Western-Blot mit phospho-spezifischen Erk1/2 Antikörpern auf Aktivierung dieser MAP-Kinasen während der Adhäsion hin untersucht und anschließend nach Strippen der Membran auf gleiche Mengen Erk1/2 je Spur hin untersucht.

Denaturierender 2xProbenpuffer: siehe Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

Unlöslichkeit von CEACAM1-Isoformen nach Solubilisation mit unterschiedlichen Detergenzien

Jüngst konfluent (6 cm Schale) gewordene RBE/CEACAM1-Transfektanten wurden in Detergenz-haltigen Solubilisationspuffer (1% Detergenz in HBSM) abgeschabt und auf Eis solubilisiert. Nach 1 h wurden die Proben bei 17.000 x g / 13.000 rpm in der Mini-Kühlzentrifuge für 10 min zentrifugiert und der Überstand zur Analyse des solubilierten CEACAM1 verwendet. Das unlösliche, pelletierte Zellmaterial wurde 1x mit 1 ml kaltem HBSM gewaschen (Pellet aufwirbeln), erneut zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes in reduzierendem 2x Probenpuffer für 5-15 min unter Schütteln aufgeköcht. Nach DNA-Verdau mit Benzonase wurden Aliquots zur Darstellung der CEACAM1-Unlöslichkeit im Western-Blot untersucht. Gleiche Proteinmengen in den Pellets konnten durch immunblotten gegen (-Aktin und (-Tubulin gezeigt werden.

Solubilisationspuffer: 1% Detergenz in HBSM

Detergenz-Extrahierbarkeit von CEACAM1-Isoformen, dargestellt in der indirekten Immunfluoreszenz

Nicht fixierte, frisch konfluent gewordene RBE/CEACAM1-Transfektanten wurden optional für 1 min mit 0,1% TX-100 oder 0,1% CHAPS in Zytoskelett-stabilisierenden Puffer (ZSP) behandelt und anschließend sofort mit 4% PFA/PBS fixiert. Die Proben wurden anschließend durch indirekte Immunfluoreszenz auf Anwesenheit von CEACAM1-Molekülen hin untersucht bzw durch parallele Färbung von F-Aktin mit Phalloidin-TRITC auf Kollokalisierung beider Moleküle hin untersucht.

<i>Zytoskelett-stabilisierender Puffer (ZSP):</i>	10	mM	MES, pH6,1
	138	mM	KCl
	3	mM	MgCl ₂
	2	mM	EGTA
	0,32	M	Saccharose frisch dazugeben

Modulation der CEACAM1-CHAPS-Unlöslichkeit

Frisch konfluent gewordene RBE-Zellen wurden für 1 h Serum-staviert und entweder für 30 min mit Cytochalasin-D (4 µM) (oder DMSO zur Kontrolle) behandelt, oder zum Clustern von CEACAM1-Molekülen auf der Oberfläche mit mAb anti-CEACAM1 Antikörper Be9.2 (20 g/ml) für 20 min bei 4 °C und zusätzlich mit anti-Maus sekundär-Antikörpern (20 min, 37 °C) mit und ohne Cytochalasin-D (4 µM) stimuliert, mit aufsteigenden Konzentrationen M(CD (5, 15 und 30 mM) oder Saponin (0,02% und 0,2%) und anschließend in 1% CHAPS / HBSM abgekratzt und solubilisiert. Optional wurden einige Ansätze unter hohen Ionenstärken solubilisiert (1% CHAPS / HBSM), oder bei 37 °C. Die Unlöslichkeit von

CEACAM1 wurde nach Zentrifugation und Analyse des pelletierten Materials, wie unter Detergenz-Unlöslichkeit von CEACAM1 beschrieben, analysiert.

Biotinylierung von Oberflächenantigenen und Analyse im Immunblot

RBE/CEACAM1-long-Transfektanten wurden in 10 cm Schalen Serum-starviert und anschließend mit EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (0,5mg/ml) in Zellkultur-PBS pH, 8,0 für 30 min inkubiert. Nicht-reagiertes Biotinylierungsreagenz wurde mit 50 mM Tris pH 8,0 in Zellkultur-PBS pH 8,0 durch einmaliges Waschen entfernt bzw die Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden wie gewöhnlich solubilisiert, der Dichtegradientenzentrifugation unterworfen und im Western-Blot hinsichtlich der Verteilung biotinylierter Proteine durch Peroxidase-gekoppeltes (POD)-Streptavidin im Gradient untersucht. Zur Darstellung der Biotinylierung von CEACAM1-Molekülen wurden diese mit Be9.2 immunpräzipitiert und im Western-Blot mit POD-Streptavidin detektiert. Mit CEACAM1 kopräzipitierende, biotinylierte Proteine wurden nach Immunpräzipitation von CEACAM1 mit pAb (CC1-Antikörpern und 2x Waschen im Western-Blot mittels POD-Streptavidin dargestellt.

Tyrosinphosphorylierung von Proteinen und Tyrosinkinase-Inhibition

Grundsätzlich wurden Zellen nicht mit Pervanadat stimuliert, wenn es nicht ausdrücklich erwähnt wird. 100 µM Pervanadat waren aber Bestandteil der Lysispuffer. Wenn keine Koimmunpräzipitation folgte, wurde mit 0,2% SDS im Lysispuffer (1% TX-100/HBSM) solubilisiert. Zur Solubilisation von CEACAM1-Molekülen nach Cholesterin-Depletion mit M(CD musste mit n-octyl(-D-Glucopyranosid gearbeitet werden, da CEACAM1 mit steigenden M(CD-Konzentrationen unlöslicher wurde und auch mit SDS nicht extrahiert werden konnte. Frisch konfluent gewordenen RBE/CEACAM1-long-Transfektanten wurden für 1 h Serumstarviert, und zusätzlich optional mit Inhibitor PP2 (5 µM, zur Inhibition von Tyrosin-Kinasen der src-Familie) bzw mit Genistein (10 µM, zur Inhibition von src-Kinasen und verschiedener Rezeptor-Tyrosinkinasen) oder mit DMSO (Lösungsmittelkontrolle) für 30 min bei 37°C vorbehandelt, oder mit unterschiedlichen Konzentrationen M(CD (5-30 mM) für 20 min bei 37°C vorbehandelt, und anschließend durch Abschaben in Lysispuffer (1% TX-100, 0,2% SDS in HBSM), Immunpräzipitation und Analyse im Immunblot auf Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long, CEACAM1-long-Tyrosinmutanten bzw VE-Cadherin untersucht.

