

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial**

##### **2.1.1.1 Elektrophorese und Zentrifugen**

Horizontal-Gelapparatur 30008 (ehemals Renner, Dannstadt-Schauernheim); Horizontal-Gelapparatur Mini Sub-Cell; Mini Protean II System; Mini Trans Blot; Netzgerät 200/2.0 (alle von Bio-Rad, München); Geldokumentationseinrichtung Gel-Doc II (Biometra, Göttingen); Geltrockner 583 (Bio-Rad, München)

Kühlzentrifuge RC 5C Plus mit SS34- und GSA-Rotoren (Sorvall/DuPont, Bad Homburg); Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburg); Tischzentrifuge 5402, temperierbar (Eppendorf, Hamburg); Zellzentrifuge RT 6000D (Sorvall/DuPont, Bad Homburg)

##### **2.1.1.2 Bakterien- und Zellkultur**

Begasungsbrutschrank BB 6060; Brutschrank B 6060; Mikrobiologische Sicherheitswerkbank LaminAir® HBB2448 (alle von Heraeus-Christ, Hanau); sterile Werkbank Gelaire® BSB 4A (Flow Laboratories, Meckenheim); Lichtmikroskop IM, invers (Zeiss, Oberkochen); Lichtmikroskop Leica DMIL (Leica; Wetzlar), Autoklav DS 202 (Webeco, Bad Schwartau); Stickstofftank zur Lagerung von Zellen (Taylor-Wharton, Hollywood, USA); Warmluft-Rundschüttler "Aerotron" (Infors AG, Bottmingen, CH); Schüttelwasserbad (GFL, Burgwedel).

##### **2.1.1.3 Sonstige Geräte**

ABI DNA-Sequencer 377; Thermocycler "DNA Thermal Cycler 480" ( beide von Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt); Thermocycler "Trio Thermoblock" (Biometra, Göttingen) Fluoreszenzmikroskop "Axioplan" (Zeiss, Oberkochen); Digitale Mikroskopkamera Polaroid DMC Ie (Polaroid, Offenbach); Scanner StudioScanII (AGFA, Deutschland); UV-Photometer "Ultrospec 2000" (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg); Multiplate Reader MRX (Dynatech, Guernsey, GB); Speed-Vac "Centrivac" (Heraeus-Christ, Hanau); Ultra-Tiefkühltruhe U54285 (New Brunswick Scientific/Labotec, Göttingen)

##### **2.1.1.4 Verbrauchsmaterialien**

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Schraubdeckel-Röhrchen oder Platten und Schalen für die Bakterien- bzw. Zellkultur wurden von Falcon/Beckton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner (Nürtingen) bezogen.

- BioMax-Film, (Eastman-Kodak; Rochester, New York, USA)
- Centri-Sep spin columns (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Weiterstadt)
- Einwegpipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg; Gilson, Den Haag; Sarstedt, Nümbrecht)
- Filterpapier Whatman® 3 MM (Whatman International Ltd., Maidstone, GB)
- Nitrocellulose-Membranen, Hybond-C (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Objektträger und Deckgläschen (Menzel-Gläser, Bad Wildungen)

- PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml (FMC Biozym, Hameln)
- Rundfilter zur Mikrodialyse, Type VS, Porengröße 0,025  $\mu\text{m}$  (Millipore, Eschborn)
- Sterilfilter, FP 030/2, Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$  (Schleicher&Schuell, Dassel)
- Sterilfilter, Minisart<sup>®</sup>, Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Göttingen)

## 2.1.2 Reagentien und Reaktionskits

### 2.1.2.1 Reagentien

Alle Standard-Laborchemikalien wurden von Merck (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Darüber hinaus verwendete Substanzen:

- Acrylamid, RotiphoreseR Gel 30, 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)
- Acrylamid, (29:1) für ABI-Sequenziergeräte (Bio-Rad, München)
- Agarose, "Low Melting" (FMC Biozym, Hameln)
- Agarose, NA (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Agarose, Ultra Pure (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Agar, Select Agar (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Ammoniumpersulfat, (Sigma, Taufkirchen)
- Ampicillin, Natrium-Salz (Sigma, Taufkirchen)
- Bacto-Trypton (Dico, Detroit, USA)
- Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
- BSA (Sigma, Taufkirchen)
- Desoxyribonukleotid-Triphosphate (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)
- DMEM (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- DMSO (Serva, Heidelberg)
- EGTA (Ethylenglykol-bis[2-aminomethylether]-N,N,N',N'-Tetraessigsäure; Sigma, Taufkirchen)
- Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen)
- FKS (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Hefeextrakt (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; Sigma, Taufkirchen)
- IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-Thio-Galactopyranosid; Sigma, Taufkirchen)
- Kanamycin-Sulfat (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- MOPS (3-[N-Morpholino]Propansulfonsäure; Sigma, Taufkirchen)
- Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt)
- Phenol, Tris-gepuffert auf pH 7.8 (Merck, Darmstadt)
- Ponceau S (Sigma, Taufkirchen)
- Proteinase-Inhibitor-Cocktail (PIC; Roche, Mannheim)
- Protein A, Protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)
- SDS (Serva, Heidelberg)
- Sephadex G-50 (Sigma, Taufkirchen)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin; Bio-Rad, München)
- Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen)
- Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin)
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat; Sigma, Taufkirchen)
- X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactosid; GIBCO/BRL, Eggenstein)

### 2.1.2.2 Reaktionskits

- ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- BCA - Protein Assay Reagent (Pierce; über KFM Laborchemie, St. Augustin)
- ECL™ Western blotting detection reagents (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Imject® Maleimide Activated mCKLH Kit (Pierce; über KFM Laborchemie, St. Augustin)
- Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- Qiagen Lambda MidiKit (Qiagen, Hilden)
- QIAQuick Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAQuick PCR Purification/Gel Extraction/Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden)
- Silver Staining Kit Protein (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg)
- TA Cloning® Kit (Invitrogen, Leek, Holland)
- Topo TA Cloning® Kit (Invitrogen, Leek, Holland)

### 2.1.3 Puffer und Medien

- Blotpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 10% (v/v) Methanol
- HBSS: ohne CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> (H 4891; Sigma, Taufkirchen)  
mit CaCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> (H 1387; Sigma, Taufkirchen)
- HEPES-Puffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4
- IP-Lysispuffer: 50 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM NaCl; 10% Glycerin; 1% Triton X-100;  
1 mM EGTA; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- Laemmli-Puffer: 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 3% (w/v) SDS; 5% (w/v) 2-Mercaptoethanol;  
10% (w/v) Glycerin; 0,025 mg/ml Bromphenolblau
- LB-Medium: 1% (w/v) Bactotrypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; pH 7,4
- LB-Agar: LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar
- PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O; pH 7,4
- PBS<sup>+/+</sup>: PBS mit 0,1 g/l MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O und 0,132 g/l CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O
- SDS-Laufpuffer: 0,3% (w/v) Trisbase; 1,44% (w/v) Glycin; 0,1% (w/v) SDS
- SOB: 2% (w/v) Bactotrypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl;  
2,5 mM KCl
- SOC: SOB mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 20 mM Glucose
- TAE: 40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,3; 1 mM EDTA
- TBE: 100 mM Tris/HCl, pH 8,3; 83 mM Borsäure; 1 mM EDTA
- TBS-T: 25 mM Tris/HCl, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 0,05% Tween 20
- TE: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

### 2.1.4 Enzyme

- Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, "CIP"; Roche, Mannheim)
- Pfu DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg)
- Restriktionsendonukleasen wurden von NEB (Schwalbach/Taunus) bezogen.
- RNase A, DNase frei (QIAGEN, Hilden)
- T4 DNA-Ligase (GIBCO/BRL, Eggenstein oder NEB, Schwalbach/Taunus )
- Taq DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)
- Trypsin (Sigma, Taufkirchen)

### 2.1.5 Molekulargewichtsstandards

- 100 bp DNA-Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein)  
Fragmentgrößen (bp): 100, 200, 300, 400, 500, 600 (doppelte Menge), 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 2072
- 1 kb DNA-Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein)  
Fragmentgrößen (bp): 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 1018, 11198, 12216
- SDS-7B Molekulargewichtsstandard, gefärbt (Sigma, Taufkirchen)  
Molekulare Massen (kDa): 26, 36, 48, 58, 84, 116, 180
- Nativer Proteinmarker (Sigma, Taufkirchen)  
Molekulare Massen (kDa): 14, 29, 45, 66, 132, 272, 545

### 2.1.6 Antikörper

#### 2.1.6.1 Primärantikörper

- monoklonaler anti- $\beta$ -Catenin -Antikörper (610153; BD Biosciences, San Jose, CA, USA )
- monoklonaler anti-E-Cadherin-Antikörper (U 3254; DECMA-1; Sigma, Taufkirchen)
- polyklonaler anti-Aktin-Antikörper (A2066, Sigma, Taufkirchen)
- polyklonaler anti- $\alpha$ -Catenin-Antikörper (C2081; Sigma, Taufkirchen)
- polyklonaler anti- $\beta$ -Catenin-Antikörper (C2206; Sigma, Taufkirchen)
- polyklonaler anti- $\gamma$ -Tubulin-Antikörper (sc-7396; Santa Cruz, USA)
- polyklonaler anti-mLI-Cadherin-Antikörper (beschrieben in Angres et al., 2001)
- polyklonaler anti-mKsp-Cadherin-Antikörper (Wendeler et al.; eingereicht)
- polyklonaler anti-E-Cadherin-Antikörper (AF748; R+D, Wiesbaden)
- polyklonaler-anti-human-IgG (A 0089, Fc-spezifisch; Dako, Hamburg)

#### 2.1.6.2 Sekundärantikörper

- Esel-anti-Ziege, HRP-konjugiert (Dianova, Hamburg)
- Kaninchen-anti-Maus, HRP-konjugiert (Dako, Hamburg)
- Kaninchen-anti-Ratte, HRP-konjugiert (Dako, Hamburg)
- Schwein-anti-Kaninchen, HRP-konjugiert (Dako, Hamburg)
- Ziege-anti-Kaninchen, Alexa<sup>TM</sup> 488 konjugiert (Molecular Probes, Leiden, Holland)
- Ziege-anti-Kaninchen, Alexa<sup>TM</sup> 594 konjugiert (Molecular Probes, Leiden, Holland)
- Ziege-anti-Ratte, Alexa<sup>TM</sup> 594 konjugiert (Molecular Probes, Leiden, Holland)

### 2.1.7 Farbstoffe zur Lebendfärbung von Zellen

Vybrant<sup>TM</sup> DiI und DiO von Molecular Probes (Leiden, Niederlande) sind lipophile Fluoreszenz-Farbstoffe zur Lebendfärbung von eukaryonten Zellen. DiI besitzt ein Absorptionsmaximum bei 549 nm und ein Emissionsmaximum bei 565 nm, während für DiO das Absorptionsmaximum bei 484 nm und das Emissionsmaximum bei 501 nm liegt. Sie eignen sich zur Färbung von adhärennten Zellen oder zur Färbung von Zellen in Suspension (Produkt Informationen von Molecular Probes vom 19.11.99). Zur Färbung von adhärennten CHO-Zellen werden die Stammlösungen von DiI und DiO (1 mM) jeweils 1:200 in Zellkulturmedium verdünnt und dieses für 15 min bei 37°C mit den Zellen inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal mit vorgewärmten Medium (37°C) für 5 min

gewaschen. Nach einem letzten Waschschrift für 10 min in frischem Medium können die Zellen trypsiniert (s 2.4.1) und für die folgenden Versuche eingesetzt werden.

