

2.1.4 Enzyme

Die benutzten Restriktionsenzyme sowie T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotid-Kinase, Vent-DNA-Polymerase, Alkalische Phosphatase (Shrimp Intestinal Phosphatase), RNase A, RNase T1, Trypsin, Endoproteinase Glu-C, Pepsin, Endoproteinase-Lys-C, wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, New England Biolabs, ICN Biochemicals und Worthington bezogen. Es wurde mit den jeweils von der Firma empfohlenen Reaktionspuffern gearbeitet.

2.1.5 Synthetisierte Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden bei den Firmen Gibco-BRL (Eggenstein), Top Lab (Martinsried) und Oligonukleotid Synthesegruppe des Max-Planck-Instituts (Martinsried) synthetisiert.

2.1.6 Verwendete Kits

Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen wurde das QiaGEN Plasmid-Kit der Firma Qiagen verwendet.

Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA aus Agarose-Gelen wurde das QiaEX Extraktions-Kit der Firma Qiagen verwendet.

Radioaktive Markierung

Für die radioaktive Markierung der DNA kam das Random Prim IT-II Labeling-Kit der Firma Stratagene zum Einsatz.

DNA-Sequenzierung

Die Durchführung der DNA-Sequenzierung geschah nach der Sanger-Abbruchmethode mit fluoreszenz-markierten Dideoxy-Nukleotiden der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA): PRISM Ready Reaction Dye Deoxy Terminator Mix for Cycle-Sequencing.

Molekulargewichtsstandards

1Kb DNA Ladder	GiboBRL
Broadrange Marker	BioRad
Prestain Marker	BioRad
LMW Marker	Pharmacia

2.1.7 Gewebeextrakte, Proteine und Antikörper

Heparin-BSA und Sulfatide wurden von der Firma Sigma bezogen. α -Dystroglycan wurde von Dr. Brancaccio, monoklonale Antikörper von Dr. Sorokin zur Verfügung gestellt. Für Bindungsstudien verwendete native E3-Fragment, rekombinantes α 2LG4-Fragment, Gewebeextrakte, Zellkulturüberstände und das polyklonale Antiserum 992 wurden in der Abteilung Timpl hergestellt.

α 2LG4-Fragment	Talts <i>et al.</i> (1998)
α -Dystroglycan	Brancaccio <i>et al.</i> (1995), Gesemann <i>et al.</i> (1998)
Antiserum 992	Ott <i>et al.</i> (1982)
Monoklonale Antikörper	Sorokin <i>et al.</i> (1992)
Gewebeextrakte	Sasaki <i>et al.</i> (1996)
sekundärer Antikörper	GAR-HRP-Antikörper (BioRad) <i>goat anti rabbit</i> IgG mit Meerrettichperoxidase konjugiert

2.1.8 Chemikalien

Sämtliche gängigen Chemikalien wurden, sofern nicht gesondert angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München) und Serva (Heidelberg) bezogen. Die Bezugsquellen anderer verwendeter Chemikalien werden an entsprechender Stelle in der Methodenbeschreibung angegeben.

2.1.9 Radiochemikalien

Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Buchler, Braunschweig bezogen

$[\alpha^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$	3000 Ci/mM
$[\text{}^{125}\text{I}]\text{-dCTP}$	100 mCi/mol

2.1.10 Lösungen und Puffer

Transformations-Puffer I (TFBI)

30 mM	Kaliumacetat
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin
pH 5,8	

Transformations-Puffer II (TFBII)

10 mM	MOPS/NaOH, pH 7,0
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbC
15 % (v/v)	Glycerin

TBE-Laufpuffer

100 mM	Tris/HCl, pH 8,3
43 mM	Borsäure
2 mM	EDTA

TE-Puffer

10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
0,5 mM	EDTA

DNA-Auftragspuffer:

0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF
40 % (w/v)	Sucrose
in 5 x TBE	

PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄
PBS wurde autoklaviert, EDTA und Trypsin sterilfiltriert	

SDS-PAGE-Puffer

25 mM	Tris
190 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

5 x SDS-Probenpuffer

65 mM	Tris/HCl, pH 6,8
10 % (v/v)	Glycin
2,3 % (w/v)	SDS
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau
(5 % (v/v) β -Mercaptoethanol)	

Coomassie-Lösung

0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
50 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Eisessig
in H ₂ O	

SDS-Entfärber

10 % (v/v)	Ethanol
7 % (v/v)	Eisessig
in H ₂ O	

TBS

50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
100 mM	NaCl
(1 mM	CaCl ₂)
(1 mM	MgCl ₂)

DNA-Färbelösung

Ethidiumbromid: 10 % (w/v) in H₂O

TBS/Tween

0,04 % (v/v)	Tween 20
in TBS	

PET

50 ml	PBS
5 ml	EDTA (Biochrom KG)
10 ml	Trypsin

2 x BBS

50 mM	PBS
280 mM	NaCl
1,5 mM	Na ₂ HPO ₄

Trypsin-Lösung

0,1 % Trypsin in PBS (0,02 % EDTA)

10x MOPS

0,2 M	3-(N-Morpholino-Propansulfonsäure), pH 7,0
0,5 M	Natriumacetat
10 mM	Na ₂ EDTA

RNA-Auftragspuffer

400 µl	Formamid
200 µl	Formaldehyd, 37 %
80 µl	10 x MOPS
80 µl	Bromphenolblau

Hybridisierungslösung

50 %	Formamid
0,5 %	SDS
5 x	Denhardt's
6 x	SSC

Formamid

5 g AG 501 x 8 (Biorad) in 100 ml Formamid

20x SSC

3 M	NaCl
0,3 M	Na ₃ citrat
pH 7,0	

100 x Denhardt's Lösung

2,0 % (w/v)	BSA
2,0 % (w/v)	Ficoll
2,0 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon

2.1.11 NährmedienLB-Medium

1 % (w/v)	Trypton (Difco)
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt (Difco)
0,5 % (w/v)	NaCl
0,01 % (v/v)	10 M NaOH

SOC-Regenerationsmedium

2 % (w/v)	Trypton (Difco)
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt (Difco)
10 mM	NaCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
2,5 mM	KCl

autoklaviert, anschließend 98 ml Medium mit 2 ml 2 %iger Glucoselösung (sterilfiltriert) komplettiert.