Tyrosinphosphorylierung von CEACAM1-long nach Auftrennung im Dichtegradienten

Frisch konfluent gewordene RBE/CEACAM1-long-Zellen wurden CHAPS-Solubilisiert und durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Fraktionen 1-5 und 6-10 wurden jeweils zusammengefasst und zur Zerstörung vesikulärer Strukturen mit 10%iger SDS-Stammlösung auf eine Endkonzentration von 0,2% eingestellt. CEACAM1-Moleküle wurden mit Hilfe von pAb (CC1-Antikörpern und Protein-A-Sepharose immunpräzipitiert und im Western-Blot auf Tyrosinphosphorylierung hin untersucht. Nach Strippen wurde anschließend die Menge präzipitierten CEACAM1 mit Be9.2 detektiert.

Statistik

Alle statistischen Erhebungen wurden mit Student's t-Test (Microsoft Excel™) ermittelt.

Proteinchemische Methoden

Solubilisieren von Säugerzellen

Zellpellets oder adhärenente Zellen werden mit Solubilisierungspuffer, (+Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500) und PMSF (1 mM)) versetzt und für ca. 1 h bei 4°C lysiert. Leber oder Hepatomgewebe wurde zuvor von Binde- und Fettgewebe befreit und im Ultra-Turrax T25 zerkleinert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in Solubilisationspuffer aufgenommen und durch 10 Züge im Dounce-Homogenisator homogenisiert und für 1 h Solubilisiert. (Das im Puffer enthaltene Detergenz solubilisiert dabei die Membranproteine.) Anschließend wurde für 10 min bei 13.000 rpm (17.000 x g) in der Eppifuge zentrifugiert. Der Überstand stellt das Solubilisat dar, im Pellet befinden sich nicht solubilisierbare Bestandteile wie Zytoskelett, Zytoskelett-assoziierte Proteine, Membran-Mikrodomänen und Zellkerne.

Lösungen zum Solubilisieren der Zellen:

HBSM-Puffer, pH 7,2: (Hepes-buffered saline magnesium)

150	mM	NaCl
5	mM	MgCl ₂
20	mM	Hepes, pH 7,2
1	%	Detergenz

optional: + 0,2 % SDS, siehe entsprechende Methode
 optional: + 1 mM CaCl₂, siehe entsprechende Methode

Proteinbestimmung

BCA-Methode

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurde der BCA-Test-Kit der Firma Pierce verwendet. Der Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B (4% CuSO₄x5H₂O).

Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu²⁺ zu Cu⁺. Die Bichinonin-4-carbonsäure (BCA) reagiert mit Cu⁺, wobei zwei Bichinoninsäure-Moleküle einen intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu⁺-Ion eingehen.

Die Proben werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 200 (l der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wird, versetzt. Nach Inkubation für ca. 20 min bei 37°C wird die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Aus BSA-Proben bekannter Konzentrationen kann eine Eichreihe erstellt werden, anhand derer die Konzentration der unbekannteren Probe bestimmt werden kann.

Lösung A und Lösung B, bezogen bei Pierce

Bradford-Methode:

Bei Lösungen ohne Detergenz oder zum sofortigem Überprüfen einer Probe auf Proteingehalt (qualitativer Tüpfeltest) wurde die Proteinbestimmung auch nach der Methode von Bradford durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliant-Blue G 250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn es in saurer Lösung an Proteine (hauptsächlich über Arginin-Reste) bindet. Diese Bestimmung ist schnell durchführbar. 1-20 µl einer Proteinprobe werden mit 200 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Lösung wird innerhalb von 15 min photometrisch bei 595 nm gemessen. Zur Proteinbestimmung dient auch hier eine Proteineichreihe, die mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt wird.

Lösungen für die Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz-Lösung: 100 mg Coomassie-Brilliant-Blue
 50 ml Ethanol
 100 ml H₃PO₄ konz.
 ad 1 l H₂O, (Lösung vor Gebrauch filtrieren)

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die vertikale Elektrophorese von Proteinen wurde das Mini-Protean-System II der Firma Biorad verwendet. Grundsätzlich kamen diskontinuierliche Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel zum Einsatz. Die Lösungen werden gemischt und nacheinander, d.h. Sammelgellösung erst nach Polymerisation des Trenngels, zwischen die zusammengebauten Glasplatten gegossen.

Die SDS-PAGE wird unter denaturierenden und reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proben werden im Verhältnis 5:1 mit 5-fach konzentriertem Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C gekocht.

Die Elektrophorese erfolgte zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel bei konstanter Spannung von 120 V und zur Auftrennung im Trenngel bei konstanter Spannung von 170-200 V.

Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

<i>Lösung A</i>		<i>Lösung B</i>	
30	% Acrylamid (w/v)	0,2	% SDS (w/v)
0,8	% N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)	1,5	M Tris-HCl, pH 8,8
<i>Lösung C</i>		<i>10x Laufpuffer</i>	
0,2	% SDS (w/v)	0,25	M Tris, pH 8,8*
0,5	M Tris-HCl, pH 6,8	1,92	M Glycin
		1	% SDS (w/v)
		*kein HCl zum Titrieren einsetzen	

<i>X%ige Trenngelösung</i>			<i>4%ige Sammelgellösung</i>		
X/30*9	ml	Lösung A	0,4	ml	Lösung A
2,25	ml	Lösung B	0,75	ml	Lösung C
9-(LsgA+LsgB)	ml	H ₂ O bidest.	1,85	ml	H ₂ O bidest.
45	µl	APS (10%)	12	µl	APS (10%)
4,5	µl	TEMED	3	µl	TEMED

5x Probenpuffer nicht reduzierend

12,5	%	SDS (w/v)
0,3	M	Tris-HCl, pH 6,8
50	%	Glycerin (v/v)
0,015	%	Bromphenolblau (w/v)

5x Probenpuffer reduzierend

Wie nicht reduzierender Probenpuffer mit Zusatz von entweder 25% 2-Mercapto-propandiol oder 50 mM Dithiothreitol.

Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Schägger und von Jagow, 1987)

Mit Hilfe des Tris-Tricin-Systems können Proteine in einem Molekularbereich von 1-300 kD in einem Gellauf analysiert werden. Außerdem ist das Tricin-Gel-System wenig anfällig gegen hohe Salz- (bis zu 2 M NaCl in der Probe) und Detergenzkonzentrationen. Auch können Proben mit bis zu 200 µg Protein pro Spur analysiert werden, was sich für die Analyse der Zellpellets als hilfreich erwies. Ferner erscheinen die Banden von hochglykosylierten Proteinen wie den CEACAMs nicht als mehrere Millimeter verschmierte Banden, sondern als fokussiertere Banden im Gel und im Western-Blot, was für die Darstellung der Tyrosinphosphorylierung hilfreich ist (Bandenaufkonzentrierung um bis 10-fach). Durch das Glycerin im Trenngelpuffer ist es möglich, das Sammelgel sofort nach dem Gießen des Trenngels einzufüllen und beide Gele gleichzeitig polymerisieren zu lassen. Die Trennung erfolgt während des Einlaufens der Proben ins Sammelgel bei 30-60 V und im Trenngel bei 90-120 V.

Acrylamid-Bisacrylamid- (49,5% T, 3% C) 48% (w/v) Acrylamid, 1,5% (w/v) Bisacrylamid (im Original).

Mit 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid, ändert sich das Laufverhalten und die Auftrennung ein wenig, ist dem Lämmli-System in seinen Laufeigenschaften aber noch immer weit überlegen.

Lösungen für Tricin-Gelsysteme

<i>Anoden-Puffer:</i>	0,2	M	Tris-HCl, pH 8,9
(+, unten)			
<i>Kathoden-Puffer:</i>	0,1	M	Tricin
(-, oben)	0,1	%	SDS
	0,1	M	Tris-HCl, pH 8,3
<i>Gel-Puffer:</i>	0,3	%	SDS
	3,0	M	Tris-HCl, pH 8,45

Ansatz für 4 Minigele (im Original):

	Trenngel (10% T, 3% C)		Sammelgel (4% T, 3% C)	
Acryl/Bisacryl- Stammlösung	3,1	ml	1,0	ml
Gel-Puffer	5,0	ml	3,1	ml
Glycerin	1,5	ml	--	
H ₂ O bidest.	ad 15	ml	ad 12,5	ml
APS 10%	75	µl	100	µl
TEMED	7,5	µl	10	µl

Mit einer 30% Acrylamid-, 0.8% Bisacrylamid-Stammlösung, ändert sich das Volumen der Acryl/Bisacrylamidlösung um die entsprechende Menge (Prozentzahlen beachten).

Färbung von Protein-Gelen

Coomassie-Blau-Färbung

Proteine lassen sich im Gel mit Coomassie-Blau G250 (*Coomassie brilliant blue*, CBB) färben. Die Empfindlichkeit der Färbung ist nur mäßig: die untere Detektionsgröße liegt bei 200-400 ng pro Bande. Unterschiede bei der Anfärbbarkeit verschiedener Proteine treten, wie für die Silberfärbung weiter unten beschrieben, zwar auch bei der Färbung mit Coomassie Blau auf, sie sind jedoch weit weniger häufig und ausgeprägt. In erster Näherung kann man bei der CBB-Färbung davon ausgehen, dass die Signalintensität für alle Proteinspezies auf die gleiche Weise mit der Proteinmenge korreliert und entsprechende Färbeverfahren daher für eine Quantifizierung heranziehen.

Nach der Elektrophorese werden Mini-Gele für 20-30 min in der Färbelösung und anschließend für 2-3 h in der Entfärbelösung geschwenkt. Die Entfärbelösung wird während der Inkubation mehrmals erneuert.

CBB-Gel-Färbelösungen

<i>CBB-Färbelösung:</i>	40	%	Ethanol (v/v)
	10	%	Essigsäure (v/v)
	1	%	Serva Brilliant Blue G-250 (w/v)

<i>CBB-Entfärbelösung:</i>	40	%	Ethanol (v/v)
	7,5	%	Essigsäure (v/v)

Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bilden Ag⁺-Ionen Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Die Ag⁺-Komplexe werden durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert. Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von geringen Proteinmengen: die untere Grenze liegt bei 5 ng pro Bande. Allerdings ist die Silberfärbung nicht quantifizierbar und es werden außer Proteinen auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide angefärbt. Bei der Silberfärbung treten für verschiedene Proteine extrem starke Unter-

schiede in der Signalintensität auf, so daß die Intensität der Färbung kaum einen Rückschluß auf die tatsächlich vorhandene Proteinmenge zulässt.

Das Gel wird mindestens 20 min in Fixierlösung inkubiert (oder vorher Coomassie-gefärbt) und anschließend 3x für 5 min in 50% Ethanol/H₂O bidest. gewaschen. Das Gel wird 1 min in der Thiosulfatlösung inkubiert, 3x für 20 sec mit H₂O bidest. gewaschen und für 12-20 min in Silbernitratlösung inkubiert. Es wird 2x für 20 sec mit H₂O bidest. gewaschen und in der Entwicklerlösung so lange inkubiert, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht ist. Anschließend wird das Gel nochmals mit H₂O bidest. gewaschen und die Reaktion mit Fixierlösung gestoppt. Die Gele können in H₂O bidest oder 50% Ethanol/H₂O bidest gelagert und geschrumpft werden.

Silber-Gel-Färbelösungen

Fixierer

50% Methanol
12% Essigsäure

Silbernitratlösung

0,08 g AgNO₃
0,02% Formaldehyd
ad 50 ml mit H₂O bidest.