## 2.1.8 Plasmid-Vektoren

### 2.1.8.1 Klonierungsvektoren

- pCR<sup>TM</sup> II, Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten (Invitrogen, Leek, Holland)
- pCR<sup>TM</sup> 2.1, Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten (Invitrogen, Leek, Holland)
- pCR-mKsp, Maus-Ksp-Cadherin-cDNA in pCR<sup>TM</sup> 2.1 (beschrieben in Hecking, 2001)
- pBluescript® S/K(+), Klonierungsvektor für Bakterien (Stratagene, Heidelberg)
- pSK-hLI, humane LI-Cadherin-cDNA in pBluescript® S/K (Zitt, 1997)
- pSK-mLI, Maus-LI-Cadherin-cDNA in pBluescript® S/K (Angres et al., 2001)
- pSK-mE, Maus-E-Cadherin-cDNA in pBluescript® S/K (freundlicherweise von Dr. O. Huber zur Verfügung gestellt)
- pSK-EELI, Chimäre aus Maus-E- und Maus-LI-Cadherin-cDNA in pBluescript® S/K (Hergestellt von Sebastian Tegethoff)
- pSK-LILIE, Chimäre aus Maus-E- und Maus-LI-Cadherin-cDNA in pBluescript® S/K (Hergestellt von Sebastian Tegethoff)

### 2.1.8.2 Expressionsvektoren

- pACCMVpLpA (Adenoviraler Expressionsvektor; R.D. Gerard, 1995)
- pEGFP-C1, Vektor zur Expression von GFP in eukaryonten Zellen (Clontech, Heidelberg)
- pCMV5-IgG (Expressionvektor für IgG-Fc-Fusionsproteine; freundlicherweise von Prof. D. Vestweber zur Verfügung gestellt)
- pLXRN (BD Biosciences/Clontech, Palo Alto, CA, USA)

## 2.1.9 Bakterienstämme und Zelllinien

### 2.1.9.1 Bakterienstämme

- *E. coli* Top10F' (Invitrogen, Leek, Holland); Genotyp: [F' lacIq, Tn10(tet<sup>R</sup>)], mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC),  $\phi$ 80, lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, araD139  $\Delta$ (ara-leu)7679, galU, galK, rpsL(Str<sup>R</sup>), endA1, nupG
- *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg); Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1,  $\lambda^-$ , hsdR17 (rk<sup>-</sup>, mk<sup>+</sup>), supE44, relA1, lac<sup>-</sup>, [F', proAB, lacI<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10 (tet<sup>R</sup>)]
- *E. coli* DH5  $\alpha$  (Stratagene, Heidelberg); Genotyp: supE44,  $\Delta$ lac, U169, ( $\phi$ 80, lacZ $\Delta$ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1

### 2.1.9.2 Zelllinien

- CHO-K1: fibroblastoide Zellen aus Hamsteroovarien (Chinese Hamster Ovary; (Puck, 1958))
- STC-1: Neuroendokrine Zellen aus Maudünndarm; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. B. Wiedenmann, Charité, HU Berlin

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 DNA- Präparation und Aufreinigung**

#### **2.2.1.1 Plasmid-DNA Präparation**

##### *Mini-Präparation*

Um kleine Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wird ein Kit zur Aufreinigung aus 1,5 ml Übernachtskulturen verwendet (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN). Der Zellaufschluß erfolgt bei dieser Methode durch alkalische Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Hierbei wird die chromosomale DNA denaturiert und im Komplex mit Proteinen und Zelltrümmern präzipitiert, wobei sie von der in Lösung verbleibenden Plasmid-DNA getrennt werden kann. Ein höherer Reinheitsgrad wird dadurch erreicht, daß die Plasmid-DNA nach dem Entfernen der Proteine und der Zelltrümmer mit Hilfe kleiner Schleudersäulchen unter Benutzung einer Tischzentrifuge an eine Silica-Matrix gebunden wird. Nach einem Waschschrift kann die gereinigte DNA in einer Menge von maximal 10 µg (Herstellerangabe) eluiert werden. Alle Lösungen sowie die Säulchen sind in dem Kit enthalten und werden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt.

##### *Maxi-Präparation*

Größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA werden mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits isoliert. Den Herstellerangaben folgend wird eine 100 bis 200 ml Übernachtskultur von transformierten E. coli Bakterien mit den Kit-Komponenten zunächst einer alkalischen Lyse unterzogen. Anschließend wird die Plasmid-DNA über eine Anionenaustauschersäule gereinigt und am Ende mittels Isopropanolfällung aufkonzentriert. Mit dieser Methode können aus dem beschriebenen Ansatz zwischen 200 und 500 µg Plasmid-DNA isoliert werden. Die Ausbeute wird mit Hilfe eines UV-Photometers bestimmt (s. Kapitel 2.2.2.3).

#### **2.2.1.2 Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren**

##### *Ethanol-fällung*

Die Fällung von Nukleinsäuren mit Alkoholen (Ethanol, Isopropanol) ist eine gebräuchliche Methode, um selbst kleine Mengen von DNA oder RNA aus wäßrigen Lösungen zu konzentrieren und zu entsalzen. Für die Ethanol-fällung werden zu der DNA-haltigen Lösung 0,1 Volumenteile 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben, vermischt und dann 2,5 Volumenteile der Ausgangsmenge an 100% Ethanol zugesetzt. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wird das ausgebildete Präzipitat in einer Tischzentrifuge bei 16500 x g oder bei großen Volumina in einer Sorvall RC 5 plus bei 20000 x g für 30 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet mit eiskaltem 70%igen Ethanol überschichtet. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 16500 x g für 10 min wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette quantitativ entfernt. Das DNA-Pellet wird dann für 5 bis 10 min luftgetrocknet. Das getrocknete DNA-Pellet wird in einem angemessenen Volumen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 oder H<sub>2</sub>O resuspendiert.

##### *Isopropanolfällung*

Um das Gesamtvolumen einer Nukleinsäurefällung möglichst klein zu halten, kann man anstelle von Ethanol auch einen weniger polaren Alkohol, wie Isopropanol, verwenden. In diesem Fall werden keine zusätzlichen Salze verwendet, sondern der wäßrigen DNA-Lösung werden 0,6 Volumenteile Isopropanol (100%) zugesetzt. Die Ausbildung des Präzipitates erfolgt ohne eine Inkubation bei

niedrigen Temperaturen, so daß sofort mit der ersten Zentrifugation gemäß der Ethanol-fällung begonnen werden kann. Alle weiteren Schritte werden ebenfalls von der Ethanol-fällung übernommen. Isopropanol hat den Nachteil, daß er weniger flüchtig ist und ungenügend gewaschene Pellets unter Umständen schwerer zu resuspendieren sind.

#### **2.2.1.3 Phenolextraktion**

Zur Abtrennung von Proteinen aus wäßrigen DNA-haltigen Lösungen wird eine Phenolextraktion durchgeführt. Das verwendete Phenol ist mit TE-Puffer (pH 8,0) gesättigt und zusätzlich als Antioxidationsmittel mit 1 mg/ml 8-Hydroxyquinolin versetzt, welches zu einer Gelbfärbung des Phenols führt. Die zu reinigende Lösung wird mit einem halben Volumen Phenol und einem halben Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und 5 min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16500 x g wird die obere wäßrige Phase ohne Berührung der meist sichtbaren weißen Interphase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgt eine zweite Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), um noch vorhandene Reste von Phenol aus der wäßrigen Phase zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation und dem Überführen der wäßrigen Phase in ein frisches Gefäß wird das Volumen bestimmt und eine Ethanol-fällung entsprechend (2.2.1.2) durchgeführt.

#### **2.2.1.4 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Um Produkte aus einer Polymerasekettenreaktion (PCR) von den verwendeten Oligonukleotiden und Enzymen zu trennen, wird ein PCR-Purification-Kit ("QIAquick PCR Purification Kit", Qiagen, Hilden) verwendet. Das PCR-Produkt wird den Angaben des Herstellers folgend zunächst mit einem Puffer versetzt. So äquilibriert kann die DNA anschließend durch Bindung an eine Silica-Matrix in Schleudersäulchen von störenden Substanzen befreit werden und die gereinigte DNA in einem definierten Volumen Elutionspuffer von der Säule eluiert werden. Die Verwendung von Silica-Säulchen ist auch eine mögliche Alternative zu der in Abschnitt 2.2.1.3 beschriebenen Phenol/Chloroform-Extraktion zur Reinigung von Plasmiden oder DNA-Restriktionsfragmenten.

#### **2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen**

Zur Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen wird die gewünschte Fragment-Bande mit einem Skalpell unter UV-Licht geringer Intensität aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Die Aufreinigung erfolgt in Abhängigkeit des Gewichts mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit", (Qiagen, Hilden) entsprechend des Herstellerprotokolls. Nach dem Schmelzen der Agarose-Gel-Fragmente erfolgt die Aufreinigung über die schon unter 2.2.1.1 beschriebenen Schleudersäulchen mit Silica-Matrix.

## 2.2.2 DNA-Analyse

### 2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Je nach zu trennenden DNA-Größen werden 0,7 bis 1,5%ige Agarose-Gele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wird eingewogen und durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Die Agaroselösung wird in den Träger einer horizontalen Gelkammer gegossen und ein Kamm entsprechend der Probenzahl und Probenvolumina eingesetzt. Nach dem Aushärten wird das Gel mit dem Träger in eine mit TAE als Laufpuffer gefüllte Gelkammer gesetzt und der Kamm vorsichtig gezogen. Die DNA-Proben werden mit 0,25 Volumenteilen Stopperlösung (100 mM EDTA; 4x TAE; 50% Glycerin; 0,1% Bromphenolblau) versetzt und in die Geltaschen pipettiert, wobei die aufgetragene DNA-Menge 1  $\mu\text{g}$  pro 0,5 cm Gelbreite nicht überschreiten sollte. Mindestens eine Spur wird parallel mit einem geeigneten Größenstandard beladen. Die Auftrennung erfolgt für 50 min bei konstant 100 Volt bzw. bis zu 10 h bei konstant 20 Volt für hochmolekulare DNA oder um hohe Trennleistungen bei präparativen Gelen zu erreichen.

### 2.2.2.2 Ethidiumbromidfärbung von DNA

Zur Detektion von DNA in Agarose-Gelen wird das Gel in einem Ethidiumbromidbad (0,5 mg/ml Ethidiumbromid in TAE) für etwa 10 min gefärbt. Nach kurzen Entfärben in Wasser wird das Gel auf einem UV-Leuchttisch bei 312 nm zur Dokumentation fotografiert. Bei präparativen Gelen wird das Ethidiumbromid dem Gel direkt beigemischt und/oder dem frischen Laufpuffer zugegeben, um bei der anschließenden DNA-Präparation Verunreinigungen mit Fremd-DNA zu vermeiden.

### 2.2.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Von kleineren DNA-Mengen, d.h. weniger als 200 ng absolut bzw. Konzentrationen unter 100 ng/ $\mu\text{l}$ , werden Aliquots auf Agarose-Gelen parallel mit einem Massenstandard (GibcoBRL, definierte DNA-Banden zwischen 10-120 ng) aufgetrennt. Nach Ethidiumbromidfärbung erfolgt eine Abschätzung der DNA-Menge durch den Vergleich der Bandenintensität unter UV-Licht.

Nukleinsäuren in höherer Konzentration oder großen Mengen wird im Photometer in 500  $\mu\text{l}$  Quarzküvetten vermessen und auf ihre Reinheit überprüft. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine bei 280 nm. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gibt Aufschluß über den Reinheitsgrad der DNA-Lösung. Saubere DNA in Wasser liefert einen Wert zwischen 1,5 und 2,0. Für die Berechnung der DNA-Konzentration gelten folgende Werte:  $A_{260}=1,0$  entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doppelsträngiger DNA, 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RNA bzw. Einzelstrang-DNA und 25 - 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  an Oligonukleotiden (Sambrook et al., 1989).

### 2.2.2.4 Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Didesoxy-Nukleotiden

#### *Sequenzierung mit fluoreszenz-markierten Didesoxy-Nukleotiden*

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA basiert auf der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger (Sanger and Coulson, 1978; Sanger et al., 1977). Für die Sequenzierung mit fluoreszenz-markierten Didesoxy-Nukleotiden wird der "Big Dye-Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" von Applied Biosystem (PE, Weiterstadt) eingesetzt.



Der Standard-Sequenzieransatz besteht aus folgenden Komponenten:

<u>Template DNA (QIAGEN gereinigt):</u>	
0,5 bis 1 $\mu\text{g}$ Plasmid-DNA	$\leq 4,0 \mu\text{l}$
Sequenzierprimer (10 $\mu\text{M}$ )	0,4 $\mu\text{l}$
Big Dye Ready Reaction Mix	6,0 $\mu\text{l}$
Wasser	3,5 $\mu\text{l}$ - (Volumen der DNA)
Endvolumen	10,0 $\mu\text{l}$

Ist das Volumen der benötigten DNA-Menge größer als 5,5  $\mu\text{l}$ , wird die DNA entweder eingeeengt oder der Reaktionsansatz unter Einsatz von 6 bzw. 8  $\mu\text{l}$  "Dye Terminator" auf 15 bzw. 20  $\mu\text{l}$  vergrößert. Die Reaktionsbedingungen für das "Cycle Sequencing" folgen den Herstellerangaben mit Ausnahme eines verlängerten primären Denaturierungsschrittes. Verwendet wird ausschließlich ein Thermal-Cycler TC480 (Perkin Elmer, Weiterstadt).