DMEM/F12 Nährmedium

500 ml	DMEM/F12 (Gibco)
10 %(v/v)	FKS (Gibco)
2 mM	L-Glutamin (Glutamax TM I, Gibco)
100 µg/ml	Streptomycin (Biochrom KG)
100 U/ml	Penicillin (Biochrom KG)
350 µg/ml	G418 (nur für 293-EBNA)

Serumfreies Medium

500 ml	DMEM/F12 (Gibco)
2 mM	L-Glutamin (Glutamax TM I, Gibco)
100 µg/ml	Streptomycin (Biochrom KG)
100 U/ml	Penicillin (Biochrom KG)

Transfektionsmedium

90 % (v/v)	DMEM/Eagle (Serva)
10 % (v/v)	FKS (Gibco)
2 mM	L-Glutamin (Glutamax TM I, Gibco)
110 µg/ml	Streptomycin (Biochrom KG)
110 U/ml	Penicillin (Biochrom KG)

Einfrriermedium

80 %	DMEM/F12 Nährmedium
10 % (v/v)	FKS (Gibco)
10 % (v/v)	DMSO

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterien

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Sofern nicht abweichend angegeben, wurden *E.coli* Bakterienzellen (XL1blue2/DH5α) in unterschiedlichen Volumina LB-Medium ÜN mit 150 U/min bei 37 °C inkubiert. Als Anzuchtgefäße dienten sterile 15 ml-Zentrifugenröhrchen oder 500 ml-Erlenmeyerkolben mit Rührschikanen. *E.coli* kann außerdem auf Festmedium bei 37 °C ÜN inkubiert werden.

2.2.1.2 Messung der optischen Dichte

Das Wachstum von Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte mit einem Photometer bei 600 nm verfolgt. Als Referenz diente dabei das unbeimpfte Medium. Ein OD_{600} von 1 entspricht ca. 2×10^8 Bakterien/ml.

2.2.1.3 Aufbewahrung von Bakterien

Mikroorganismen lassen sich für etwa 6 Wochen in Form von Plattenkulturen bei 4 °C aufbewahren. Für eine längere Lagerung wurden Glycerin-Kulturen angelegt. 0,5 ml der stationären Kultur wurden mit der gleichen Menge an sterilem Glycerin, 87 % (w/v), versetzt und bei - 80 °C gelagert.

2.2.2 DNA-Isolierung

2.2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA mit dem Qiagen Kit

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Mini-, Midi- bzw. Maxi-Plasmid-Kit der Firma Qiagen nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll unter Verwendung der angegebenen Puffer.

2.2.2.2 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA aus TBE Agarose-Gelen wurde das Qiaex Gel-Extraktions-Kit (Qiagen) benutzt. Dazu eigneten sich 1-2 % Agarose-Gele. Bei Verwendung von 320 nm UV-Licht wurden die entsprechenden DNA-Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die nachfolgenden Schritte erfolgten nach dem Protokoll der Hersteller.

2.2.3 DNA-Techniken

2.2.3.1 Reinigung und Konzentrierung von DNA

Um die DNA von Verunreinigungen mit Proteinen zu befreien, wurde sie phenolisiert und anschließend gefällt. Dazu wurde die Probe einmal mit Phenol/Chloroform (1:1, mit 10 mM Tris, 1 mM EDTA gesättigt) versetzt, gevortext und anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min, 15.000 rpm, RT).

Die obere, wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein weiteres mal mit Phenol/Chloroform und zweimal mit Chloroform extrahiert, mit 1/10 Volumen 4 M LiCl versetzt und die DNA durch Zugabe des 2 fachen Volumens 100 % Ethanol (-20 °C) und 30 minütiger Kühlung bei -20 °C gefällt. Die DNA wurde anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min, 15.000 rpm, 4 °C), das Pellet gewaschen (70 % Ethanol) und in der Speed-Vac (Bachofer) getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in sterilem TE resuspendiert und im Kühlschrank gelagert.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mit einem Beckman-Photometer, indem die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O als Referenzwert gemessen wurde. Eine Extinktion von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA. Der Quotient der Extinktion bei 260 nm und 280 nm gibt die Reinheit der DNA an; je näher dieser Wert bei 2 liegt, desto reiner ist die DNA-Probe.

2.2.3.3 DNA-Restriktion

Die Spaltung von isolierter Vektor-DNA zur Kontrolle von Transformanden wurde im, dem Restriktionsenzym entsprechenden Puffer der Herstellerfirma durchgeführt. In einem Reaktionsvolumen von 12 µl wurden ca. 500 ng DNA, 1/10 Volumen 10xRestriktionspuffer, 0,5 Units Enzym sowie Wasser ad 12 µl eingesetzt. Präperative Spaltungen zur anschließenden Isolierung der gewünschten DNA-Bande wurden mit 10-20 µg DNA durchgeführt.

2.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung linearer DNA-Fragmente wurde durch Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Diese Methode ermöglicht DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge zu fraktionieren und mit Hilfe von einem Standard (*Marker*) ihre Größe zu bestimmen. Die Agarose-Gele wurden je nach erforderlichem Trennbereich zwischen 0,5-2,0 % Agarose (w/v) im Laufpuffer (TBE-Puffer) hergestellt und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen.

Nach Erkalten wurden die DNA-Proben zusammen in Auftragspuffer in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert und die Gelelektrophorese bei einer Spannung zwischen 5 und 10 V/cm durchgeführt. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 0,001 % (v/v) Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml). Anschließend wurden die Gele bei 280 oder 354 nm auf einem Transilluminator analysiert.

2.2.4 Klonierung

2.2.4.1 Dephosphorylierung geschnittener DNA

Damit die kohäsiven Enden des linearisierten Plasmids, die durch die Restriktion erzeugt wurden nicht religieren ohne dabei ein Insert aufzunehmen, wurden sie mit Hilfe von alkalischer Phosphatase (Boehringer) dephosphoryliert. Nach Durchführung der Restriktion wurden 0,2 U alkalische Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase SA, 1 U/ μ l) pro μ g geschnittenem Vektor gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 20 minütige Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65 °C.