Thiosulfatlösung

0,02% Natriumthiosulfat

Entwickler

3% Natriumcarbonat
0,05% Formaldehyd
0,0005% Natriumthiosulfat

Western-Blotting

Es wurde nach dem Tank-Verfahren in Blotapparaturen der Firma Biorad geblottet. Direkt nach der Elektrophorese wurde der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut, so daß die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigte. Der Transfer wurde bei 4°C mit einer konstanten Stromstärke von 280 mA für mindestens 60 min (bis zu 3 h) in Transfer-Puffer durchgeführt. Die Kontrolle des Transfers erfolgte durch Färbung der Proteine auf der Membran mit dem Farbstoff Ponceau-S-Rot. Nach ca. 1-minütiger Färbung in Ponceau-Lösung wurde mit 1%iger Essiglösung oder aqua dem. wieder entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards wurden, wenn nötig, markiert, und die Membran mit PBS wieder komplett entfärbt.

Lösungen für den Immunblot (Western-Blot)

Transferpuffer

150 mM Glycin
20 mM Tris-HCl, pH 8,3
10 % Methanol (v/v)

Ponceau-Färbelösung

2 % Ponceau-Rot (w/v)
30 % TCA (v/v)
30 % Sulfosalicylsäure (w/v)
vor Gebrauch 1:4 mit H₂O bidest. verdünnen

Ponceau-Entfärbelösung

1 % Essigsäure (v/v)

Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen

Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgte die Blockierung in 10% Magermilchpulver in PBS oder für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen (phospho-Tyrosin oder spezifische phospho-Protein erkennende Antikörper) mit 5% BSA in TBS (pH 7,5-7,8) für mind. 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Alle anschließenden Inkubations- und Waschschrte werden in PBS bzw. PBS-T (PBS-Tween) oder TBS bzw. TBS-T , pH 7,5-7,8 durchgeführt. Die Membran wurde gewaschen, anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primäantikörper für 2 h bei RT, oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde 3x gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 2 h bei RT inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBS-T oder TBS-T wird das Tween durch Waschen mit PBS bzw. TBS entfernt und der Blot mittels Luminolreagenzien und Chemilumineszenz entwickelt. Dazu wurde der feuchte Blot in eine Klarsichthülle gelegt, überschüssige Flüssigkeit entfernt, anschließend mit einer Mischung aus 10 µl Lösung A, 1 ml Lösung B und 3 µl Lösung C (Peroxidase-Substratlösung) benetzt und gleichmäßig verteilt. Die Signale wurden mit dem digitalen LAS-Imaging-System (Fujifilm) erfasst. Bei schwachen Blotsignalen wurde zusätzlich ein Röntgenfilm (Kodak) für 5 sec bis 30 min belichtet und anschließend in Entwickler- und Fixierlösung (Kodak) nach Hersteller Angaben entwickelt. Sollten mehrere Antigene auf der selben Membran dargestellt werden, so wurde diese je nach Größe der zu untersuchenden Antigene zerschnitten und parallel bearbeitet bzw wenn dies nicht möglich war mit unterschiedlichen Antikörpern nacheinander behandelt. Nur wenn das selbe Antigen nach Phosphorylierungsnachweis (Tyrosinphosphorylierung von CEACAM-long, VE-Cadherin oder FAK bzw Erk1/2-Aktivierung) zur Darstellung gleicher Proteinmengen noch einmal nachgewiesen werden musste, wurde zwischendurch gestrippt (nach Angaben des Herstellers: Reblot Plus Strong Strippingsolution, Chemikon: 1:10 verdünnen der Stammlösung und Inkubation unter Schütteln für 10-20 min), neu blockiert und anschlies-send wie gewohnt detektiert (mit unterschiedlich guten wie schlechten Ergebnissen; die Stripping-Solution sollte unbedingt frisch sein, und nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden).

Lösungen für den Immunblot (Western-Blot)

Waschpuffer

PBS-Puffer

140	mM	NaCl, pH 7,8
8,1	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	NaH ₂ PO ₄

PBS-T

PBS-Puffer + 0,1% Tween 20

TBS-Puffer

150	mM	NaCl
10	mM	Tris-HCl, pH 7,6

TBS-T

TBS-Puffer + 0,1% Tween 20

Peroxidase-Reaktion

<i>Lösung A:</i>	6,8	mM	p-Cumarsäure in DMSO
<i>Lösung B:</i>	1,25	mM	Luminol in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5
<i>Lösung C:</i>	3	%	H ₂ O ₂ (v/v)
<i>Entwickler:</i>			Kodak GBX Entwicklerkonzentrat, 1:5 zu verdünnen
<i>Fixierer:</i>			Kodak GBX Fixiererkonzentrat, 1:5 zu verdünnen

Immunpräzipitation

Mit spezifischen Antikörpern können gezielt Proteine aus einem Proteingemisch angereichert bzw. präzipitiert werden. Dazu wird der Antikörper an Protein-A- bzw. Protein-G-Sepharose gekoppelt und mit dem Proteingemisch inkubiert. Protein-A und Protein-G sind Proteine der bakteriellen Zellwand (Protein-A aus *Staphylococcus aureus* und Protein-G aus *Streptococcus sp.*), die eine hohe Affinität zur Fc-Region vieler Immunglobuline der Säuger besitzen. Diese Proteine bieten sich zur Aufreinigung und Anreicherung von Antikörpern bzw. Immunkomplexen an, da nach der Bindung des Fc-Teils der Fab-Anteil weiterhin für die Antigenbindung verfügbar ist.

Pro Immunpräzipitation wurden an 30 µl Protein-A- bzw. Protein-G-Sepharose 1-4 µg gereinigte IgGs oder durch Inkubation mit 3-10 µl nicht gereinigte Kaninchen-IgGs gekoppelt. Dazu wird die Sepharose in PBS oder HBSM äquilibriert, mehrere Male gewaschen und jeweils bei 800 rpm für 1 min pelletiert. Die Kopplung der Antikörper an die Sepharose erfolgte drehend bei 4°C für mindestens 30 min.