Reaktionsbedingungen	2 min 94°C
	25 x (30 s 95°C; 20 s 50°C; 4 min 60°C)
	Kühlen auf 4°C

Die Sequenzierprodukte werden unter Verwendung von Centri-Sep Säulchen mit Sephadex-G50 (Sigma, Taufkirchen) von nicht eingebauten Fluoreszenz-Nukleotiden und Primern abgetrennt.

#### *Sequenziergele für die automatische DNA-Sequenzierung*

Acrylamidsequenziergele für die automatische Sequenzierung werden entsprechend den Herstellerangaben (ABI PRISM Tips, Stand Oktober 1998) erstellt. Es werden folgende Gelsysteme verwendet: ABI 377: 48 cm effektive Trennstrecke im Gel ("well to read", WTR)

#### Zusammensetzung:

18,0 g Harnstoff, 7,1 ml 30% Acrylamid (29:1, Acryl:Bisacrylamid; BioRad, München),  
6,0 ml 10 x TBE-Puffer, 21 ml ddH<sub>2</sub>O; 20  $\mu\text{l}$  TEMED, 300  $\mu\text{l}$  10% APS

Die Analyse der gereinigten Sequenzierprodukte erfolgt mit Sequenzierautomaten der Firma Applied Biosystems/Perkin Elmer (ABI 377-DNA-Sequencer). Die Nukleotidsequenzen werden mit Hilfe der Tetra-Analyse/Complign Software (MacMolly<sup>R</sup> Tetra software package, Version 3.7, Soft Gene GmbH, Berlin) bearbeitet.

## 2.2.3 DNA-Modifikation

### 2.2.3.1 Restriktionsendonuklease-Verdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Basensequenzen in einem DNA-Doppelstrang und schneiden beide Stränge an definierten Stellen (Restriktionsverdau). Pufferbedingungen und eingesetzte Enzymkonzentrationen erfolgen laut Herstellerangaben. Der analytische Restriktionsverdau wird in einem Volumen von 15 bis 20  $\mu\text{l}$  durchgeführt, präparative Ansätze in einem Volumen bis 200  $\mu\text{l}$  bei einer DNA-Konzentration von 0,1 bis max. 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Pro Mikrogramm DNA werden 0,5 bis 1 Unit Enzym zugesetzt und der Reaktionsansatz für 1 bis 16 h bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert. Inkubationen bei 37°C werden in einem Warmluftschrank durchgeführt. Andere Temperaturen werden in einem temperierbaren Heizblock oder im Wasserbad realisiert. Die Reaktion wird durch Hitzeinaktivierung oder meist durch Zugabe von Stopperlösung (100 mM EDTA; 4x TAE; 50% Glycerin; 0,1% Bromphenolblau) gestoppt. Die Vollständigkeit der Reaktion und das entstandene DNA-Fragmentmuster werden durch Analyse von Aliquots auf Agarosegelen untersucht.

### 2.2.3.2 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden

Um bei einer Klonierungsreaktion eine Religation linearisierter Vektoren zu vermeiden, werden die resultierenden 5'-DNA-Enden einer Dephosphorylierung unterzogen. Hierfür wird der Ansatz, der den linearisierten Vektor enthält, mit 0,1 Volumenteilen des 10-fach konzentrierten Dephosphorylierungspuffers versetzt. Nach Zugabe von 2 Units CIP (calf intestine phosphatase; NEB, Schwalbach/Taunus), erfolgt eine Inkubation für 1 h bei 37°C. Zur weiteren Verwendung der DNA sollte diese nun gereinigt werden (s. 2.2.1.4)

### 2.2.3.3 Ligation von Restriktionsfragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor werden beide DNA-Fraktionen in hochreiner Form in einem Reaktionsvolumen von 10  $\mu\text{l}$  vereinigt. Dabei werden 20 bis 50 ng Vektor-DNA und ein 5 bis 10 facher molarer Überschuss an zu insertierender DNA eingesetzt. Der Ligationsansatz wird entweder 12 h bei 16°C mit 7,5 Units T4 DNA-Ligase oder 2 h bei 24°C mit 3 Units hochkonzentrierter T4 DNA-Ligase inkubiert. Die optimalen Pufferbedingungen werden durch anteilige Zugabe der 5- oder 10-fach konzentrierten Pufferstammlösungen entsprechend den Herstellerangaben eingestellt. Sie enthalten in jedem Fall Magnesiumionen und ATP.

### 2.2.3.4 Subklonierung von PCR-Produkten

Produkte aus einer Polymerasekettenreaktion, die mit Taq-Polymerase erzeugt wurden, besitzen Template-unabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an ihren 3'-Enden. Sogenannte TA-Klonierungssysteme (z. B. TA Cloning Kit, Invitrogen) machen sich diese Eigenschaft zunutze, indem die geöffneten Enden eines Plasmidvektors mit einem komplementären 5'-Desoxythymine-Überhang versehen werden und so eine Basenpaarung mit dem zu ligierenden PCR-Produkt eingehen können.

Für die Ligation von 50 ng Vektor mit dem PCR-Produkt wird ein molares 1:1 Verhältnis empfohlen, maximal werden jedoch 2  $\mu\text{l}$  ungereinigtes PCR-Produkt eingesetzt. Die Ligation wird entsprechend den Herstellerangaben aus den Kit-Komponenten angesetzt und erfolgt bei 16°C über Nacht.

### 2.2.3.5 TOPO-TA-Klonierung von PCR-Produkten

Die TOPO-TA-Klonierung stellt eine Weiterentwicklung der unter 2.2.3.4 beschriebenen TA-Klonierung von PCR-Produkten dar (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen). Das Funktionsprinzip beruht ebenfalls auf den unspezifisch angehängten 3'-Desoxyadenosinen an durch Taq-Polymerase generierten PCR-Produkten. Im Unterschied zu der klassischen TA-Klonierung erfolgt die Ligationsreaktion nicht durch eine T4-DNA-Ligase, sondern mittels einer Topoisomerase, mit der der Plasmidvektor vorinkubiert wurde. Gibt man zu diesem System ein PCR-Produkt, erfolgt innerhalb von 5 Minuten eine Ligation bei Raumtemperatur, so daß man unter minimalem Zeitaufwand mit einer Bakterientransformation fortfahren kann. Das Zusammenfügen der Kit-Komponenten erfolgt entsprechend den Herstellerangaben.

### 2.2.4 Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Übersicht in (Arnheim and Erlich, 1992)) ermöglicht die starke Vermehrung eines gewünschten DNA-Fragments ("template") mit Hilfe Sequenz-spezifischer Oligonukleotide ("primer"), Desoxynukleotiden und temperaturstabiler DNA-Polymerasen. Je nach Primer-Sequenz ist es mit dieser Methode auch möglich, gezielte Mutationen in die DNA einzubauen, wie zum Beispiel eine Restriktionsenzym-Erkennungssequenz. Häufig werden die erhaltenen Produkte solcher Reaktionen in Plasmide mit Hilfe einer TA-Ligation eingebaut (2.2.3.4).

Alle eingesetzten synthetischen Oligonukleotide für Sequenz- und PCR-Reaktionen wurden von TIB Molbiol (Berlin) bezogen.

Für präparative PCR-Applikationen, die eine anschließende Klonierung des PCR-Produktes erfordern, werden hitzestabile DNA-Polymerasen verwendet, die über eine Korrekturlesefunktion verfügen. Für die Herstellung der LI-Fc-Chimären wurde die Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene, USA) verwendet.

Standardansatz:

Komponente	Volumen
Wasser	20,55 $\mu\text{l}$
Template-DNA (375 pg)	0,25 $\mu\text{l}$
Reaktionspuffer, 10 x	2,5 $\mu\text{l}$
Nukleotide, 25 mM (jedes Nukleotid)	0,2 $\mu\text{l}$
Primer 1, 10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
Primer 2, 10 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
Pfu-Polymerase, 2,5 U/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
Endvolumen	25,0 $\mu\text{l}$

## Herstellung des Fusionsproteins mLI-Fc

<b>Template</b>	pSK-mLI (1,5 ng/ $\mu$ l)
<b>5'-Primer: mLIforEC</b>	5'-GAAAGGTACCCAAGTGAAGAGAGCAAGATGGTGTCTGCC-3'
<b>3'-Primer: mLIrevEC</b>	5'-CAATCGATAACTTACCTGTCGGTATCCCATCCTGTCTGCCTG-3'
<b>Reaktionsbedingungen</b>	2 min/ 94°C 33 x (30 s / 94°C; 20 s / 68°C; 2 min / 72°C) 3 min / 72°C; kühlen bei 8°C

## Herstellung des Fusionsproteins hLI- Fc

<b>Template</b>	pSK-hLI (1,5 ng/ $\mu$ l)
<b>5'-Primer: hLIforEC</b>	5'-TTGGTACCAAGAAAACACTATGATACTTCAGGCCCATCTTC-3'
<b>3'-Primer: hLIrevEC</b>	5'-CAATCGATAACTTACCTGTCGGTATCCCAGTCTGGTGAC-3'
<b>Reaktionsbedingungen</b>	2 min/ 94°C 33 x (30 s / 94°C; 20 s / 68°C; 2 min / 72°C) 3 min / 72°C; kühlen bei 8°C

Herstellung des Fusionsproteins  $\Delta$ 23LI-Fc

<b>Template</b>	pCMV-ECmLI-IgG-Fc (5 ng/ $\mu$ l)
<b>5'-Primer: mLI1158for</b>	5'-ACATGTCTGTCTCCAGTGACTGTATTTGAA-3'
<b>3'-Primer: mLI516rev</b>	5'-GGGTCGGTTGTCATTGATGTCCTTGACTTC-3'
<b>Reaktionsbedingungen</b>	2 min/ 95°C 18 x (30 s / 95°C; 30 s / 65°C; 12 min / 72°C) 3 min / 72°C; kühlen bei 8°C

Jeweils 5  $\mu$ l des PCR-Produktes werden im Agarose-Gel aufgetrennt, die verbleibende Menge in dieser Zeit auf Eis gelagert. Für eine folgende Ligation in TA-Vektoren wird das PCR-Produkt nochmals für 20 min bei 72°C inkubiert, um einen Verlust der Desoxyadenosin-Überhänge an den Enden der PCR-Produkte zu minimieren.

## 2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen und Transformation

Die hier beschriebene Vorgehensweisen zur Herstellung von kompetente Bakterienzellen und deren Transformation basieren auf der Methode von Hanahan (Hanahan, 1983).

### 2.2.5.1 Rubidiumchlorid-Methode

Ausgehend von einem Bakterienausstrich des gewünschten *E.coli*-Stammes wird eine Übernacht-Flüssigkultur angelegt. 100 ml FI-Medium (2% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM KCl; pH 7,6 mit KOH) werden mit 1 ml der Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Alle 15 bis 30 min werden 1 ml-Aliquots entnommen und einer Absorptions-Messung in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm unterzogen. Bei Erreichen eines Wertes von A<sub>600</sub>=0,5 werden die Bakterien auf Eis abgekühlt und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 2500 x g sedimentiert. Das Pellet wird in 30 ml TFB1-Puffer (30 mM Kaliumacetat, pH 7,5 (Essigsäure), 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 100 mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin) resuspendiert und 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) werden

die Zellen in 8 ml TFB2-Puffer (10 mM MOPS, pH 7,0 (NaOH), 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% (v/v) Glycerin) resuspendiert, aliquotiert (200  $\mu$ l Zellen + 40  $\mu$ l Glycerin) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgt bei -80°C.

#### **2.2.5.2 *E. coli*-Transformation**

Zur Standardtransformation werden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz werden 1 bis 2  $\mu$ l Ligationsansatz zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgt ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Wasserbad, gefolgt von einer einminütigen Abkühlung im Eisbad. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l SOC-Medium (2.1.3) werden die transformierten Bakterien zur Regeneration für 60 min unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bevor sie in einer 20  $\mu$ l- und einer 100  $\mu$ l-Portion auf LB-Agarplatten (2.1.3) mit dem geeigneten Antibiotikum zur Selektion ausplattiert werden. Folgende Antibiotika werden je nach Klonierungsvektor verwendet: Ampicillin (50  $\mu$ g/ml); Tetrazyklin (30  $\mu$ g/ $\mu$ l); Kanamycin (30  $\mu$ g/ $\mu$ l).

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C bilden sich bei erfolgreicher Transformation Bakterienkolonien aus. Von den Platten, auf denen Einzelkolonien gut voneinander zu trennen sind, werden zwischen 10 und 30 Klone mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und auf einer neuen LB-Agarplatte ausgestrichen. Gleichzeitig wird eine 1,5 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) - Flüssigkultur inokuliert. Nach Plasmidisolierung, Restriktionsverdau und Auftrennung der DNA in einem Agarosegel können positive Klone identifiziert werden.