2.2.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

T4-DNA-Ligase wurde zur kovalenten Verknüpfung der DNA-Moleküle verwendet. Günstige Reaktionsbedingungen sind ein kleines Reaktionsvolumen und hohe DNA-Konzentration (Plasmid/Insert Verhältnis 1:10 bis 1:50). DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.2.4.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

100 ml steriles LB-Medium (mit 20 mM $MgSO_4$, 10 mM KCl) wurde mit 100 μ l Übernachtskultur eines *E.coli*-Stammes angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37 °C und 225 rpm inkubiert. Das Anzuchtgefäß wurde für 10 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (10 min, 4000 xg, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 150 ml TFB I vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert, in 6 ml TFB II aufgenommen. Es folgte eine Aliquotierung zu je 100 μ l und Schockgefrierung mit flüssigem Stickstoff. Die Zellen konnten bei -80 °C gelagert werden.

2.4.4.4 Transformation durch "Hitzeschock"

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut und die Ligationsansätze dazu pipettiert. Die Mischung wurde eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Der "Hitzeschock" erfolgte für 45 s bei 42 °C und ermöglichte die Inkorporierung des Plasmids/Konstrukts. Anschließend stellte man die Proben für 2 min auf Eis und fügte 900 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) hinzu. Der ganze Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Verschiedene Mengen dieses Ansatzes wurden auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 Radioaktive Markierung von DNA-Proben

Die Markierung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten (20-30 ng) erfolgte mit dem Random primed labeling kit der Firma Stratagene nach dem Herstellerprotokoll.

2.2.6 Präparative Reinigung von RNA

Das Arbeiten mit RNA setzt voraus, daß man RNA'se frei arbeitet. Alle verwendeten Geräte, Pipetten, Reaktionsgefäße und Lösungen wurden autoklaviert. Durch tragen von Handschuhen wurde eine Kontamination der Lösungen und Reaktionsansätze mit an den Händen vorhandenen RNAsen verhindert. Die Elektrophoresekammer wurde vor der Benutzung mit 0,02 M NaOH für 1 h behandelt.

2.2.6.1 Präparation von RNA aus Zellen

Die Isolierung von Total-RNA aus eukaryotischen Zellen für die Analyse durch Northern-Blotting erfolgte mit den Trizol Reagenz der Firma Gibco/BRL entsprechend vom Hersteller angegebenen Standardprotokoll.

2.2.6.2 Nachweis von mRNA durch Northern-Blotting

Der Northern-Blot dient dem Nachweis von mRNA durch ein radioaktiv markiertes einzelsträngiges DNA-Fragment als Sonde. Die RNA wurde auf einem denaturierenden 1 % igen Agarose-Gel (6,3 % Formaldehyd) in MOPS-Puffer aufgetrennt.

Der Transfer der RNA aus dem Gel auf die Membran (Hybond N, Amersham) erfolgte in einer Unterdruckkammer (Vakublot-Kammer) mit 20 x SSC für 2 h bei einem Unterdruck von 20 cm Wassersäule. Das Quervernetzen der RNA auf der Membran erfolgte durch UV-Strahlung bei 312 nm mit 1,5 J/cm² (im UV-Stratalinker 1800, Firma Stratagene). Die anschließenden Inkubationsschritte wurden unter Schütteln der Membran bei 42 °C durchgeführt. Nach der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran in Hybridisierungspuffer (0,1 ml/cm² Membran) mit Heringssperm-DNA (100 µg/ml), erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten DNA-Probe für 12 h. Von der Sonde wurden 1-10x10⁶ cpm/ml Hybridisierungspuffer eingesetzt. Unspezifisch gebundene Radioaktivität wurde durch Inkubation der Membran in 2 x SSC/0,1 % SDS-Puffer für je 15 min bei Raumtemperatur und 42 °C entfernt. Ein weiterer Waschschrift erfolgte in 0,1 % SSC/0,1 % SDS-Puffer. Die Exposition des Röntgenfilms (X-Omat XAR5, Kodak) fand bei -70 °C.

2.2.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von dsDNA erfolgte durch Cycle Sequencing mit Ampli Taq DNA Polymerase FS nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger *et al.* (1977). Verwendet wurde der ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll.

Sequenzierprimer:

Polylinkerregion von pBluescript SKII

T7 (downstream)	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	22-mer
T3 (upstream)	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	20-mer

Polylinkerregion von prC/CMV

SeqU (upstream)	5'-TAGTGAACCGTCAGATCT-3'	18-mer
Rev1 (downstream)	5'-ATGCAATTGTTGTTGTTAAC-3'	20-mer
Rev2 (downstream)	5'-CTGGATCCGGCCTTGC-3'	16-mer
GK43 (upstream)	5'-ACTGAGGGTTCCCAGCA-3'	17-mer

Polylinkerregion von pCEP-Pu:

SeqU (upstream)	5'-TAGTGAACCGTCAGATCT-3'	18-mer
BMS (upstream)	5'-GATCTTCTTTCTCCTTTGC-3'	19-mer
Rev1 (downstream)	5'-ATGCAATTGTTGTTGTTAAC-3'	20-mer
Rev2 (downstream)	5'-CTGGATCCGGCCTTGC-3'	16-mer

Laminin cDNA:

Upstream-Primer:

Hin1	5'-GATGTCCGGAAGAGGCTCC-3'	20-mer
Hin2	5'-CTGTACCTCGGAGGC-3'	15-mer
Hin3	5'-GCCATTGGCCTAGAG-3'	15-mer
Hin4	5'-ACACCAACGATCCCAT-3'	16-mer

Ferner wurden Primer 1 (upstream) und Primer 3 (downstream) (siehe Abschnitt 2.2.8.1) verwendet.