Für die Immunpräzipitation können gefrorene oder frische Zellysate bzw. Proben verwendet werden, für Koimmunpräzipitationen wurden jedoch nur frische Solubilisate verwendet. Aufgetautes Material sollte unbedingt 10 min hochtourig zentrifugiert werden, um ausgefallene Proteine zu entfernen. Je Immunpräzipitation wurden 0,5-2 mg Gesamtprotein oder mindestens 2 ml Zellkulturüberstand eingesetzt und für 2 h (normale Immunpräzipitation, Immunpräzipitation für Phosphorylierungsnachweise und Koimmunpräzipitation) oder auch über Nacht (normale Immunpräzipitation) drehend bei 4°C mit der Antikörper-gekoppelten Protein-A- bzw. Protein-G-Sepharose inkubiert. Nach der Immunpräzipitation wurden die Immunkomplex-Sepharosekügelchen bei 800 rpm für 1 min pelletiert, und mindestens 2x, je nach Anwendung auch öfter, gewaschen und anschließend mit 2x SDS-PAGE-Probenpuffer abgekocht. Die abgekochten Proteine wurden in der SDS-PAGE getrennt und im Immunblot analysiert.

Lösungen für die Immunpräzipitation

<i>Solubilisierungspuffer:</i>	20	mM Hepes, pH 7,5
	150	mM NaCl
	1	mM MgCl ₂
(für die Koimmunpräzipitationen von Talin	1	mM CaCl ₂)
	1	% Detergenz

<i>Waschpuffer:</i>	20	mM Hepes, pH 7,5
	150	mM NaCl
	1	mM MgCl ₂
	1	mM CaCl ₂
	0,02	% Detergenz

Gelfiltration

Serum-starvierte RBE/CEACAM1-ΔCyto Zellen wurden solubilisiert (mit 1 mM PMSF, Proteaseinhibitor-Cocktail 1:500 und 1 mM Na₃VO₄). Das Lysat wurde mit 13.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und 1 ml des Überstandes wurde auf eine für die Benutzung mit dem FPLC[®]-System konzipierte Superdex[®]200-Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen,

die mit Detergenz-haltigen (0,05%) Laufpuffer äquilibriert wurde. Die Elution erfolgte mit Laufpuffer (= Äquilibrierungspuffer) (0,2 ml/min). Es wurden 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Säule wurde zusätzlich mit einem externen Standard (Gel Filtration Chromatography Standard von Biorad) in HBSM kalibriert. Die unter diesen Bedingungen durchgeführte Gelfiltration dient nicht dem exakten Nachweis von Stokes-Radius oder Molekulargewicht von Proteinkomplexen, sondern allein der Abschätzung der Größe von Proteinkomplexen. Die Fraktionen werden mit SDS-PAGE getrennt und im Immunblot analysiert. Alle Schritte wurden im Kühlraum mit filtrierten Lösungen durchgeführt.

Herstellung von Natriumorthovanadat- und Pervanadat-Lösung

Vanadate neigen in Lösung zur Bildung von oligomeren und polymeren Addukten. Durch wiederholte Zyklen von Erhitzen und Einstellen des pH-Wertes erhält man das monomere Orthovanadat. Eine 100 mM Na₃VO₄-Lösung wird auf pH 10 eingestellt. Die Lösung sollte gelb sein. Die Lösung wird bis zur Entfärbung aufgekocht und nach Abkühlen auf RT wird der pH-Wert erneut justiert. Der Zyklus wird dreimal wiederholt, anschließend wird die fertige Lösung in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Zur Erzeugung von Pervanadat wird diese Stamm-lösung mit 30% H₂O₂ für 5 min bei RT oxidiert. Der Mix kann direkt zur Behandlung von Zellen eingesetzt werden (Endkonzentrationen von 100 µM Pervanadat), oder Solubilisations-puffern beigemischt werden (auch 1:1000).

Quantifizierung der Detergenz-Unlöslichkeit von CEACAM1

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

Quantifizierung der Tyrosinphosphorylierung

CEACAM1, VE-Cadherin oder FAK wurden durch Immunpräzipitation aus Zelllysaten angereichert und im Immunblot zuerst auf phospho-Tyrosin (PY)-Signale, dann auf die nachweisbare Menge an CEACAM1, VE-Cadherin oder FAK hin untersucht. Der Quotient aus PY-Signal / spec. Proteinsignal wurde für Kontrollen gleich 1 (oder 100%) gesetzt, so dass sich die relative Veränderung (x-fache Erhöhung oder in %) der Tyrosinphosphorylierung für jede Probe im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ergab.

Isopyknische diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation zur Isolierung von Membranmikrodomänen

RBE-Zellen wurden in 10 cm Schalen mind. 60 min Serum-starviert, manipuliert (mit 5 min Pervanadat, Antikörper-vermitteltes Quervernetzen (20 min 20 µg/ml Be9.2 4 °C + 20 min se-

kundäre anti-Maus Antikörper (20 min 37 °C), Cytochalasin-D-Behandlung (4 μ M), oder M β -CD-Behandlung (30 mM) bzw Saponin-Behandlung (0,2%) oder direkt durch Abschaben in Detergenz-haltigen Lysispuffern geerntet. Nach 1 h Solubilisation wurde 1 ml des Lysats ohne vorheriges abzentrifugieren in der Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Dazu wurde die Probe mit 90% (w/v) Saccharose-Stammlösung in HBSM gemischt bis eine homogene Lösung entstand, diese wurde in ein Ultrazentrifugation-taugliches Röhrchen überführt und mit je einem Milliliter 35%, 20% und 5% Zuckerlösung in HBSM überschichtet. Bessere Ergebnisse wurden erzielt, wenn anstelle der 20%igen Lösung noch einmal 35%ige Zuckerlösung verwendet wurde. Der diskontinuierliche Gradient wurde für mindestens 16 h bei 4 °C bei 120.000 g zentrifugiert und anschließend von oben beginnend in zehn 500 μ l Einheiten fraktioniert. Die Membranmikrodomänen reichern sich unter diesen Bedingungen aufgrund ihrer geringen Dichte an der Grenze der 5%- und 35%-Schicht an, während lösliche Proteine (zytosolische und solubilisierte Membranproteine) in den unteren 45%-Schichten des Gradienten verbleiben. Aliquots aller Fraktionen wurden mit 5x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht und im Immunblot auf die Verteilung von Proteinen hin getestet. Zur Darstellung von CEACAM1-Molekülen mussten die Fraktionen teilweise (z.B. IEC-6 Zellen) durch TCA-Fällung aufkonzentriert werden. Dazu wurden 400 μ l Aliquots mit 10%iger TCA-Lösung auf eine Endkonzentration von 4% TCA eingestellt. Unter diesen Bedingungen fallen Proteine auf Grund von Denaturierung im sauren Milieu und Herabsetzung der Dielektrizitätskonstante des Wasser aus. Nach Zentrifugation (Minizentrifuge 13.000 rpm /17.000 x g) wurden die Pellets direkt in 20 μ l 2x Probenpuffer aufgenommen, und wenn Bromphenolblau einen gelben Umschlag anzeigte mit 2 M Tris-Lösung, pH 11 zusätzlich neutralisiert (1-3 μ l). Nach Aufkochen der Proben konnten diese durch SDS-Gelelektrophorese und Immunblot analysiert werden.