Die Transformation von TA-Klonierungsprodukten erfolgt prinzipiell auf die gleiche Weise; Abweichungen bei den Mengen und Zeiten werden entsprechend den Herstellerangaben vorgenommen. Dieses System erlaubt bereits auf der Agarplatte durch Verwendung von X-Gal und IPTG eine Farbselektion positiver, weißer Kolonien ("blue/white screening", (Sambrook et al., 1989)).

#### **2.2.5.3 Anlegen von Bakterien-Gefrierkulturen**

Stationär gewachsene Bakteriensuspensionen werden mit 20% (v/v) sterilem Glycerin versetzt, gut durchmischt und in 1 ml Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C. Zur Reaktivierung wird eine Übernacht-Kultur mit der Bakteriengefrierkultur angeimpft, indem mit einer sterilen Impföse von der noch gefrorenen Oberfläche Zellen abgenommen und in LB-Medium überführt werden.

## **2.3 Proteinchemische Methoden**

### **2.3.1 Herstellung von Protein-Lysaten**

#### **2.3.1.1 Organlysate aus der Maus**

Die Mäuse (C57/BL6; Charles River, Deutschland) werden durch cervikale Dislokation getötet und sofort präpariert. Die Organe (meist Darm, Leber, Magen, Lunge, Nieren und Milz) werden entnommen, mit eiskaltem PBS gespült und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung bis zur Probenaufbereitung erfolgt bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Zur Herstellung von Proteinlysaten wird das Gewebe noch in gefrorenem Zustand mit einem Skalpell zerkleinert. In einem 2 ml Douncer (Braun, Melsungen) werden 1 ml PBS/0,1% TritonX-100 und PIC (Roche, Mannheim) vorgelegt und darin etwa 100 mg Gewebe aufgeschlossen. Die Lysate werden bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $10000 \times g$  abzentrifugiert bevor die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt werden. Mittels BCA-Assay (2.3.2) wird der Gesamtproteingehalt der geklärten Lysate bestimmt und die Lysate sodann in geeigneten Aliquots in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Analyse im Western Blot (s. 2.3.5) werden die Proben 1:2 mit 2 x Laemmli-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und kurz abzentrifugiert (Laemmli, 1970). Eine gewünschte Menge der Organlysates kann nun für den Western Blot eingesetzt werden.

#### **2.3.1.2 Zell-Lysate**

Eine konfluent bewachsene 100 mm Zellkulturschale wird vorsichtig zweimal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen. Die Zellen werden dann mit 1 ml PBS überschichtet, mit einem Schaber von der Schale gekratzt und in einem 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Suspension wird für 3 min bei  $7500 \times g$  in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand entfernt und bis zum weiteren Gebrauch auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Lyse wird das Zellpellet mit  $150 \mu\text{l}$  PBS/0,1%v TritonX-100 und PIC auf Eis aufgetaut, 3 x für 5 s auf Eis sonifiziert und für 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $10000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Gesamtproteinkonzentration wird bestimmt (BCA-Assay). Geeignete Mengen des Zell-Lysates können nun mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und für die SDS-PAGE (2.3.3.1) eingesetzt werden.

### **2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA Protein Assay**

Die Konzentration von Proteinen wird mit der Bicinchoninsäuremethode ermittelt (Smith et al., 1985). Die Reaktion wird in Mikrotiterplatten mit gebrauchsfertigen BCA Protein Assay Reagentien (Pierce, Weisskirchen) durchgeführt. Zu je  $10 \mu\text{l}$  einer Proteinlösung werden  $200 \mu\text{l}$  des BCA-Reagens gegeben und die Ansätze für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Das Reaktionsprinzip dieser Nachweismethode basiert darauf, daß Proteine in alkalischer Lösung  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen reduzieren, die dann mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden. Die Menge dieses Farbstoffkomplexes wird bei 570 nm in einem Photometer bestimmt, wobei sich der lineare Meßbereich von 0,2 bis 1,4 mg Protein/ml erstreckt. Der zugehörige Extinktionskoeffizient wird mit Hilfe einer Kalibriergeraden mit BSA-Proteinstandards parallel zu jeder Messung ermittelt. Zu beachten ist, daß die Proteinprobe frei von Reduktionsmitteln wie zum Beispiel größeren Mengen von Zuckern sein muß, da die Messung sonst fehlerhaft ist.

### 2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

#### 2.3.3.1 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteingemischen aufgrund ihres relativen Molekulargewichts erfolgt mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proteine werden unter reduzierenden Bedingungen durch SDS-Moleküle im Probenpuffer proportional zur Anzahl ihrer Aminosäuren mit negativen Ladungen besetzt, so daß sie in einem elektrischen Feld nach ihrer Ladung bzw. Größe aufgetrennt werden können. Die Auftrennung wird mit Acrylamid/Bisacrylamid-Sammelgelen von 3% und Trenngelen von 7,5, 12,5 oder 15% in einer Mini Protean II-Kammer (Bio-Rad, München) mit den Gelmaßen von 80 x 55 x 0,75 mm durchgeführt.

Pipettierschema für SDS -Polyacrylamid-Gele:

Lösungen	Sammelgel 3%	Trenngel 7,5%	Trenngel 12,5%	Trenngel 15%
Acrylamid/Bisacrylamid	2,4 ml	6,9 ml	9,3 ml	10,85 ml
1 M Tris-HCl (pH 8,7)	-	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml	-	-	-
SDS (10%)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,3 ml	5,4 ml	3,0 ml	1,4 ml
TEMED	25 µl	70 µl	70 µl	70 µl
APS (10%)	50 µl	17 µl	17 µl	17 µl

Die Proteinlysate werden mit 4-fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min auf 96°C erhitzt. Das Probenvolumen beträgt maximal 25 µl pro Tasche und sollte eine Proteinmenge von 50 µg nicht überschreiten.

Zur Analyse von Proteinlysaten unter nicht-reduzierenden Bedingungen werden diese in Laemmli-Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol aufgenommen und auch nicht aufgekocht.

Die Elektrophorese erfolgt während des Einlaufens in das Sammelgel zunächst für etwa 15 min bei 20 mA, die eigentliche Auftrennung beginnt mit Erreichen des Trenngeltes und wird für etwa 60 min bei 40 mA durchgeführt.

AA/BIS: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid (Roth, Karlsruhe)

Laufpuffer: 0,3% (w/v) Trisbase, 1,44% (w/v) Glycin, 0,1% (w/v) SDS

### 2.3.4 Detektion von Proteinen im PAA-Gel

#### 2.3.4.1 Coomassiefärbung

Das Polyacrylamid-Gel wird 30 min in Färbelösung (50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,025% Coomassie brilliant blue R250) geschüttelt. Im Entfärber (10% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) wird das Polyacrylamid-Gel so lange gebadet, bis der Hintergrund vollständig entfärbt ist. Ein kleiner feinporiger Kunststoff-Schwamm im Entfärbebad sowie das Wechseln der Entfärbelösung beschleunigen diesen Vorgang. Der Vorteil der Coomassiefärbung ist das relativ

einfache Protokoll und die Quantifizierbarkeit der Proteinbanden. Der Nachteil ist die geringe Sensitivität mit einer unteren Nachweisgrenze von etwa 200 ng pro Bande.

#### **2.3.4.2 Silberfärbung**

Weitaus empfindlicher als die Coomassiefärbung ist die Silberfärbung mit einer unteren Nachweisgrenze von etwa 5 ng pro Bande. Jedoch ist die Silberfärbung schlecht quantifizierbar und langwierig. Zur vereinfachten Durchführung wurde das "Silver Staining Kit Protein" (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet, welches einen Proteinnachweis nach 2 h erlaubt und auf der Methode von Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven and Dernick, 1988) basiert. Die Durchführung erfolgte nach den Herstellervorgaben.

### **2.3.5 Western Blot**

#### **2.3.5.1 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran**

Das ungefärbte Polyacrylamid-Gel wird zunächst mit Blotpuffer (2.1.3) äquilibriert, bevor der "Blotsandwich" wie folgt aufgebaut wird:

- ein Kunststoff-Schwamm
- drei Lagen Whatmann® 3MM Filterpapier (getränkt in Blotpuffer)
- das äquilibrierte Gel
- eine Nitrozellulose-Membran (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg), getränkt in Blotpuffer
- drei Lagen Whatmann® 3MM Filterpapier, getränkt in Blotpuffer
- ein Kunststoff-Schwamm

Der Transfer erfolgt in einer Mini Trans Blot Apparatur (Bio-Rad, München) für 60 min bei 400 mA auf Eis.

#### **2.3.5.2 Ponceau-Färbung von Proteinen**

Um den Erfolg des Proteintransfers auf die Membran zu überprüfen, kann die Membran mit Ponceau S (0,2% (w/v) in 0,3% (v/v) Trichloressigsäure) reversibel angefärbt werden. Das Färben erfolgt durch leichtes Schwenken der Membran für 1 min in Ponceau-Lösung. Durch dreimaliges Waschen in ddH<sub>2</sub>O wird der Membranhintergrund entfärbt und die transferierten Proteine werden sichtbar. Jetzt können die Banden des Proteinmarkers mit einem Kugelschreiber auf der Membran markiert werden. Die Färbung der Proteine verschwindet durch Waschen in TBS.

#### **2.3.5.3 Immundetektion von immobilisierten Proteinen**

Auf Nitrozellulose übertragenene Proteine können indirekt durch enzymgekoppelte Antikörperreaktionen nachgewiesen werden. Die Membranen werden dabei zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert, der spezifisch gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist. An diesen Primärantikörper bindet ein zweiter Antikörper aus einer anderen Spezies, der mit Meerrettich-Peroxidase (HRP - horse radish peroxidase) konjugiert ist. Die enzymatische Umsetzung eines luminogenen Substrates durch die Peroxidase führt an der Stelle, an der der Sekundärantikörper auf der Membran gebunden ist, zu einer Lichtemission, die mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

Im einzelnen werden folgende Schritte durchgeführt:

1. Blocken der Membran mit Blotto (5% Magermilchpulver in PBS)
2. Inkubation mit primärem Antikörper in Blotto für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C



3. Membran 3x für 10 min in TBS-T unter Schütteln waschen.
4. Inkubation mit sekundärem Antikörper in Blotto für 1 h bei RT
5. Membran 3x 10 min in TBS-T unter Schütteln waschen.
6. Membran kurz trocknen
7. ECL-Färbung und Entwicklung

Die Membran wurde für 1 min mit 4 bis 8 ml frisch angesetztem ECL<sup>TM</sup>- Reagenz (1 Vol Lsg.I + 1 Vol Lsg. II) überschichtet. Die überschüssige Flüssigkeit wird durch kurzes Auflegen eines Whatman® 3MM-Filterpapiers entfernt, die Membran in Folie eingehüllt und in einer Filmkassette fixiert. Die Exposition eines Röntgenfilms erfolgt für eine Dauer von 5 s bis 10 Minuten.

Tabelle der im Western Blot eingesetzten Antikörper:

Antikörper	gegen	Verdünnung
Kaninchen-Serum, 33/96	mLI-Cadherin	1:2000
Kaninchen-Serum, 09/98	mKsp-Cadherin	1:2000
mAb DECMA I (Sigma, Taufkirchen)	mE-Cadherin	1:1000
pAb aus Kaninchen (Sigma, Taufkirchen)	Aktin	1:1000
pAb aus Ziege (Santa Cruz, USA)	$\gamma$ Tubulin	1:1000
pAb aus Kaninchen (Sigma, Taufkirchen)	$\alpha$ -Catenin	1:2000
pAb aus Kaninchen (Sigma, Taufkirchen)	$\beta$ -Catenin	1:2000
Esel-anti-Ziege pAb (HRP-gekoppelt; Dianova)	Ziegen-IgG	1:5000
Kaninchen-anti-Ratte pAb (HRP-gekoppelt; Dako)	Ratten IgG	1:5000
Schwein-anti-Kaninchen pAb (HRP-gekoppelt; Dako)	Kaninchen IgG	1:5000

## 2.3.6 Immunpräzipitation

### 2.3.6.1 Präzipitation der Fc-Fusionsproteine mittels Protein A-Sepharose

Protein A aus *S. aureus* bindet Antikörper reversibel über deren Fc-Anteil (Ey et al., 1978). Da es sich bei dem C-Terminus des aufzureinigenden chimären Proteins um den humanen IgG-Fc-Teil handelt, läßt sich das Fusionsprotein mittels Protein A-Sepharose präzipitieren und einer SDS-PAGE unterziehen. Hierdurch kann man das chimäre Protein auf seine Unversehrtheit bezüglich des Molekulargewichts und des N- und C-Terminus untersuchen.