2.2.8 PCR-Techniken**2.2.8.1 Amplifikation von DNA mit Hilfe der PCR**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR: *polymerase chain reaction*) wird dazu verwendet, einen bestimmten Abschnitt der DNA zu vervielfältigen. Bei dieser Methode ist es möglich, beliebige DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren und Wirtszellen zu amplifizieren. Dazu wurden Primer benutzt, die zu einem bestimmten Abschnitt auf dem Laminin-DNA komplementär sind.

Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

1 µl	Template-DNA (100 ng) als Matrize
10 µl	10xDNA-Thermopol-Puffer
4 µl	dNTPs (2,5 mM von jedem Nukleotid)
2 µl	(100 pmol) Primer1
2 µl	(100 pmol) Primer2
80 µl	H ₂ O bidest
1 µl	(5 U/µl) Vent-Polymerase

Die Amplifikation wurde in 25 Zyklen a 5 Schritten durchgeführt:

96 °C	1 min	initiales Denaturieren der dsDNA
94 °C	30 s	zyklisches Denaturieren
55 °C	1 min	Hybridisierung der Primer
72 °C	2 min	zyklische Elongation
72 °C	10 min	terminale Elongation

Verwendete Primer:

1	5'-GCCCCGCTAGCTCTGCACAGAGAACACGGGG-3'	31-mer
2	5'-GCCCCGCTAGCTGATGTCCGGAAGAGGCTCC-3'	31-mer
3	5'-TCAGTTGCGGCCGCTTAGGGCTCAGGCCCGGG-3'	34-mer
4	5'-GCCCCGCTAGCTAAAGACAGGCCCTTGTCTG-3'	30-mer
6	5'-TCAGTTGCGGCCGCTTAGCCATTAACCATGATTTCCCC-3'	37-mer
7	5'-TCAGTTGCGGCCGCTTAATAGCACCTGTCCACAGC-3'	34-mer

2.2.8.2 Die Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR kommt zur Anwendung, um positions-spezifische Mutationen in doppelsträngige DNA einzuführen. Die Mutationen, die durch die benutzten Primer eingeführt werden, dienen dazu, ein Codon so zu ändern, daß es zur Änderung der Aminosäure auf Proteinebene führt. Die Fusions-PCR wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet, um die gewünschten α 1LG4-Mutanten zu generieren. Bei dieser Methode (Abb.6) wurde die Alanin-Mutation in den Primer **c** eingeführt und lag in der Mitte des aus ca. 15 bis 27 Nukleotiden bestehenden Oligonukleotids. Gleichzeitig wurde ein Primer **b** für den Gegenstrang synthetisiert, der sich exakt über denselben DNA-Bereich erstreckte und ebenfalls die gewünschte Mutation enthielt. Beide Primer wurden getrennt für die PCR eingesetzt (PCR#1, PCR#2), wobei die Original-Sequenz (α 1LG4-Fragment) als Template diente. Anschließend wurden beide Fragmente, die die gewünschte Mutation enthielten in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt, und zunächst 25 Zyklen der PCR ohne Primer durchgeführt (PCR#3). Hierbei konnten die Stränge der Fragmente **AB** und **CD** in ihrem komplementären Bereich hybridisieren und die Polymerase anschließend in 3'-Richtung auf beiden Strängen elongieren. Auf diese Weise entstand aus den beiden Subfragmenten das Fusionsprodukt (Mutante **AD**). Nach diesen Zyklen wurden die beiden äußeren Primer des Fusionsproduktes in den Reaktionsansatz gegeben und das Fusionsfragment präparativ amplifiziert(PCR#4).

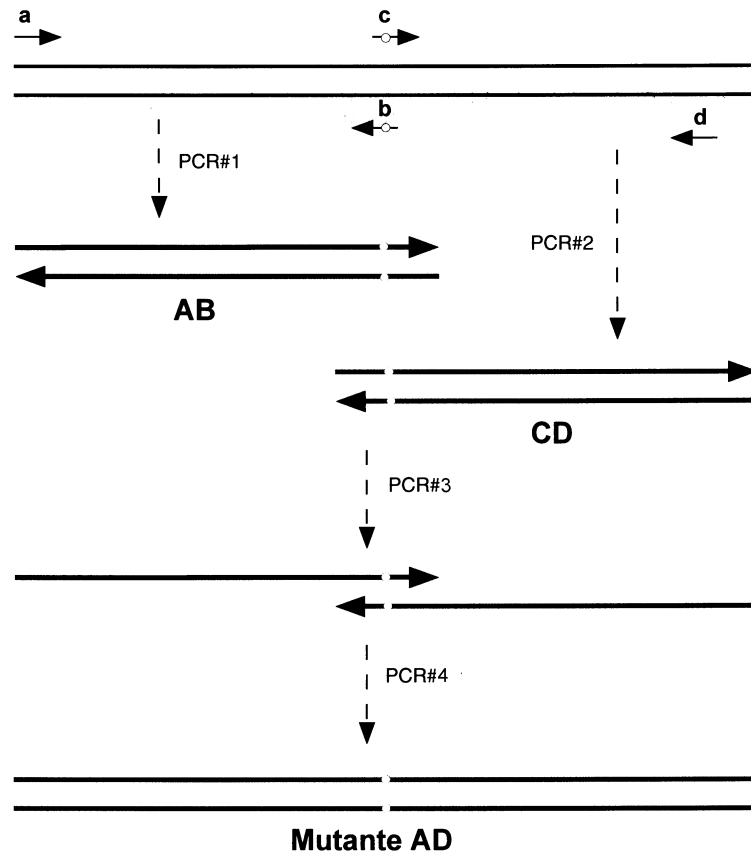


Abb.6: Schematische Darstellung zur Einführung einer Punktmutation in cDNA durch Fusions-PCR.