Unlösliches Material nach der Gradientenzentrifugation wurde durch Spülen mit HBSM-Puffer vom Zentrifugationsröhrchen abgelöst und in ein Eppi überführt. Nach Pelletieren (13.000 rpm / 17.000 x g) und Abnehmen des Überstandes wurden die Pellets in 40-60 μ l reduzierenden Probenpuffer unter Rütteln aufgeköcht (auch gerne länger als 5 min). Nach DNA-Verdau mit Benzonase (1:100, bzw. mind. 0,5 μ l)(und vorhergehender Ultraschallbehandlung einiger Proben) für mindestens 1 h RT konnten die Proben (10-15 μ l je Spur) durch SDS-Gelelektrophorese und Immunblot analysiert werden.

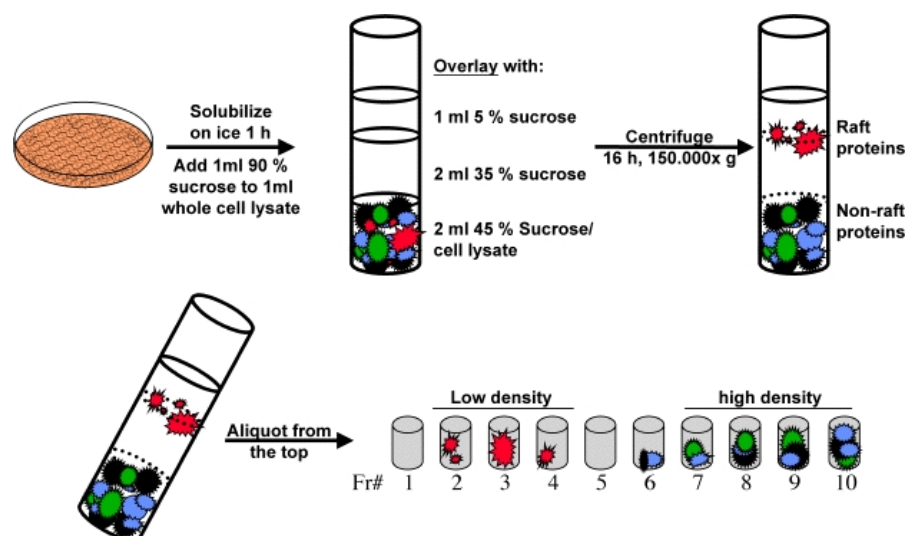


Abb. 76: Schematische Darstellung der Fraktionierung von Membranproteinen durch isopyknische diskontinuierliche Saccharose-Gradientenzentrifugation.

Detergenz-freie Methode nach Song et al. (Song et al., 1996):

Zur Darstellung von Membran-Mikrodomänen ohne Detergenzien, wurden die Zellen in Na_2CO_3 -Puffer pH 11 abgeschabt und auf Eis 10 x mit Ultraschall (Ultraschallstab) behandelt. 1 ml der Probe wurde anschließend mit 90%iger Zuckerlösung in NaCO_3 -Puffer pH 7,5 vermischt und entsprechend mit 35%, 20% und 5%iger Zucker/ NaCO_3 -Lösung überschichtet und für 16 h wie oben zentrifugiert und im Western-Blot analysiert.

Reinigung von Antikörpern durch Affinitätschromatographie

Zur Reinigung von Antikörpern wurde die Affinität der bakteriellen Proteine A und G an die Fc-Teile von Antikörpern genutzt. Der mAk Be 9.2, Subklasse IgG_1 , wurde über eine 1 ml Protein-G Fast-Flow-Säule (Pharmacia) gereinigt. Alle Schritte wurden bei 4°C mit einer Flussrate von 0,5 ml / min durchgeführt. Die Säule wurde mit 5 ml Zellkultur-PBS äquilibriert, dann wurden je nach Gehalt 50 bis 200 ml zentrifugierter und steril-filtrierter Zellkulturüberstand des Hybridoms über die Säule gegeben. Dann wurde mit PBS gewaschen und der gebundene Antikörper mit 0,1 M Glycin, pH 2,3 eluiert. Die erhaltenen Eluate wurden sofort mit 1 M Na_2CO_3 neutralisiert und gegen PBS dialysiert. Die Fraktionen wurden durch Proteinbestimmung auf Proteinkonzentration und im SDS-Gel durch Coomassie-Färbung auf Sauberkeit hin untersucht. Die Reinigung von Antikörpern aus Kaninchen-Serum wurde auf analoge Weise mit einer Protein-A-Säule durchgeführt. Pro Aufreinigung wurde ca. 50 ml Serum eingesetzt.