Negativkontrolle: 500  $\mu$ l konditioniertes Medium von CHO-Zellen (DMEM/0,5% FKS)

Positivkontrolle: definierte Menge humanes IgG oder bereits aufgereinigtes LI-Fc

#### Durchführung:

1. 500  $\mu$ l Zellkulturüberstand zu 50  $\mu$ g Protein A-Sepharose geben
2. 1 h bei 4°C überkopf rotieren
3. Sepharose für 1 min und 1000 x g bei 4°C pelletieren und Überstand verwerfen
5. Pellet 3x waschen (1x mit PBS + PIC und 2x mit TBS + PIC, pH 8,0)

6. Überstand vollständig entfernen
7. Pellet mit 20  $\mu$ l Laemmli-Puffer versetzen und für 5 min bei 96°C aufkochen
8. Probe kurz pelletieren und Überstand für die SDS-PAGE einsetzen

### ***2.3.6.2 Koimmunpräzipitation aus eukaryonten Zellen***

Zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktion dient die Koimmunopräzipitation (Firestone and Winguth, 1990). Hierbei wird mittels eines Antikörpers über Protein A-Sepharose das jeweilige Antigen aus einer Proteinlösung (z.B. Zell-Lysat) isoliert. Zusätzlich zum Antigen selbst können unter geeigneten Bedingungen auch Bindungspartner des Antigens präzipitiert werden und somit die Interaktion von Proteinen nachgewiesen werden. Als Kontrollen werden unspezifische Antikörper verwendet und aus Zell-Lysaten präzipitiert, die das Antigen nicht enthalten.

#### Durchführung:

1. Zellen auf einer 10 cm-Zellkulturschale subkonfluent wachsen lassen
2. Medium abnehmen und 2x mit eiskaltem PBS waschen
3. 1 ml IP-Lysis Puffer zu den Zellen geben und für 1 h bei 4°C unter Schwenken inkubieren
4. 2,5 mg Protein A-Sepharose pro Probe in IP-Lysis Puffer für 20 min quellen lassen und 2x mit IP-Lysis Puffer waschen
5. Protein A-Sepharose in 50  $\mu$ l IP-Lysis Puffer pro Probe resuspendieren
6. Zellen abschaben und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis überführen und für 15 min unter Schütteln bei 4°C inkubieren
7. Proben bei 20 000 x g und 4°C für 10 min abzentrifugieren und den Überstand in neues Gefäß auf Eis überführen.
8. Zum Überstand 2  $\mu$ l Antikörper und 50  $\mu$ l Protein A Sepharose geben
9. Proben bei 4°C für 1 h oder über Nacht inkubieren
10. Protein A-Sepharose bei 4°C und 20 000 x g für 45 s abzentrifugieren und Überstand mit einer Hamilton®-Dosierspritze vorsichtig abnehmen und aufbewahren
11. 1 ml IP-Lysis Puffer hinzugeben und Pellet resuspendieren
12. Waschvorgang (10./11.) 3x wiederholen
13. IP-Lysis Puffer entfernen und Pellet in 60  $\mu$ l Laemmli-Puffer aufnehmen und für 5 min kochen
14. Abzentrifugieren und Überstand zur Gelelektrophorese verwenden

### **2.3.7 Aufreinigung von LI-Fc-Konstrukten aus Zellkulturüberständen**

Die Aufreinigung der Fusionsproteine basiert auf folgendem Protokoll:

"Construction and Purification of Adhesion Molecule Immunoglobulin Chimeric Proteins" von T. Moll und D. Vestweber (Moll and Vestweber, 1999) und wird im weiteren dargestellt.

#### ***2.3.7.1 ELISA zum Nachweis von LI-Fc-Konstrukten aus Zellkulturüberständen***

Zur Selektion der CHO-Zell-Klone, welche die chimären Proteine LI-Fc und  $\Delta$ 23LI-Fc exprimieren und in das Zellkulturmedium sekretieren, wird ein ELISA verwendet (Engvall and Perlman, 1971). Durch die Benutzung von Mikrotiterplatten kann eine große Anzahl von Klonen parallel getestet werden, die zuvor mittels Endpunktverdünnung (2.4.3.2) in Mikrotiterplatten subkloniert wurden.

Substrat:•**TMB-Lösung:**

240 mg TMB  
 +5 ml DMSO  
 +5 ml EtOH  
 (bei 4°C im dunkeln aufbewahren)

•**Gallatipuffer (0,2 M):**

42,03 g Zitronensäure-Monohydrat  
 auf 1 L ddH<sub>2</sub>O  
 pH 3,95 mit NaOH

•**Gebrauchslösung:**

6 ml Puffer + 10 µl Wasserstoffperoxid (30%)

Kurz vor Verwendung wird die TMB-Lösung 1:100 (60 µl auf 6 ml) in Gebrauchslösung verdünnt.

Antikörper:

- Kaninchen-anti-Mensch IgG (CH2-spezifisch); DAKO, A 0089, 1:3000 in PBS
- Ziege-anti-Mensch IgG (Fc-spezifisch), Peroxidase-gekoppelt; Sigma, A0170, 1:5000 in PBS/10% FKS

Durchführung:

1. ELISA-Mikrotiterplatte (96well MaxiSorp Immunoplate; Nunc GmbH, Wiesbaden, Germany) mit 0,1 ml Kaninchen-anti-Mensch IgG (5 µg/ml in PBS) pro Vertiefung beschichten und für 1 h bei 37°C oder über Nacht bei RT inkubieren.
2. Platte 3x mit 0,2 ml PBS waschen und dann mit 0,2 ml PBS/10% FKS für 1 h bei 37°C
3. Platte 1x mit 0,2 ml PBS pro well spülen und 0,1 ml Zellkultur-Überstand der transfizierten CHO-Klone hinzugeben und für 1 h bei RT inkubieren.
4. Platte 4x mit 0,2 ml PBS/0,1% Tween-20 je Vertiefung und weitere 2x mit PBS spülen.
5. Platte mit 0,1 ml Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Mensch IgG (1:5000 in PBS/10% FKS) pro Vertiefung für 1 h bei RT inkubieren.
6. Platte 4x mit 0,2 ml PBS/0,1% Tween-20 je well und weitere 2x mit PBS spülen.
7. TMB-Lösung 1:100 in Gallatipuffer-Gebrauchslösung (s.o.) verdünnen und mit jeweils 50 µl pro Vertiefung die Platte beschichten (Reaktion ist lichtempfindlich!).
8. Nach Erreichen der gewünschten Blaufärbung die Reaktion mit 50 µl 4 M Schwefelsäure je Vertiefung abstoppen (Gelbfärbung!).
9. Quantifizierung der Reaktion über ELISA-Reader (Dynatech; Guernsey, GB) bei 405 nm (Ref.: 630 nm); Programm: (c/revel/assay/hrpmw.asy)

Die Überstände von CHO-Klonen, die kein rekombinantes Protein exprimieren, dienen als Negativkontrolle. Klone, deren Überstände die höchsten Werten im ELISA liefern, also die größte Menge an rekombinantem Protein im Zellkulturüberstand aufweisen, werden auf größere Platten überführt und in mehreren Aliquots eingefroren. Zuvor werden diese noch mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western Blot auf das Vorhandensein und die korrekte Größe des chimären Proteins überprüft.

**2.3.7.2 Aufreinigung der LI-Fc-Konstrukte mittels Protein A-Sepharose**

Stabil transfizierte CHO-Zellen, welche die chimären Proteine LI-Fc oder Δ23LI-Fc exprimieren und sekretieren, werden auf DMEM mit 0,5% FKS konditioniert und auf 150 mm-Platten ausgesät. Zellkulturüberstände von konfluenten Zellen werden geerntet, bei 5000 rpm für 15 min zentrifugiert und die Überstände sterilfiltriert (0,22 µm Sterilfilter; Millipore). Die Zellkulturüberstände werden in 50 ml Plastikgefäßen gesammelt und mit je 250 µl Protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) in Waschpuffer (50% v/v) über Nacht bei 4°C unter Überkopf-Rotation

inkubiert. Danach wird die Protein A-Sepharose in einer Plastiksäule (Biorad, München) gesammelt, gewaschen und die Fusionsproteine eluiert.

<i>Waschpuffer:</i>	20 mM Tris/HCl-Puffer, 130 mM NaCl, pH 8,0
<i>Elutionspuffer 1:</i>	100 mM Glycinpuffer/HCl, pH 4,8 + PIC
<i>Elutionspuffer 2:</i>	100 mM Glycinpuffer/HCl, pH 2,9 + PIC
<i>Neutralisierungspuffer:</i>	1 M Tris-HCl, pH 9,0

Vom ersten Durchfluß des Zellkulturüberstandes über die Säule wird 1 ml zur Kontrolle der Säulenkapazität gesammelt. Das Waschen der Säule erfolgt mit einem Volumen von 10 ml; auch hier wird der erste Milliliter gesammelt. Danach werden je fünf 1 ml-Fractionen der Elutionspuffer gesammelt, wobei für jede Fraktion 50 µl Neutralisierungspuffer vorgelegt werden. Zum Schluß wird die Säule mit 10 ml Elutionspuffer 2 gereinigt und mit weiteren 10 ml Waschpuffer äquilibriert.

Von allen 1 ml-Fractionen wird mittels BCA-Assay der Proteingehalt bestimmt und die proteinhaltigen Fractionen im Coomassie-Gel überprüft.

Fractionen mit aufgereinigtem Fusionsprotein werden mit Hilfe von Centriprep™-Säulen (Amicon-Millipore, Eschborn) gemäß den Herstellerangaben aufkonzentriert und gleichzeitig in HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4) umgepuffert. Erneut wird der Proteingehalt bestimmt und die Unversehrtheit der Fusionsproteine im Coomassie-Gel kontrolliert. Aliquots der Proteine werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.3.8 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus der 7D-Cadherine

Zum immunologischen Nachweis der C-terminalen, zytoplasmatischen Domänen (CP) von LI- und Ksp-Cadherin aus Mensch (h) und Maus (m) werden polyklonale Antikörper gegen diese Domänen im Kaninchen hergestellt. Als Antigene dienen synthetische Peptide (s. unten). Diese Peptide wurden von Herrn Dr. Rackwitz aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Franke (DKFZ, Heidelberg) synthetisiert und aufgereinigt.

Synthetische Peptide zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern:

<b>mLI-CP:</b>	<b>CY</b> <i>I</i> RMRKDKVENPQSPENKPLRS
<b>hLI-CP:</b>	<b>CY</b> <i>I</i> RIKKDKGKDNVESAQASEVKPLRS
<b>mKsp-CP:</b>	<b>CY</b> <i>T</i> HLALARKDLDPADSVPLKAAV
<b>hKsp-CP:</b>	<b>CY</b> <i>T</i> HWTMSRKKDPDPADSVPLKATV

Das Cystein an Position 1 und das Tyrosin an Position 2 (fettgedruckt) kommen in der Natur in den jeweiligen Sequenzen nicht vor und dienen der gerichteten Kopplung der Peptide.

#### 2.3.8.1 KLH-Kopplung der synthetischen Peptide

Um eine hohe Antigenität der jeweiligen Peptide (mLI-CP, hLI-CP, mKsp-CP und hKsp-CP) zu erreichen, müssen diese an einen Träger gekoppelt werden. Als Träger dient das Glykoprotein KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin), welches aufgrund seines hohen Molekulargewichts (450 000 Dalton pro Monomer) und seiner starken Immunogenität besonders geeignet ist. Zur Kopplung der Peptide an KLH wird das "Imject® Maleimide Activated Mariculture KLH Kit" (Pierce; Weisskirchen) verwendet. Die Durchführung der Kopplung erfolgt laut Herstellerprotokoll und wird hier nur kurz beschrieben.

Jeweils 2 mg der Peptide werden in 300  $\mu$ l Konjugations-Puffer aufgenommen und mit 2 mg Träger-Protein (vorher in 200  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O lösen) vereinigt, gemischt und für 3 h bei RT inkubiert. Es folgt eine Aufreinigung des Konjugats mittels Gelfiltration (Säulen im Kit enthalten) und eine Proteinbestimmung (BCA-Assay) der Fraktionen. Die ersten zwei Fraktionen mit einem hohen Proteingehalt werden vereint und bei 4°C gelagert.