PCR#1,2,4

96 °C	1 min	initiales Denaturieren der dsDNA
96 °C	1 min	zyklisches Denaturieren
60 °C	1 min	Hybridisierung der Primer
75 °C	1 min	zyklische Elongation
75 °C	10 min	terminale Elongation

PCR#3

96 °C	3 min	initiales Denaturieren der dsDNA (AB, CD)
37 °C	5 min	Hybridisierung
75 °C	5 min	zyklische Elongation

Verwendete Primer für die Mutanten:

K1-Hin	5'-GAATACATTGCAGCGGGCGGCGTTCATG-3'	27 mer
K1-Rev	5'-CATGAACGCCGCCGCTGCAATGTATTC-3'	27 mer
K1/1-Hin	5'-GAATACATTGCAAGGAAGGCGTTCATG-3'	27 mer
K1/1-Rev	5'-CATGAACGCCTTCCTTGCAATGTATTC-3'	27 mer
K1/2-Hin	5'-GAATACATTAAAGCGAAGGCGTTCATG-3'	27 mer
K1/2-Rev	5'-CATGAACGCCTTCGCTTTAATGTATTC-3'	27 mer
K1/3-Hin	5'-GAATACATTAAAAGGGCGGCGTTCATG-3'	27 mer
K1/3-Rev	5'-CATGAACGCCGCCCTTTAATGTATTC-3'	27 mer

Y1-Hin	5'-CAAGACAGAAGCCATTA AAAAGG-3'	22 mer
Y1-Rev	5'-CCTTTTAATGGCTTCTGTCTTG-3'	22 mer
K2-Hin	5'-GATGTGGAAGCGGCACTGTACCTC-3'	24 mer
K2-Rev	5'-GAGGTACAGTGCCGCTTCCACATC-3'	24 mer
Y2-Hin	5'-AGGAAACTGGCCCTCGGAGGC-3'	21 mer
Y2-Rev	5'-GCCTCCGAGGGCCAGTTTCCT-3'	21 mer
Y3-Hin	5'-CCAGCCACGCCAGGGCCAGG-3'	21 mer
Y3-Rev	5'-CCTGGCCCTGGCGTGGCTGGG-3'	21 mer
R1-Hin	5'-AGCCACTACGCCGCCGCGAACATCG-3'	25 mer
R1-Rev	5'-CGATGTTCGCGGCGGCGTAGTGGCT-3'	25 mer
R2-Hin	5'-GCTGTGGACGCGTGC-3'	15 mer
R2-Rev	5'-GCACGCGTCCACAGC-3'	15 mer
K3-Hin	5'-CTCGGCGCGGGCGCGACCGCGGTCTCC-3'	27 mer
K3-Rev	5'-GGAGACCGCGGTCGCGCCCGCGCCGAG-3'	27 mer
K4-Hin	5'-CAGCTGGATGCAGACGCGCCCTTGTCT-3'	27 mer
K4-Rev	5'-AGACAAGGGCGCGTCTGCATCCAGCTG-3'	27 mer
K5-Hin	5'-AGTGATGGCGCGTGGCACACA-3'	21 mer
K5-Rev	5'-TGTGTGCCACGCGCCATCACT-3'	21 mer
K6-Hin	5'-CACACAGTCGCGACAGAATAC-3'	22 mer
K6-Rev	5'-GTATTCTGTGCGGACTGTGTG-3'	22 mer

Ferner wurden Primer 1 (upstream) und Primer 7 (downstream) (siehe Abschnitt 2.2.8.1) verwendet.

2.3 Zellkulturmethoden

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden strikt unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Gefäße, Pipetenspitzen und Lösungen wurden vor der Verwendung sterilisiert um Kontaminationen mit Bakterien, Hefe oder anderen Pilzen auszuschließen. Die Transfektion und Kultivierung der 293-EBNA Zellen erfolgte auf 10 cm-Petrischalen (Falcon), der 293-Zellen zusätzlich auf 96 bzw. 24 Well/Kulturschalen (Falcon) und 6 cm-Petrischalen (Falcon), zum Sammeln von konditioniertem Medium auf 175 cm²- bzw. 500 cm²- Gewebekulturflaschen (Nunc), bei 37 °C in einer 5 % CO₂-haltigen Atmosphäre. Als normales Nährmedium wurde DMEM/F12 Medium mit 10 % (v/v) FKS, Penicilin (100 U/ml), Streptomycin (100 U/ml) und 2 mM Glutamin verwendet. Die Selektion nicht transfizierter 293-EBNA Zellen auf ihr, im Genom integriertes, EBNA-Gen mit vorgeschaltener Neomycin-Kassette, wurde durch 350 µg/ml G418 (Neomycin) erreicht.

Die Selektion transfizierter Zellen erfolgte mit Puromycin (0,5 µg/ml). Das Sammeln konditionierten Mediums erfolgte unter Zugabe von DMEM/F12 Nährmedium mit den oben beschriebenen Zusätzen aber ohne FKS (serumfreies Medium). Die Medien wurden, alle 48 h gewechselt.

2.3.1 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion wurden ca. 10^6 293 bzw. 293-EBNA Zellen auf einer 100 mm Schale ausgesät und 4 h vor Zugabe des DNA-Präzipitationsansatzes in 8 ml Transfektionsmedium gesetzt.

Präzipitationsansatz: (Chen und Okayama, 1987)

30-60 µg	Plasmid-DNA
125 mM	CaCl ₂ ad 400 µl
H ₂ O	400 µl 2xBBS, pH 6,94
Vektor pSV2pac im Verhältnis 1:10 bis 1:20 nur bei 293 Zellen	

Durch Kotransfektion mit dem Plasmid pSV2pac wurde eine Selektion der 293 Zellen auf Puromycin-Resistenz ermöglicht. Häufig war die präzipitierte DNA in 293 als auch 293-EBNA Zellen in Form kleiner schwarzer Punkte unter dem Mikroskop erkennbar; ein Ausbleiben des Niederschlags war jedoch nicht unbedingt Zeichen einer falsch durchgeführten Transfektion. In manchen Fällen war der Niederschlag so fein, daß er unter dem Mikroskop nicht beobachtet werden konnte. 16-20 h nach der Transfektion wurde das Medium durch DMEM/F12 Nährmedium ausgetauscht. Nach weiteren 24 h erfolgte erneut ein Medienwechsel mit anschließender Zugabe von 0,5 µg/ml Puromycin um die Selektion zu beginnen. Nach 1-2 Wochen waren die Schalen dicht bewachsen (konfluent, entsprechend ca. 2×10^7 Zellen).