Peptide-Mass-Fingerprinting

Die Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie eignet sich für Proteine, die N-terminal blockiert sind oder nur in geringen Mengen vorliegen. Mit MALDI-TOF (*Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time-of-Flight*) können Peptide noch im unteren pico-Mol-Bereich analysiert werden. Die zu untersuchenden Proteine werden nach gelelektrophoretischer Trennung im Gel durch spezifische Proteasen in kleine Peptide gespalten. Die Fragmente werden eluiert, in eine Matrix eingebettet und die Massen bestimmt. Anhand der charakteristischen Fragmentlängen die nach Spaltung eines jeden Proteins entstehen, können Proteine identifiziert werden, sofern sie bereits bekannt sind und ihre vollständige Sequenz ermittelt ist (Pappin, 2003).

Die zu analysierenden Proben wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, Coomassie gefärbt und die Banden ausgeschnitten. Nach Waschen mit H_2O wurde mit Acetonitril dehydratisiert und entfärbt. Ein Teil der Probe wurde mit Dithiothreitol reduziert und mit Iodacetamid an Cystein-Resten derivatisiert. Zum Rehydratisieren wurde Trypsin mit in die Lösung gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Überstand mit den Peptiden wurde abgenommen, die Gelstücke noch 2x gewaschen und die Überstände vereinigt. In einer Speed-Vac und einer C_{18} -Matrix (Zip-Tip C_{18} -Pipettenspitzen) wurden die Fragmente konzentriert und anschließend in eine α -Cyano-Zimtsäure-Matrix eingebettet. Nach MALDI-TOF-Analyse (Standard: Angiotensin und ACTH) konnten die erhaltenen Spaltungsmuster mit Hilfe der PROSITE (SWISSPROT)-Datenbank ausgewertet werden.

Molekularbiologische Methoden

Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Menge und Reinheit der DNA bzw. RNA abzuschätzen, kann man die Absorption der DNA- bzw. RNA-haltigen bei 260 bzw. 280 nm messen. Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum für DNA/RNA, bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} lässt sich somit auch ein Rückschluss auf die Reinheit der DNA/RNA ziehen. Werte unter 1,8 zeigen an, dass die Probe zu viele Proteine enthält, Werte über 2,0 weisen erfahrungsgemäß darauf hin, dass die Probe wahrscheinlich viel RNA bzw. DNA als Verunreinigung enthält. Über den Extinktionskoeffizienten für DNA bzw. RNA in wässriger Lösung lässt sich über das Lambert-Beer-Gesetz die Konzentration der DNA/RNA ermitteln.

Eine weitere Möglichkeit, Reinheit und Menge abzuschätzen, ist die Analyse nach elektrophoretischer Trennung im Gel. Der Auftrag bekannter DNA-Mengen als Standard ermöglicht die Quantifizierung der Probe. RNA und genomische DNA können im Agarosegel gut zugeordnet werden. Vektor-DNA wurde im Eppendorf-Photometer in unterschiedlichen Verdünnungen in Wasser vermessen.

Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Elektrophoresen wurden zur Größenbestimmung nach Plasmidisolierung und PCR-Fragmentlängen-Bestimmung benutzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines linearen DNA-Nukleinsäurefragmentes ist umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes. Die DNA kann nach der Elektrophorese mittels Interkalation von Ethidiumbromid unter ultraviolettem Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich mit Standard-Größenmarkern kann die Größe bestimmt werden.

Die Auftrennung erfolgte hauptsächlich in 1%igen Agarosegelen. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA) durch Kochen gelöst und nach Abkühlen auf 50°C in entsprechende Gelschlitzen gegossen. Nach Erstarren der Agarose wurde das Gel in die mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt, in die Taschen gefüllt und bei 75 V bis zur gewünschten Laufstrecke aufgetrennt. Nach 10-minütiger Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) konnte die DNA unter ultraviolettem Licht (366 nm) visualisiert und fotografiert werden.

Lösungen für Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

<i>TAE-Puffer:</i>	0,04	M	Tris-HCl, pH 8,5
	0,1	%	Essigsäure
	2	mM	EDTA
<i>Agarosegele:</i>	1	%	Agarose in TAE-Puffer
<i>5x Probenpuffer:</i>	60	%	Glycerin
	60	mM	EDTA
	0,025	%	Bromphenolblau (läuft bei ca. 300 Bp)
	0,025	%	Xylencyanol (läuft bei ca. 1.000 Bp)

RNA-Präparation

Präparation von Total-RNA mit RNeasy

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

Präparation mit Phenol / Chloroform

RNA Isolierung (gesamt-RNA) mit RNazol (Peqlab, Erlangen, Deutschland): Eine 6 cm Schale mit nach Wunsch behandelten Zellen wurde mit 1 ml RNazol abgeschabt, mit einer Pipette homogenisiert und 5 Minuten bei RT inkubiert (oder die Probe bei -80°C für einen späteren Gebrauch wegfrieren). 200 μ l Chloroform wurden dazugeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt, für 3-10 Minuten auf Eis inkubiert und bei 4°C , 13.000 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführt, 1 Volumen Isopropanol dazugegeben, 5-10 Minuten auf Eis inkubiert und bei 4°C bei 13.000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde 2 x mit 70% EtOH gewaschen (vortexen, bei 4°C , 13.000 rpm 10 Minuten zentrifugieren), kurz an der Luft getrocknet und in 30-100 μ l ddH₂O gelöst. Die erhaltene RNA kann für alle gängigen Methoden wie z.B. RT-PCR oder Northern-Blot-Analyse verwendet werden.

cDNA-Synthese, Reverse-Transkriptase-Reaktion

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

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die exponentielle Amplifikation definierter DNA-Fragmente (bis zu 20.000 Basen lang) in vitro. Dazu benötigt man Oligonukleotide (Primer), welche die zu amplifizierende Sequenz 5' und 3' flankieren. Der 5' gelegene Primer muss in sense-Orientierung vorliegen, der 3' gelegene in Antisense-Orientierung, d.h. revers komplementär zu der kodierenden Sequenz. Die Primer sollten 18-22 Basen lang sein und einen GC-Anteil von ca. 50% und unter 60% aufweisen. Die Primerpaare sollten in ihren Schmelztemperaturen möglichst nicht stark voneinander abweichen. Die DNA wird zunächst denaturiert (94°C), dann wird die Temperatur gesenkt und die Primer können ihre Bindungsstellen finden (*annealing temperature*). Im nächsten Schritt verwendet die DNA-Polymerase bei ihrer

optimalen Arbeitstemperatur (*elongation temperature*) die 3'-Hydroxyl-Enden der Primer, um an ihnen in 5'-3'-Richtung Nukleotide entsprechend der Paarung mit dem Matrizenstrang, anzuhängen. So verdoppelt sich theoretisch in jedem Zyklus die Anzahl der doppelsträngigen DNA. Nach n Zyklen erhält man so maximal 2^n Moleküle des amplifizierten DNA-Abschnitts.