Die Peptid/Träger-Konjugate haben folgende Konzentrationen:

mLI-CP-KLH :	1,2 mg/ml
hLI-CP-KLH:	1,5 mg/ml
mKsp-CP-KLH:	1,2 mg/ml
hKsp-CP-KLH:	1,3 mg/ml

### 2.3.8.2 Immunisierung von Kaninchen

Die Kaninchen wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung des Forschungshauses (Charité, Campus Virchow-Klinik) gehalten. Die Narkotisierung und Immunisierung der Kaninchen erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Wiebke Wetzel. (Antrags-Nr. des Tierexperimentes: H 0258/00)

Vor der ersten Immunisierung wird den Kaninchen 0,5-1,0 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Das hieraus gewonnene Serum dient später als Negativkontrolle (0-Serum).

Folgende Kaninchen werden zur Immunisierung verwendet :

<b>K1100:</b>	mKsp-CP	<b>K2001:</b>	mLI-CP
<b>K1200:</b>	hKsp-CP	<b>K2101:</b>	hLI-CP

Immunisierung:

Zu 100  $\mu$ l Peptid-Träger-Konjugat (120-150  $\mu$ g) werden 400  $\mu$ l isotonische Kochsalzlösung und 500  $\mu$ l komplettes Freund's Adjuvans (CFA) gegeben. Diese Mischung wird für 30 min bei RT geschüttelt. Zur Immunisierung werden den Kaninchen 4-5 Aliquots à 50  $\mu$ l subkutan injiziert. Diese Prozedur wird nach sechs Wochen wiederholt (2. Immunisierung), jedoch wird das Immunogen nun nicht mit komplettem sondern mit inkomplettem Freund's Adjuvans (IFA) angesetzt. Nach weiteren acht Wochen wird die Injektion wie bei der zweiten Immunisierung wiederholt (3. Immunisierung). Zum Test des Serums wird jedem Kaninchen 200  $\mu$ l Blut aus der Ohrvene entnommen. Zum Test der 3. Immunisierung werden nach weiteren sechs Wochen Blutproben aus der Ohrvene entnommen. Nach positivem Test der Seren werden den Kaninchen im Abstand von zehn Wochen durch Herzpunktion größere Mengen (bis zu 20 ml) Blut entnommen. Die Herzpunktion wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. med. vet. Große-Siestrup durchgeführt.

Zum Test der Antikörperantwort auf ihre Sensitivität und Spezifität werden Tüpfelblots mit den zur Immunisierung eingesetzten Peptiden und Immunoblots mit Zell- und Gewebelysaten durchgeführt. Die jeweiligen Antiseren wiesen in einer Verdünnung von 1:2000 eine spezifische Bande in Zell- und Gewebelysaten nach. Da die Herstellung der Antiseren nicht zentrales Thema der Arbeit ist, wird hier auf eine Darstellung der Antiserentests verzichtet.

## **2.4 Zellbiologische und immunhistologische Methoden**

### **2.4.1 Zellkultur von eukaryonten Zellen**

Die Kultivierung der eukaryonten Zelllinien erfolgt generell bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's MEM-Medium (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 4,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1,028 g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin; Zusatz von 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FKS (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) in 10 cm-Zellkulturschalen. Sind die Zellen konfluent gewachsen, so werden sie einmal mit 8 ml PBS<sup>-</sup> (pH 7,4) gewaschen und durch einminütige Inkubation mit 1,5 ml T/E-Lösung (PBS, pH 7,4; 0,3% (w/v) Trypsin; 0,125% (w/v) L-Glucose; 0,125% (w/v) EDTA; 0,09% (w/v) Natriumcarbonat) abgelöst. Durch Auf- und Abziehen in der Pipette werden die Zellen vereinzelt und in einer geeigneten Verdünnung mit frischem Medium wieder ausgesät.

*Zellspezifische Änderungen in obigem Protokoll:*

Die mit den Cadherin-Konstrukten stabil transfizierten CHO-Zellen (CHOmKsp, CHOmLI, CHOmE, CHO-LILIE und CHO-EELI) werden in DMEM+10 % (v/v) FKS mit zusätzlich 250 µg/ml G418 (Calbiochem, Bad Soden) kultiviert.

Für die Aufreinigung der Fc-Fusionsproteine (2.3.7) aus Zellkulturüberständen werden die stabil transfizierten CHO-Zellen (CHOmLI-Fc, CHOHLI-Fc und CHO-Δ23LI-Fc) auf DMEM + 250 µg/ml G418 + 0,5% (v/v) FKS konditioniert, um die Mengen an bovinen Antikörpern in den Zellkulturüberständen zu reduzieren.

#### **2.4.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm-Zellkulturschale (etwa 1 x 10<sup>7</sup> Zellen) werden mit T/E-Lösung (s.o.) abgelöst, für 5 min bei 200 x g abzentrifugiert und in 1 ml Einfriermedium (DMEM; 10% (v/v) DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen überführt, für 1 h auf Eis und anschließend in einem Styroporbehälter über Nacht langsam auf -80°C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff, in dem die Zellen über Jahre verbleiben können.

Zur Reaktivierung werden die Zellen im Kryoröhrchen rasch in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und in 10 ml DMEM überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm/200 x g werden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wird noch zweimal wiederholt, um das aus dem Einfriermedium stammende DMSO herauszuwaschen, dann werden die Zellen in einer Kulturschale ausgesät. Nach einem Tag in Kultur wird nochmals das Medium gewechselt.

### **2.4.2 Transfektion von CHO-Zellen**

Die CHO-Zellen werden 1-2 Tage vor der Transfektion so ausgesät, daß sie am Tage der Transfektion etwa zu 80% konfluent gewachsen sind. Die Transfektion erfolgt mit dem GeneJammer<sup>TM</sup>-Transfektions-Reagenz (Stratagene, Heidelberg). Zur Kontrolle wird eine Schale mit pEGFP transfiziert, um den Erfolg der Transfektion nach 1-2 Tagen im Fluoreszenzmikroskop abschätzen zu können. Die Selektion positiver Transfektanten erfolgt durch Kotransfektion des Plasmids pLXRN, welches eine Neomycin-Resistenz codiert, im molaren Verhältnis von 1:10 gegenüber dem Expressions-Plasmid. Für die Transfektion wurden alle verwendeten Plasmide durch Restriktionsendonuklease-Verdau linearisiert.

Die Angaben im folgenden Protokoll beziehen sich auf eine 6 cm-Schale, die in Klammern auf eine 10 cm-Schale.

Durchführung:

1. 238  $\mu$ l (726  $\mu$ l) DMEM (serum- und antibiotikafrei) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorlegen
2. 12  $\mu$ l (24  $\mu$ l) GeneJammer™-Transfektions-Reagenz direkt in das DMEM geben und mischen
3. 5-10 min bei RT stehen lassen
4. 2  $\mu$ g (4  $\mu$ g) DNA dazugeben und mischen
5. 5-10 min bei RT stehen lassen
6. Zellen mit 2,25 ml (5,75 ml) frischem DMEM (10% FKS, P/S) versetzen
7. Transfektions-Mix tropfenweise auf die Zellen geben und Schale vorsichtig mischen
8. Schale für 3 h im Brutschrank inkubieren
9. Schale mit 2,5 ml (6 ml) DMEM (10% FKS, P/S) versetzen und über Nacht im Brutschrank inkubieren
10. Wechsel des Mediums am folgenden Tag

Nach 2 Tagen werden die transfizierten Zellen in Selektionsmedium (DMEM, 10% FKS, P/S mit 250  $\mu$ g/ml G418) auf 15 cm-Platten überführt und für 2-3 Wochen selektioniert, wobei alle 2 Tage das Selektionsmedium erneuert wird.

### **2.4.3 Subklonierung von transfizierten Zellen**

#### ***2.4.3.1 Klonierung mit Klonierungsringen***

Nach 2-3 Wochen im Selektionsmedium (250  $\mu$ g G418/ml) sind die nicht-transfizierten Zellen abgestorben und vereinzelt wachsen G418-resistente Klone zu Zellhaufen heran. Diese Zellhaufen werden auf der Unterseite der Kulturschale mit einem Stift markiert und unter einem Mikroskop wird das Übereinstimmen der Position des Zellhaufens mit der jeweiligen Markierung kontrolliert. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und trocken gezogen. Auf die markierten Positionen werden Klonierungsringe (Durchmesser von 10 mm), deren unterer Rand mit Silikon überzogen ist, aufgesetzt und leicht angedrückt. Die Schale und die Klonierungsringe werden nun wieder mit Selektionsmedium gefüllt und so lange kultiviert bis die Klone die Klonierungsringe ausfüllen. Sodann werden die Klone jeweils in zwei Vertiefungen einer "24well-Schale" überführt, wobei eine Vertiefung dem Weiterführen des Klons dient und die Zellen der anderen Vertiefung zum Test auf Expression im Western Blot verwendet werden. Mindestens drei positive Primärklone werden in gleicherweise nochmals subkloniert.

#### ***2.4.3.2 Klonierung durch Endpunktverdünnung***

Lassen sich positive Klone durch einen ELISA identifizieren, so wird eine Klonierung durch Endpunktverdünnung ("limiting dilution"; (Coller and Coller, 1983)) durchgeführt. Hierbei werden die Zellen abgelöst und eine Konzentration von 5 Zellen/ml Selektionsmedium eingestellt. Dann werden 200  $\mu$ l pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Schale wird für 16 Stunden kultiviert. Anschließend werden die Vertiefungen markiert, die tatsächlich nur 1 Zelle enthalten und weiterhin kultiviert. Sobald die Klone die Vertiefung ausfüllen, werden sie hinsichtlich ihrer Expression im ELISA getestet. Auch hier werden von mindestens drei positiven Primärklonen weitere Subklone auf gleiche Weise hergestellt.

#### 2.4.4 Indirekte Immunfluoreszenz an adhärennten Zellen

Pro Vertiefung (well) einer 24well-Platte wird vor dem Aussäen der Zellen ein steriles Deckgläschen gelegt. Die zu untersuchenden Zellen werden vereinzelt, die Zellzahl bestimmt und  $2 \times 10^5$  Zellen werden je Vertiefung eingesät. Sobald die Zellen konfluent gewachsen sind, werden sie zweimal mit eiskaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen, mit 2% (v/v) Formaldehyd (Paraformaldehyd) in PBS<sup>++</sup> + 0,1% TritonX-100 für 20 min bei RT oder für 10 min mit eiskaltem Methanol (100%) bei -20°C fixiert. Zum Entfernen des Fixativs wird dreimal mit je 500  $\mu$ l eiskaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen. Es folgt eine Blockierung für 45 min bei RT mit je 500  $\mu$ l PBS<sup>++</sup>/1% (v/v) Ziegen Serum (NGS; Dianova). Optimal zum Blockieren ist die Verwendung eines Serums derjenigen Spezies, aus welcher der jeweilige Sekundärantikörper stammt.

Nun werden die Deckgläschen vorsichtig mit einer umgebogenen Kanüle und einer Pinzette aus der Multiwell-Platte genommen und in eine feuchte Kammer (Metallkassette mit in PBS<sup>++</sup> getränkten Papiertüchern) überführt. Die Inkubation mit 100  $\mu$ l Primärantikörperlösung (Antikörper verdünnt in PBS<sup>++</sup>/1% NGS) pro Deckgläschen erfolgt für 60 bis 90 min bei RT in der verschlossenen Kammer. Es folgen drei Waschschrte von 5 min in PBS<sup>++</sup>. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgt durch die Bindung eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers. Der jeweilige Sekundärantikörper wird in PBS<sup>++</sup>/1% NGS verdünnt und davon je 100  $\mu$ l auf die Deckgläschen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde werden die Deckgläschen wiederum 3 x für 5 min in PBS<sup>++</sup> gewaschen. Die Deckgläschen werden vorsichtig von der Flüssigkeit befreit und mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) auf einen Objektträger gelegt. Zum Aushärten des Einbettmediums werden die Deckgläschen über Nacht abgedunkelt bei RT gelagert und dann werden die Ränder der Deckgläschen mit Nagellack abgedichtet. Nun können die Präparate für mehrer Monate bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

Tabelle mit Antikörperverdünnungen für die Immunfluoreszenz

<b>Primärantikörper</b>	<b>gegen</b>	<b>Verdünnung</b>
Kaninchen-Serum, 33/96	mLI-Cadherin	1:400
Kaninchen-Serum 09/98	mKsp-Cadherin	1:400
Kaninchen-Serum 20/01	mLI-Cadherin-CP	1:400
mAb DECMA I (Sigma)	mE-Cadherin	1:300
pAb aus Kaninchen (Sigma, Taufkirchen)	$\alpha$ -Catenin	1:300
pAb aus Kaninchen (Sigma, Taufkirchen)	$\beta$ -Catenin	1:400
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>gegen</b>	<b>Verdünnung</b>
pAb aus Ziege, Alexa 488 (Molecular Probes, Leiden)	Kaninchen	1:400
pAb aus Kaninchen, Alexa 594 (Molecular Probes)	Ratte	1:300



## 2.5 Assays zur Untersuchung der Bindungseigenschaften von 7D-Cadherinen

### 2.5.1 Zellaggregations-Assay

#### 2.5.1.1 Aggregationsassay im hängenden Tropfen

Der Aggregationsassay im hängenden Tropfen (hanging drop assay) basiert auf Potter and Morris (Potter and Morris, 1985) und wurde von Redfield *et al.* (Redfield *et al.*, 1997) für N-Cadherin exprimierende Zellen verwendet. Hier wird der Assay wie folgt abgewandelt und quantifiziert.