2.3.2 Sammeln konditionierten Mediums

Konfluent bewachsene Schalen oder Zellkulturflaschen wurden um die Verunreinigung des konditionierten Zellüberstandes mit Serumalbumin zu verringern zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 oder 30 ml serumfreiem Medium weiter kultiviert. Alle 48 h wurde der Zellüberstand abgenommen und 10 min. bei 230 x g zentrifugiert um tote Zellen und Zellfragmente abzutrennen. Das Medium wurde dann bis zur Aufarbeitung bei 4-20 °C gelagert. Zur Kontrolle der Produktion wurden die Proteine aus 1 ml des Zellüberstandes mit TCA präzipitiert und über SDS-PAGE getrennt.

2.3.3 Passagieren von Zellen

Um konfluente Schalen zu verdünnen und durch Selektion mit Puromycin heranwachsende Zellklone zu vereinzeln wurden die Zellen erst mit PBS-Puffer 2x gewaschen, dann mit 7 ml einer 0,01 % Trypsinlösung (PET) für 2-3 min inkubiert und anschließend abgesaugt. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen von der Schale abgelöst in 9 ml DMEM-Medium vorsichtig resuspendiert und auf mehrere Schalen oder Flaschen in entsprechenden Verdünnungen für weitere Kultivierung überführt.

2.3.4 Aufbewahrung von Zellen

Um transfizierte Zellen langfristig zu lagern wurde eine konfluente 10 ml-Schale durch Behandlung mit Trypsin (wie oben beschrieben) von der Plattenoberfläche gelöst und in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde dann in 1,8 ml Kryo-Röhrchen (Nunc) überführt und 24-48 h bei -80 °C in Isopropanol tiefgefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

2.3.5 Auftauen von Zellen

Um Zellen zu rekultivieren wurde ein eingefrorenes Zell-Aliquot bei Raumtemperatur langsam aufgetaut und in eine mit DMEM/F12-Nährmedium vorbereitete Schale überführt. Die Zugabe von G418 war ausschließlich bei den 293-EBNA Zellen notwendig. Nachdem sich die Zellen wieder regeneriert hatten, wurde ein Medienwechsel durchgeführt um eine Schädigung der Zellen durch DMSO auszuschließen.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen über SDS-PAGE folgte einer Standardmethode (Laemmli *et al.*, 1970). Zur Analyse der rekombinant hergestellten Proteine wurden 5-15 % bzw. 5-22 % Gradientengele der Größe 100 x 90 x 0,5 mm verwendet. Die Proteine wurden vor dem Gelauftrag mit 5x SDS-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Zur Reduktion von Disulfidbrückenbindungen wurde dem Probenpuffer DTT in einer Endkonzentration von 0,02 M zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 15-20 V/cm. Die Detektion der im Gel getrennten Proteine erfolgte entweder durch Anfärben mit Coomassie-Lösung (15 min) und anschließendem Entfärben des Gelhintergrundes mit Entfärber-Lösung oder durch Transferieren der Proteine auf eine PVDF-Membran mit anschließendem Immunnachweis. Als Standard diente der Broad Range Marker (Biorad) mit Standardproteinen der Molekulargewichte 200, 116, 97,4, 67, 45, 30, 20, 14, 6,5 kDa und LMW Marker (Pharmacia) mit Standardproteinen der Molekulargewichte 94, 67, 43, 30, 20, 14. Die angefärbten Gele wurden über Nacht mit dest. Wasser gewaschen, photographiert, in 20 % igem Glycerin gelagert und anschließend in einer Spannkammer getrocknet. Zur Ermittlung der apparenten Molekulargewichte von Proteinen wurde die empirisch gefundene Beziehung, daß die elektrophoretische Mobilität dem Logarithmus des Molekulargewichts proportional ist, herangezogen. Dazu wurde die Laufstrecke von Standardproteinen in der reduzierenden SDS-PAGE in cm bestimmt und gegen den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen. Aus der Laufstrecke eines Proteins mit unbekanntem Molekulargewicht läßt sich so sein apparentes Molekulargewicht direkt ablesen.

2.4.2 Heparinaffinitätschromatographie

Heparin-Separose

Die Zellüberstände (500 ml) der rekombinanten Fragmente α 1LG4-5 und α 1LG4, die durch Dialyse gegen Säulenpuffer vorbereitet wurden, über eine mit 0,05 M Tris/HCl pH 7,4 Heparin-Separose-Säule (CL-6B, Pharmacia, 2,6 x 7 cm) passagiert.

Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen NaCl Gradienten (0-0,6 M, 800 ml) eluiert. Die eluierten Fraktionen (10 ml Volumen) wurden durch SDS-Gelelektrophorese auf ihren Proteingehalt analysiert. Die gepoolten Fraktionen wurden gegen 0,2 M NH_4HCO_3 dialysiert und anschließend lyophilisiert.

1 ml, 5 ml Heparin-Säule

Je 3 mg lyophilisiertes Protein (natives E3-Fragment, $\alpha 1\text{LG4-5}$, $\alpha 1\text{LG4}$, $\alpha 1\text{LG4}$ -Mutanten) wurde in 0,05 M Tris/HCl pH 7,4 resuspendiert auf eine Heparin-Affinitätssäule (1 ml Hi-Trap Heparin-Säule, Pharmacia) aufgetragen und die gebundenen Proteine anschließend mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-0,6 M NaCl, 30 ml) eluiert. Das Chromatogramm wurde bei 226 nm spektralphotometrisch gemessen und mit einem XY-Schreiber aufgezeichnet. Der relative Proteingehalt der einzelnen Fraktionen konnte nach SDS-PAGE ermittelt werden. Entsprechende Fraktionen wurden wiederum vereinigt, dialysiert und anschließend lyophilisiert. Die Aufreinigung des $\alpha 1\text{LG4-5}$ -Fragments erfolgte auch über eine 5 ml Hi-Trap Heparinsäule.