Die *Pfu*-Polymerase katalysiert den Einbau von Nukleotiden in doppelsträngige DNA in der 5'-3'-Richtung in der Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen bei 70-80°C, außerdem besitzt sie 3'-5'-Exonuclease-Aktivität (*proofreading*), jedoch keine detektierbare 5'-3'-Exonuclease-Aktivität. Diese Polymerase hat gegenüber der sonst gebräuchlichen Taq-DNA-Polymerase den Vorteil, dass sie eine um ca. eine Zehnerpotenz geringere Fehlerrate aufweist. Die mit der Pfu-DNA-Polymerase erzeugten PCR-Produkte besitzen glatte Enden.

Standardmäßig wurden für einen 50 µl Reaktionsansatz 1,25 U der Pfu-DNA-Polymerase, 10-100 ng der Ausgangs-DNA (cDNA/copy DNA oder Plasmid-DNA), je 15 pmol der Primer (0,3 µM), 0,2 mM dNTP-Mix sowie der 10x PCR-Puffer und steriles H₂O bidest. eingesetzt. Die PCR fand im Robo-Cycler Gradient 96 von Stratagene statt. Nach 3-minütiger Denaturierung bei 94°C wurden 25-30 Zyklen folgender Art durchgeführt: 94°C für 15 sec, 60°C (bzw. Werte, die ca. 5°C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer liegen) für 30 sec, 72°C für 2 min Anschließend wurde nochmals bei 72°C für 10 min inkubiert, um der DNA-Polymerase zu erlauben, die begonnene Synthese zu beenden und so eine möglichst große Einheitlichkeit der PCR-Produkte zu erreichen.

Lösungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion

<i>10x PCR-Puffer:</i>	200 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	100 mM	KCl
	1 %	Triton X-100
	1 mg/ml	BSA
	20 mM	MgSO ₄

Primer

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

alle Primer: AG Lucka, FU-Berlin

Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in LB-Vollmedium, dem nach Bedarf Ampicilin zugesetzt wurde. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach dem integrierten Resistenzgen. Die

Kulturen wurden bei 37°C auf Festmedium (1,5% Agar in LB) oder in Schüttelkulturen bei 220 rpm und 37°C inkubiert. Ausgangsmaterial zum sterilen Beimpfen von Kulturen waren Einzelkolonien von einer Kulturplatte. Die Langzeitlagerung von *E. coli* erfolgte nach in LB-Medium + 20% Glycerin bei -80°C.

Lösungen für die *E. coli* Kultivierung:

<u>LB-Medium</u> :	10 g	Peptone
	5 g	Yeast Extract
	10 g	NaCl, ad 1l

Plasmid-Schnell-Präparation

Von einer *E. coli* Übernacht-Kultur wurden 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Minilysatlösung I resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Das in dieser Lösung enthaltene Lysozym verdaut die bakterielle Zellwand, das EDTA entzieht den Membranproteinen zur Stabilisierung notwendige 2-wertige Kationen. Anschließend wurden 200 µl Minilysatlösung II vorsichtig zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Diese stark alkalische Lösung lysiert die Zellen und denaturiert die DNA. Wichtig ist eine langsame Zugabe der Lösung, da die genomische DNA in Bruchstücke zerfallen kann. Nach Zugabe von 150 µl der neutralisierenden Minilysatlösung III folgt eine 30 min Inkubation unter Kühlung im Eisbad. Durch die hohe Salzkonzentration dieser Lösung werden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt, während die Plasmid-DNA gelöst bleibt. Eine anschließende 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert die zellulären Proteine und die chromosomale DNA. Aus dem Plasmid-haltigen Überstand, der in ein neues Eppendorfgefäß dekantiert wurde, konnte durch 2-Propanol-Fällung die DNA gewonnen werden. Die trockene Plasmid-DNA wurde in 30 µl aqua bidest. gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug ca. 1-5 µg DNA/ml Bakterienkultur.

Lösungen für die Schnellpräparation:

<i>Minilysatlösung 1:</i>	0,025 M	Tris/HCl, pH8,0
	0,050 M	Glucose
	0,01 M	EDTA
	2,0 g/l	Lysozym
<i>Minilysatlösung 2:</i>	0,2 M	NaOH
	1 %	SDS
<i>Minilysatlösung 3:</i>	3,0 M	Natriumacetat, pH 4,8

Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Herstellung von kompetenten Bakterien müssen die Bakterien mit CaCl₂ behandelt werden. 100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml LB-Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln (220 rpm) bei 37°C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,2 herangezogen. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 6000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment in 20 ml eiskaltem 100 mM

CaCl₂ resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in 500 µl kaltem CaCl₂ resuspendiert. Nun konnten die Zellen sofort zur Transformation eingesetzt werden oder mit 20% (v/v) Glycerin versetzt bei -80°C gelagert werden.

CaCl₂-Lösung: 50 mM CaCl₂ in Wasser

Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Kompetente Zellen können durch einen kurzen Hitzeschock DNA aufnehmen. 100 µl kompetente Zellen werden in einem gekühlten Reaktionsgefäß mit 10-100 ng DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Für 45 s wird die Reaktionsmischung auf 42°C erhitzt und anschließend für 2 min wieder eisgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium werden die *E.coli*-Zellen für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einer SOB-Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Nur Transformanden können über Nacht in Anwesenheit von entsprechendem Selektionsantibiotikum hochwachsen.

*"Wenn du etwas so machst,
wie du es seit zehn Jahren gemacht hast,
dann sind die Chancen groß,
dass du es falsch machst."*

CHARLES KETTERING