1. Zellen mit Trypsin/EDTA von der Platte abnehmen und vereinzeln
2. Zellkonzentration auf  $1 \times 10^5$  Zellen/ml DMEM+10% FKS einstellen
3. 10 cm Zellkulturschale mit 8 ml PBS füllen
4. 10  $\mu$ l-Tropfen der Zellen auf die Unterseite des Zellkulturschalendeckels pipettieren
5. Deckel auf die Zellkulturschale setzen und Schale im Brutschrank für 15 min inkubieren
6. 3 Tropfen werden nach 15 min (N0) fotografiert (10x-Objektiv)
7. Inkubation der Zellen für 16 h (Nt) im Brutschrank
8. Fotografieren der gleichen Tropfen wie bei N0

Nun werden die Partikel bei N0 und Nt ausgezählt. Hierbei werden Partikel bestehend aus bis zu vier Einzelzellen als zufällige Ansammlungen gewertet und als vier Einzelpartikel gezählt. Aggregate mit fünf und mehr Einzelzellen werden als ein Partikel gezählt.

Die Vitalität der Zellen wurde mittels Trypanblau-Färbung überprüft und lag bei allen ausgewerteten Experimenten bei über 95 %. Die Auswertung erfolgt nach Nagafuchi und Takeichi (Nagafuchi and Takeichi, 1988) mit der Formel:  $(N0-Nt)/N0$

Diese Formel gibt den Aggregations-Index an.

Alternativ wird der Assay in DMEM+10% FKS mit Zusatz von 2 mM EGTA oder 50  $\mu$ g/ml IgG-gereinigtes Antikörperserum bzw. Normalserum aus dem Kaninchen durchgeführt.

#### 2.5.1.2 Schüttelassay

Der Schüttelassay basiert auf einer abgewandelten Methode von Ozawa und Kemler (Ozawa *et al.*, 1990b), wobei die Zellen vereinzelt und einer horizontalen Rotation unterworfen werden. Dies soll die Wahrscheinlichkeit der Zell-Zell-Interaktion erhöhen. Für den Schüttelassay werden aus dem gleichen Ansatz wie für den "hanging drop"-Assay 200  $\mu$ l der Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/ml DMEM+10% FKS) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 16 h in einem Thermomixer "comfort" (Eppendorf, Hamburg) bei 300 rpm und 37°C inkubiert. Direkt nach dem Überführen in die Reaktionsgefäße und nach 16 h werden mindestens drei 10  $\mu$ l-Aliquots je Ansatz auf die Unterseite eines Petrischalen-Deckels pipettiert, der Deckel auf die Petrischale gesetzt und für 15 min im Brutschrank inkubiert. Auch hier wurde die Vitalität der Zellen mittels Trypanblau-Färbung überprüft und lag bei allen ausgewerteten Experimenten bei über 95 %. Die fotografische Auswertung erfolgt wie unter 2.5.1.1.

## 2.5.2 Bindungsstudien von Cadherin-beschichteten Mikroperlen mittels Laserpinzette

Die Untersuchungen mit der Laserpinzette von Cadherin-beschichteten Dynabeads™ (DynaL Biotech; Oslo, Norwegen) wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Drenckhahn (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg) gemeinsam mit Dr. Baumgartner durchgeführt. Bei den Dynabeads™ handelt es sich um paramagnetische Polystyren-Mikroperlen (Durchmesser von 2,7  $\mu\text{m}$ ), die sich mittels eines Magnetständers aus Lösungen abtrennen lassen und somit ein einfaches Waschen und Umpuffern der Mikroperlen gewährleisten. Die Dynabeads™ sind bereits mit Protein A beschichtet, so daß eine gerichtete Kopplung von Cadherin-Fc-Konstrukten über den Fc-Anteil möglich ist.

### 2.5.2.1 Beschichtung von Protein A-Mikroperlen mit Cadherin-Fc-Konstrukten

#### *Waschen der Mikroperlen*

- Dynabeads vortexen
- 10  $\mu\text{l}$  Dynabeads ( $2 \times 10^9$  Mikroperlen /ml) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettieren
- Magnet, Überstand verwerfen
- 3x mit 100  $\mu\text{l}$  0,1 M Na-Phosphat (pH 8,1) waschen, Magnet

#### *Inkubation mit Cadherin-Fc-Konstrukt*

- 10  $\mu\text{g}$  des Cadherin-Fc-Konstruktes im Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  mit gleichen Teilen 0,5 M Na-Phosphat-Puffer (pH 8,1) und HBSS mischen
- Zugabe des Proteins zu den Mikroperlen
- Inkubation für 30 min bei RT unter langsamem Drehen
- 3x mit 100  $\mu\text{l}$  0,1M Na-Phosphat-Puffer (pH 8,1) waschen, Magnet

#### *Quervernetzung*

- 3x mit 100  $\mu\text{l}$  0,2 M Triethanolamin (pH 9,0) waschen, Magnet
- Inkubation für 45 min in 100  $\mu\text{l}$  Triethanolamin + 0,54 mg DMP
- 2x mit 100  $\mu\text{l}$  Ethanolamin (pH 8,0) waschen, Magnet
- Inkubation für 2 h in 100  $\mu\text{l}$  Ethanolamin (pH 8,0)
- 3x mit HBSS waschen, Magnet
- Mikroperlen zum Schluß in 100  $\mu\text{l}$  HBSS aufnehmen

Die Mikroperlen nach der Beschichtung nicht stark schütteln oder zentrifugieren und bei allen Waschrufen den Magneten verwenden.

Die Bindung der Cadherin-Konstrukte wird im ELISA mittels der enzymatisch induzierten Farbreaktion und der sich anschließenden Messung der Extinktion semiquantitativ nachgewiesen.

Die Aufbewahrung erfolgt bei 4°C auf dem Überkopf-Schüttler unter steter Rotation.

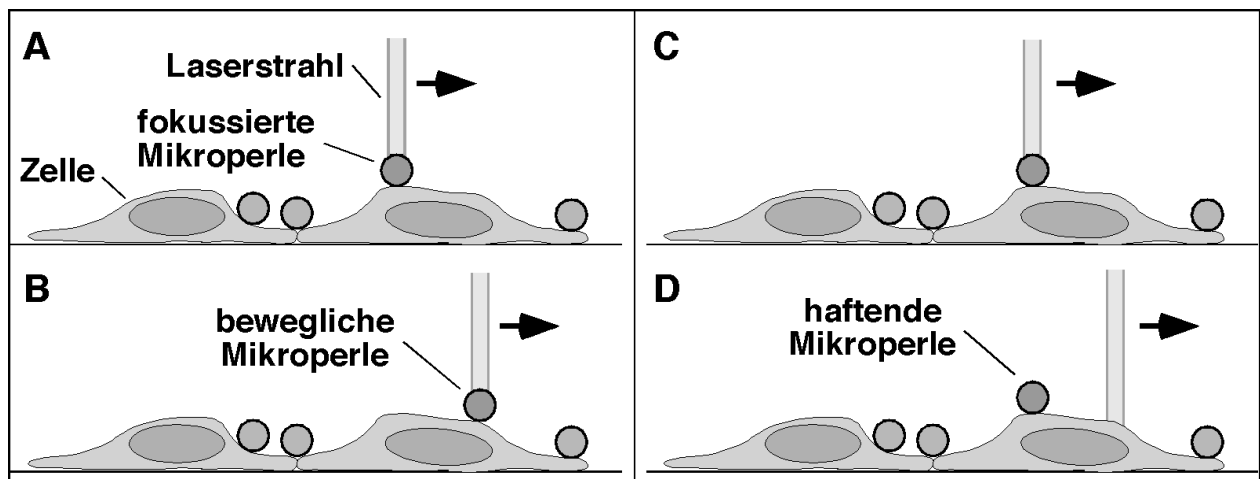
### 2.5.2.2 Herstellung konfluent bewachsener Deckgläser

Deckgläser mit einem Durchmesser von 22 mm werden einmal in ddH<sub>2</sub>O mit einer Spatelspitze EDTA und zweimal nur mit ddH<sub>2</sub>O aufgeköcht. Die Gläser werden für 30 min mit einer 0,5% Gelatine in ddH<sub>2</sub>O unter sterilen Bedingungen inkubiert. Nun werden für weitere 30 min die Gläser mit der Gelatine in 2% Glutaraldehyd in PBS inkubiert (Quervernetzung der Gelatine), die Gläser dreimal für 10 min in PBS gewaschen und in PBS mit 10000 U/ml Penicillin-Streptomycin bei 4°C aufbewahrt.

Nach mehrmaligem Waschen der Gläser in PBS können auf diesen die stabil transfizierten CHO-Zellen in DMEM/10% FKS ausgesät und bis zur Konfluenz wachsen gelassen werden. Konfluent bewachsene Deckgläser werden für Versuche mit der Laserpinzette verwendet.

### 2.5.2.3 Aufbau der Laserpinzette

Die Laserpinzette besteht aus einem Nd:YAG Laser mit einer maximalen Leistung von 200 mW bei einer Wellenlänge von 1024 nm (Fa. Laser 2000, Wessling), der mit dem Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Oberkochen) kombiniert wurde. Konfluent bewachsene Deckgläser werden mit dem Objektiv Plan-Neofluar 63x/1,25-Öl untersucht und die Bilder mit der CCD-Kamera SSC-M320 CE (Sony, Japan) auf den Video-Monitor VM-122 OE (Hitachi, Westwood, USA) projiziert. Die Zellen auf den Deckgläsern werden mit 200-300  $\mu$ l Medium überschichtet und 3  $\mu$ l der beschichteten Dynabeads (s. 2.5.2.1) werden hinzupipettiert. Nach dem Absinken der Dynabeads (nach etwa 10-15 min) wird der Laser aktiviert, um einzelne Dynabeads manuell mit dem Laserstrahl fokussieren zu können. Abb. 5 zeigt schematisch das Verhalten von beweglichen (A und B) und von haftenden Mikroperlen (C und D) im Laserpinzetten-Experiment.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Manipulation von Mikroperlen mit der Laserpinzette.** Bei einer konstanten Laserleistung von 30 mW werden einzelne Mikroperlen in den Laserstrahl fokussiert und ihr Bindungsverhalten analysiert. Bewegliche Mikroperlen lassen sich mit dem Laserstrahl von der Zelle entfernen (A, B), während haftende Mikroperlen sich der Manipulation widersetzen (C, D). Zur Quantifizierung des Bindungsverhaltens von LI-Fc-beschichteten Mikroperlen werden mindestens 200 Mikroperlen pro Experiment analysiert.

Pro Deckglas wird das Bindungsverhalten von mindestens 200 Dynabeads bei einer Laserleistung von 30 mW untersucht. Die Bindungseigenschaften werden durch den prozentualen Anteil der Mikroperlen, die sich bei gegebener Laserleistung nicht von der Zelloberfläche bewegen ließen, quantifiziert.

#### 2.5.2.4 Einstellung der extrazellulären $Ca^{2+}$ -Konzentration

Zur Messung des Bindungsverhaltens der Mikroperlen bei unterschiedlichen extrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen werden diese durch Zugabe einer 100 mM Stammlösung EGTA zum DMEM (1,8 mM  $CaCl_2$ ) auf die zu untersuchenden Werte gesenkt (0,01/0,1/0,3/0,5/1,0 mM). Der Nachweis der freien  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Medium erfolgt bei RT mit einer  $Ca^{2+}$ -sensitiven Meßelektrode (Fa. Ingold, Steinbach/Taunus). Die mit CHO-Zellen bewachsenen Deckgläschen werden dreimal mit 1 ml des jeweiligen  $Ca^{2+}$ -reduzierten DMEM gewaschen. Schließlich werden 100-200  $\mu$ l  $Ca^{2+}$ -reduziertes DMEM, in denen sich 3  $\mu$ l der beschichteten Mikroperlen befinden, auf die Zellen gegeben. Die Untersuchung des Bindungsverhaltens erfolgt wie unter 2.5.2.3 beschrieben.