2.4.3 FPLC-Gelfiltrationschromatographie

Für die weitere Aufreinigung des rekombinanten $\alpha 1\text{LG4-5}$ -Fragment wurde eine FPLC-Gelfiltration über eine Superose 12 Säule (HR 16/50, Pharmacia) benutzt. Das Protein wird hierbei ihrer Größe nach getrennt. Proteine mit höherem Molekulargewicht passieren die Säule schneller, als solche mit niedrigerem. Der Elutionsvorgang wurde durch Messung der Absorption bei 226 und 280 nm spektralphotometrisch detektiert und mit einem Schreiber als Funktion des Elutionsvolumens aufgezeichnet. Einzelne Fraktionen wurden im Anschluß über SDS-PAGE auf die enthaltenen Proteine hin analysiert und die das rekombinante Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt. Als Laufpuffer wurde 0,2 M Ammoniumacetat, pH 6,9 verwendet. Die Flußrate betrug dabei 0,5 ml/min, das Fraktionsvolumen belief sich auf 500 μl . Die Empfindlichkeit des Photometers wurde individuell eingestellt.

2.4.4 Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Säule

Die Reinigung des rekombinanten α 1LG5-Fragments erfolgte über eine in 0,05 M Tris/HCl (pH 8,6) equilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (Whatman DE 52; 2,0 x 20 cm). Das serumfreie Medium wurde nach Dialyse gegen den Chromatographiepuffer mit 4-5 ml/min auf die Säule aufgetragen und die gebundenen Proteine anschließend mit einem linearen NaCl-Gradienten (0-0,6 M NaCl, 800 ml) eluiert. Das Chromatogramm wurde bei 226 nm mit einer Empfindlichkeit von 0-0,5 spektralphotometrisch gemessen und mit einem XY-Schreiber aufgezeichnet.

2.4.5 Umkehrphasen-Chromatographie

Die für die weitere Analyse von proteolytisch erhaltenen Peptiden von der Heparin-Affinitätssäule wurden direkt auf eine mit Octadecyltrichlorsilan (C18) beschichtete Umkehrphasensäule (Hi-Pore, 250 x 4,6 mM, RP 318, BioRad) appliziert. Die Säule wurde in 0,1 % Trifluoressigsäure äquilibriert. Nachdem Probenauftrag wurde die Säule mit 0,1 % Trifluoressigsäure gewaschen. Die Elution erfolgte durch Anlegen eines linearen Gradienten von 20-60 % Elutionspuffer (70 % Acetonitril 1/0, 1 % Trifluoressigsäure) mit einer Steilheit von 1 % ml/min. Die Fraktionen wurden in 0,2-1,4 ml Aliquots gesammelt.

2.4.6 Konzentrierung von Proteinlösungen

Alle Proteine mit Ausnahme des α 1LG5-Fragments wurden nach der Reinigung für die Analysen, die eine bestimmte Konzentration in 0,2 M NH_4HCO_3 erforderten, gegen dieses dialysiert, lyophilisiert und in der gewünschten Konzentration resuspendiert. Die Aufkonzentrierung des α 1LG5-Fragments erfolgte nach Zugabe von 0,15 M NaCl durch Ultrazentrifugation (Pall Filtron, Omega, 62 mm).

2.4.6.1 Präzipitation von Protein(en) mit TCA zur Analyse durch SDS-PAGE

Das Protein(gemisch) wurde durch Zugabe von 0,15 Volumen 1 % Triton X-100 und 0,25 Volumen 55 % TCA für 20 min bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ präzipitiert anschließend 5 min bei 15000 xg in der Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen, getrocknet. Anschließend wurde die Probe in SDS-Laufpuffer aufgenommen und mit 5 x SDS-Auftragspuffer (Verhältnis 4:1) versetzt.

2.4.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte durch saure Hydrolyse von ca. 20-25 µg Protein mit 6 M HCl (16 h, 110 °C). Das Hydrolysat wurde über einen Biotronic LC 5001 Analysator aufgetrennt und so die absoluten molaren Mengen der Aminosäuren bestimmt.

2.4.8 N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau)

Die N-terminale Sequenzierung von Proteinen und damit ihre Identifikation, erfolgte durch Edman-Abbau in den Gasphasen-Sequenzierapparaten 470A und 473A (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers. Das Proteingemisch wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt durch elektrischen Transfer auf eine zuvor mit Methanol benetzte und in 50 mM Na₂B₄O₇ equilibrierte PVDF-Membran fixiert. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 1 mA/cm² in einer entsprechenden Blot-Apparatur. Die Proteine wurden durch Inkubation der Membran mit 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant-Blue R250 (BioRad) in 50 % Methanol gefärbt. Die Entfärbung der Membran erfolgte durch Waschen in einer Lösung aus 50 % Methanol und 10 % Eisessig. Reine Proteine wurden direkt auf eine Prospin Sample Cartridge (Applied Biosystems) aufgetragen.

2.4.9 Proteolytische Degradation

Die proteolytischen Degradationen wurden in einem Mengenverhältnis Protein zu Protease von 100:1 durchgeführt. Die Proteolysen mit Trypsin, Elastase und Endoproteinase Glu-C erfolgten bei 37 °C in 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,1 M NaCl und 2 mM CaCl₂ über einen Zeitraum von 1 h, 4 h und 24 h. Die Proteolyse mit Pepsin erfolgte in 0,1 M Essigsäure bei 25 °C für 2 h und 24 h. Die Analyse des Reaktionsansatzes erfolgte über SDS-PAGE unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen.

2.4.10 Chemische Seitenkettenmodifikationen

Die Modifizierung von Arginin-Seitenketten mit dem α-Diketterreagenz Phenylglyoxal (Takahashi, 1968), von Lysin-Seitenketten mit Acetanhydrid (Fraenkel-Conrat, 1957) und Tyrosin-Seitenketten mit Tetranitromethan (Sokolovsky *et al.*, 1966) wurden nach der jeweiligen Literatur beschriebenen Standardmethode durchgeführt.

Das rekombinante LG4(b)-Fragment wurde dafür für jede Modifikation in einer Konzentration von 500 µg/ml eingesetzt.