#### 2.5.3 Beschichtung von Latex-Mikroperlen mit LI-Cadherin-Fc-Konstrukten

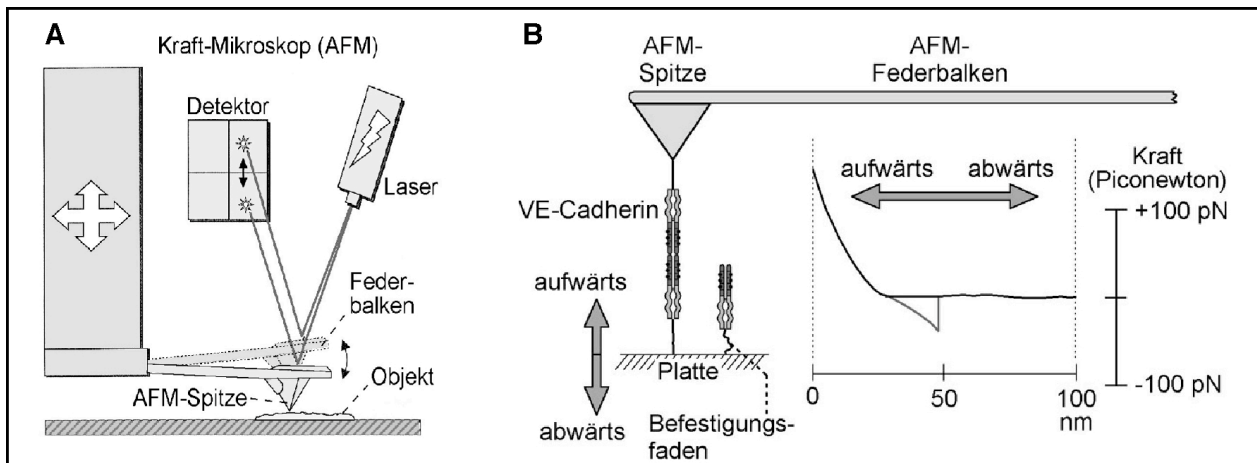
Aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz der Dynabeads™ sind diese für die Immunfluoreszenz ungeeignet. Zu diesem Zweck werden Latex-Mikroperlen von Interfacial Dynamics (Portland, OR, USA) verwendet. Diese Mikroperlen tragen Sulfat-Gruppen auf ihrer Oberfläche, welche eine passive Anreicherung und Kopplung der Proteine auf der Oberfläche ermöglicht.

1. 125  $\mu$ l der Latexperlen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführen (nicht vortexen!)
2. 1 ml 25 mM MES-Puffer (pH 6,0) hinzugeben und vorsichtig mischen
3. Zentrifugation bei 3000 g für 10 min
4. Überstand verwerfen und 1 ml MES-Puffer zu den Latexperlen geben, mischen
5. Zentrifugation bei 3000 g für 10 min
6. Überstand abnehmen und Pellet in 250  $\mu$ l MES-Puffer resuspendieren
7. 2,5  $\mu$ g LI-Fc in 250  $\mu$ l MES-Puffer lösen und zum Mikroperlen-Ansatz hinzugeben
8. Inkubation über Nacht auf dem Rotations-Schüttler bei RT
9. Zentrifugation bei 3000 g für 20 min, Überstand verwerfen
10. 3x mit PBS<sup>++</sup> waschen (3000 g, 10 min)
11. Mikroperlen in 600  $\mu$ l PBS<sup>++</sup>/2% BSA aufnehmen
12. Die Mikroperlen können für bis zu 5 Tagen bei 4°C auf dem Rad gelagert werden.

Zur Inkubation mit CHO-Zellen werden 20  $\mu$ l eines 1:2 Gemisches von LI-Fc beschichteten und unbeschichteten Mikroperlen auf CHO-Zellen gegeben, die am Tag zuvor in 24well-Schalen auf Deckgläschen zur Immunfluoreszenz ausgesät wurden. Die unbeschichteten Mikroperlen dienen zur Kontrolle im gleichen Inkubationsansatz. Nach einer Inkubation von 90 min im Brutschrank bei 37°C werden die Zellen mit den Mikroperlen für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie eingesetzt (2.4.4).

#### 2.5.4 Rasterkraftmikroskopie mit Cadherin-Fc-Konstrukten

Die Untersuchung von LI-Fc-Einzelmolekülen mittels Rasterkraftmikroskopie (Binnig and Quate, 1986) wurde gemeinsam mit Dr. Baumgartner in der Arbeitsgruppe von Prof. Drenckhahn (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg) durchgeführt. Für die Details der Technik und einen Überblick der Anwendungsgebiete sei das Buch "Atomic Force Microscopy for Biologists" von Morris, Kirby und Gunning (Morris et al., 1999) sowie die Übersichtsartikel von Engel *et al.* (Engel et al., 1999) als auch von Müller und Anderson (Müller, 2002) empfohlen. In Abb. 6 ist das Meßprinzip des AFM schematisch dargestellt.



**Abb. 6: Prinzip der Messung im Rasterkraftmikroskop (AFM).** Durch die Ablenkung eines Laserstrahls kann die Verformung des Federbalkens, welche durch die Interaktion der Sondenspitze (AFM-Spitze) mit dem Objekt ausgelöst wird, detektiert werden (A). Am Beispiel der Interaktion von VE-Cadherin-Fc Molekülen ist hier die Darstellung von Abrisskräften in den Kraft-Weg-Diagrammen verdeutlicht (B). VE-Cadherin-Fc wird sowohl an die AFM-Spitze als auch an die Oberfläche gekoppelt. Dann wird der Abstand zwischen Oberfläche und AFM-Spitze zyklisch verändert und Kraft-Weg-Kurven aufgezeichnet. Das Beispiel einer Kraft-Weg-Kurve zeigt genau ein Abriss-Ereignis, also das Lösen einer homotypischen Cadherin-Bindung. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Baumgartner zur Verfügung gestellt.

Die Maßeinheit des AFM ist ein extrem kleiner Federbalken (Cantilever), dessen Verformung durch die Ablenkung eines Laserstrahls verfolgt wird (6A). An der Unterseite des Federbalkens befindet sich eine Sondenspitze (AFM-Spitze), die den Kontakt mit dem zu untersuchenden Objekt herstellt. Da beim Abtasten auftretende laterale Kräfte biologische Proben zerstören können, wird meist im sogenannten "Tapping-Modus" gemessen. Hierbei wird der Federbalken zu Schwingungen nahe seiner Resonanzfrequenz angeregt.

Die Bindungskräfte von Einzelmolekül-Interaktionen werden über Dehnungs- und Abrisskräfte zwischen den Molekülen erfasst, die gerichtet zwischen Oberfläche und Cantilever aufgespannt sind, und in sogenannten Kraft-Weg-Diagrammen dargestellt (Abb. 6B).

#### 2.5.4.1 Messung der $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit der LI-Cadherin-Interaktion

Die Messungen erfolgen mit einem Bioscope Rasterkraftmikroskop, welches mit einer handelsüblichen Flußzelle ausgestattet ist und über einen "Nanoscope IIIa Controller" reguliert wird (Digital Instruments; Santa Barbara, CA, USA). LI-Fc-Moleküle werden, wie in Hinterdorfer *et al.* (Hinterdorfer *et al.*, 2000) beschrieben, über einen PEG-Anker an die  $Si_3N_4$ -Sondenspitze (Federkonstante von 0,3 N/m; Park Scientific; Sunnyvale, USA) und die  $SiOH$ -Oberfläche (Wacker, Burghausen) gekoppelt. Die Messungen erfolgen bei 2 Hz (600 nm/s) und einer Kontaktzeit von 0,3 s. Als Meßpuffer wird 10 mM HEPES, 150 mM NaCl (pH 7,4) mit verschiedenen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen verwendet. Kräfte zwischen LI-Fc Molekülen auf der Sondenspitze und der Oberfläche werden als Kraft-Weg-Diagramme aufgezeichnet (Baumgartner *et al.*, 2000b). Jeder Datenpunkt ist der Mittelwert der Bindungsaktivitäten aus mindestens 500 Kraft-Weg-Zyklen. Die Auswertung dieser Messungen erfolgt wie bereits beschrieben (Baumgartner *et al.*, 2000c), wobei die Bindungsaktivität als die Fläche zwischen der Kraft-Weg-Kurve und der Nulllinie (keine Interaktion) definiert ist.

#### 2.5.4.2 Ermittlung der Bindungsstärke und Lebensdauer der LI-Cadherin-Bindung

Zur Messung der Bindungsstärke wird der gleiche Aufbau wie unter 2.5.4.1 verwendet, allerdings wird die Abrißgeschwindigkeit variiert und die Messungen erfolgen in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7,4). Es wird bei Abrißgeschwindigkeiten von 150 nm/s (0,5 Hz bei einem Scanbereich von 300 nm), 300 nm/s (1 Hz), 600 nm/s (2 Hz), 1500 nm/s (5 Hz) und bei 3000 nm/s (10 Hz) gemessen. Die Kontaktzeit von 0,3 s bleibt konstant. Pro Datenpunkt werden auch hier mindestens 500 Kraft-Weg-Diagramme ausgewertet. Für die verschiedenen Abrißgeschwindigkeiten kann die Verteilungsdichte der Abrißkräfte dargestellt werden und somit die Position des Kraftmaximums bestimmt werden (Baumgartner and Drenckhahn, 2002c). Trägt man die Kraftmaxima gegen die Zuggeschwindigkeiten auf, kann man die Lebensdauer der Bindung (bei einer Kraft  $f=0$ ) extrapolieren (Baumgartner et al., 2000c). Dieses Modell beruht auf der Gleichung von Bell:

$$t_0 = t_0 \exp(-l_r f_u / k_B T),$$

wobei  $t_0$  die Lebensdauer der Bindung ohne äußere Krafteinwirkung,  $l_r$  die Abrißweite zwischen zwei adhärenenden Cadherinmolekülen,  $k_B$  die Boltzmann-Konstante,  $T$  die absolute Temperatur und  $f_u$  die Abrißkraft darstellt (Bell, 1978).

#### 2.5.5 Affinitätschromatographie zur Bestimmung der Affinitätskonstante von LI-Fc

Zur Analyse der Affinität von LI-Cadherin-Interaktionen wurde eine auf der Affinitätschromatographie basierende Methode angewendet, wie sie in Baumgartner and Drenckhahn zur Untersuchung von VE-Cadherin beschrieben wurde (Baumgartner and Drenckhahn, 2002b). CNBr-aktivierte Sepharose (100 mg; Sigma, Taufkirchen) wird in 10 ml einer 1 mM HCl-Lösung für 45 min bei 4°C zum Quellen inkubiert, bevor 1 ml der Sepharose in eine Plastik-Säule gegeben wird (Durchmesser von 5 mm). Die Sepharose wird zuerst mit 100 ml der 1 mM HCl-Lösung, dann mit 3 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Sodann wird die Säule mit 1 ml Kopplungspuffer (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 500 mM NaCl, pH 8,4) equilibriert und mit 1 ml Kopplungspuffer, der 0,61 mg LI-Fc und 0,6 mg BSA enthält, für 2 h bei RT unter vertikaler Rotation inkubiert (Effektiv an die Säule gebunden haben 0,46 mg LI-Fc und 0,45 mg BSA.). Danach wird die Säule zweimal mit 3 ml Kopplungspuffer und mit 300 ml Blockierungspuffer (200 mM Glyzin, pH 8,0) gewaschen. Zur Blockierung wird die Säule für 3 h bei RT in Blockierungspuffer inkubiert, bevor sie dreimal mit Acetatpuffer (100 mM Essigsäure, 500 mM NaCl, pH 4,5) gewaschen wird. Die Equilibrierung erfolgt mit 10 ml HBSS mit 2 mM Ca<sup>2+</sup> oder ohne Ca<sup>2+</sup>. Zur Interaktionsbestimmung werden 11 µl LI-Fc (1,7 mg/ml) in HBSS (mit oder ohne 2 mM EGTA) auf die Säule gegeben. Als Kontrolle wird die gleiche Menge VE-Fc über die LI-Fc-Säule mit und ohne Ca<sup>2+</sup> gegeben. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,09 ml/min werden 90 µl-Fraktionen gesammelt, je 30 µl einem Dot Blot unterzogen und die Menge von LI-Fc beziehungsweise VE-Fc pro Fraktion bestimmt. Zur Auswertung und Berechnung der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) wird auf Baumgartner und Drenckhahn verwiesen (Baumgartner and Drenckhahn, 2002b).