2.4.11 Erstellung von CD-Spektren

Die CD-Spektren wurden in einem Mark IV automatischem Spektralphotometer (ISA, Jobin Yvon, Division d'Instrument S.A.) in einer thermostatisierten Quarzküvette (Hellma) mit einer optischen Weglänge von 1 mm bei 25 °C aufgenommen. Die Proteine wurden zuvor in einer Konzentration von ca. 100 µg/ml gegen 0,02 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, dialysiert. Die genaue Proteinkonzentration wurde im Anschluß an die Messung durch Aminosäureanalyse ermittelt, um eine Umrechnung des Meßsignales in die Eliptizität pro Aminosäurerest vornehmen zu können. Durch die Analyse mit dem Contin-Programm (Provenchor und Glöckner, 1981) wurde der Gehalt an α -Helix, β -Faltblatt und sonstigen Strukturen der Proteine berechnet

2.4.12 Elektronenmikroskopie nach Kegelbedampfung

Die elektronenmikroskopische Darstellung der Proteine erfolgte durch Kegelbedampfung entsprechend einem in der Literatur angegebenen Standardprotokoll (Engel und Furthmayr, 1987). Die rekombinanten Proteine wurden dafür in einer Konzentration von 50 µg/ml in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat gelöst.

2.4.13 ¹²⁵I-Markierung

10 µg des rekombinanten α 1LG4-Fragments wurde mit 0,1 ml Chloramin T (1,67 mg/ml PBS) und 0,5 mCi Na-¹²⁵I inkubiert. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml Natriummetabisulfit (1,67 mg/ml H₂O) beendet. Das Volumen wurde mit PBS auf 2,5 ml aufgefüllt und die überschüssige Radioaktivität durch Dialyse gegen PBS/Tween 20 (0,04 %) entfernt.

2.4.14 Herstellung von polyklonalem Antiserum gegen α 1LG4

Die Produktion von Kaninchenantiserum folgte etablierten Methoden (Timpl, 1982).

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Immuno-Blotting (Western-Blotting)

Dem Nachweis von Proteinen mittels Bindung mit einem Antikörper liegt die Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde. Die erfolgreiche Erkennung des Antigens durch den primären Antikörper wird dabei durch ein Antikörper-Enzym-Konjugat (sekundärer Antikörper) verfolgt, welches gegen den ersten Antikörper gerichtet ist. Dieses Konjugat katalysiert eine Farbreaktion, die die Detektion der Proteinbanden ermöglicht. Dafür wurden die Proteine aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert, um diese spezifisch mit Antikörper nachzuweisen. Der Transfer erfolgte durch Elektroblob im vertikalen Puffertank mit Natriumborat-Puffer (10 mM, pH 9,2). Zuvor wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran mit 1 % BSA in TNT (Block-Puffer) 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (spezifisch) erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur (1:500-Verdünnung in Blockpuffer). Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % BSA in TNT (Waschpuffer) wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen wurde der Blot auf einem Whatman-Filterpapier kurz angetrocknet, mit 10 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl abgespült und in 15 ml Färbelösung (0,05 % 4-Chloro-1-naphthol, 17 % Methanol, 8,3 mM Tris/HCl, pH 7,5, 125 mM NaCl, 0,05 % Perhydrol) 15-30 min entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 15 ml Wasser gestoppt.

2.5.2 Radioimmunotest

Die Analyse der Proteine durch Radioimmuno-Inhibierung erfolgte nach einem Standardprotokoll (Timpl, 1982) mit einem Antiserum das gegen rekombinant exprimiertes α 1LG4-Fragment gerichtet war.

2.5.3 ELISA-Titration

Die Affinität einiger gegen das authentische E3-Fragment und das rekombinante LG4-Fragment gerichtete Antiseren bzw. monoklonale Antikörper zu den rekombinant hergestellten Proteinen wurde durch einen ELISA-Test bestimmt.

Das Antigen wurde in einer Konzentration von 5-10 µg/ml in 100 mM NaHCO₃ (Vollers-Puffer) gelöst und durch Inkubation bei 4 °C über Nacht auf einer ELISA-Mikrotiterplatte (50 µl/well, 250 ng Protein; Greiner) immobilisiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend für 1 h mit 1 % BSA in TBS (100 µl/well) bei Raumtemperatur inkubiert (blockiert). Zur Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes wurde daraufhin der spezifische Antikörper in verschiedenen Verdünnungen im Blockpuffer eingesetzt (1 h bei Raumtemperatur, 50 µl/well). Nach dreimaligem waschen mit TBST wurde für 1 h mit dem sekundären Antikörper inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit TBST erfolgte die Zugabe von 100 µl 5-Aminosalicylat (0,1 % in 20 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,8; 0,07 % Perhydrol). Die Farbreaktion wurde nach ca. 15 min durch Zugabe von 1 M NaOH (100 µl) gestoppt und daraufhin die Absorption bei 490 nm in einem ELISA-Lesegerät (MR5000, Dynatec) gemessen.

2.5.4 Proteinbindungstest (Solid Phase Assay)

Die Proteinbindungsanalysen wurden nach dem enzymgekoppelten, abgewandelten ELISA-Test durchgeführt (Aumailley *et al.*, 1989). Die Immobilisierung des ersten Liganden erfolgte über Nacht bei 4 °C. Dabei wurden Heparin-Albumin in einer Konzentration von 5 µg/Well, Sulfatide 10 µg/Well und α-Dystroglycan 0,2 µg/Well eingesetzt. Nach der Inkubation mit 1 % BSA in 0,05 M Tris/HCl, pH 7,4, 0,1 M NaCl (1 h, Raumtemperatur) erfolgte die Bindung des löslichen Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen durch Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Mit spezifischen Antikörpern gegen die löslichen Liganden, in einer zuvor bestimmten Konzentration, erfolgte die Detektion der Bindung analog wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben. Die Kontrolle auf Kreuzreaktionen der Antikörper erfolgte in parallelen Ansätzen, bei denen anstatt des löslichen Liganden nur mit Blockpuffer inkubiert wurde. Im Bindungstests mit Sulfatiden und α-Dystroglycan enthielt der Puffer zusätzlich 1 mM CaCl₂, wobei im letzteren noch 1 mM MgCl₂ vorhanden war. Als Bindungspartner (lösliche Liganden) wurden die in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine und das authentische E3-Fragment getestet.