

5. Material

5.1 Geräte und Zubehör

- 80°C Tiefkühlschränke	Forma Scientific
Agarosegelkammern	BioRad
Brutschränke	Memmert
CO ₂ Inkubator	Nuaire US Autoflow Binder
Drehrad	Herolab
Durchflusszytometer	FACScalibur BD
Feinwaagen	Sartorius BP 310S Sartorius AC 210P Scaltec SP061
Geldokumentation	Herolab
Geltrockner	Savant stacked gel dryer SGD 300 Hoefer Slab Gel Dryer GD2000
Heizblöcke	Techne DB3
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5417R Eppendorf 5402
Kunststoffküvetten	Sarstedt
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop Zellkultur	Zeiss TELAVAL 31
Mikrowelle	Privileg 9029GD
N ₂ -Behälter	CRONOS, Messer Griesheim
Petrischalen	Peske Medizintechnik
pH-Meter	Knick
Photometer	Pharmacia Biotech GeneQuant II Pharmacia Biotech Novaspec II
Präzisionsküvetten (Quarzglas)	Hellma
Proteingelkammern	Biorad Mini Protean® II Cell
PVDF-Membran	Millipore
semi-dry blot	PHASE, Lübeck
Sequenzierautomat	Applied Biosystems 310
Spannungsquellen	Biorad Model 200/2.0 Power Supply ST305 Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS3500
Sterilbank	BDK (Sonnenbühl-Genkingen)
Szintillationszähler	Beckmann LS 6000LL
Thermocycler	Biometra T3
Thermomixer	Eppendorf 5436
Tischzentrifugen	Eppendorf 5416 IEC MicroMax
UV-Tisch	Biometra TI 2
Vortex	Heidolph Reax 2000
Warmluftschüttler	Infors HT
Wasserbäder	Haake F3 Julabo MP
Zellkulturschalen	TPP
Zentrifugen	Beckmann Avanti J-25 Beckmann J6-HC

5.2 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (München) bezogen.

17-AAG	Division of Cancer Treatment and Diagnosis, NCI, Rockville, USA
17-DMAG	Division of Cancer Treatment and Diagnosis, NCI
[32P]-dATP	NEN (Perkin Elmer), Rodgau-Jügesheim
[32P]-dCTP	NEN
[32P]- γ -ATP	Amersham Biosciences, Freiburg
[35S]-Methionin	Amersham Biosciences
ALLN	Calbiochem, USA
β -Glycerophosphat	Sigma
β -Mercaptoethanol	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bacto-Agar	BD, Heidelberg; Roth
Bacto-Hefeextrakt	Roth
Bacto-Tryptone	Roth
Bradford Reagenz	Biorad, USA
Bromphenolblau	Biorad
Complete Protease-Inhibitoren	Roche
Cycloheximid	Calbiochem
DMEM	PAA, Österreich
DMSO	Sigma
DNA-Marker	Invitrogen
dNTPs	Amersham Biosciences
DTT	Sigma
Ethidiumbromid	Roche
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, Heidelberg; PAA
Geldanamycin	Alexis, Grünberg
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Biosciences
Isopropyl-b-D-galactosid (IPTG)	Biomol, USA
Interleukin-1 β	Alexis
L-Glutamin	PAA
Lösungsmittel allgemein	Roth
MG-132	Calbiochem
Na-Pyruvat	PAA
NP-40	Fluka, Neu-Ulm
4 α -Porbol 12-myristate 13-acetate	Calbiochem
Pefabloc	Roche
Penicillin/Streptomycin	PAA
poly dIdC	Roche
Proteinmolekulargewichtsmarker	Biorad, MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-A-Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences
Protein-G-Sepharose	Amersham Biosciences
Radicalol	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
Röntgenfilmentwickler	Sigma

Röntgenfilmfixierer	Sigma
RPMI 1640	PAA
TEMED	Biorad
TNF α	Alexis, Biomol
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA
Tween 20	Sigma

5.3 Enzyme und Kits

AmpliTaq-DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v2.0/ v1.1	Applied Biosystems
DeepVent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Klenow-Polymerase	usb, USA
Pfu-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Random Prime DNA labelling system	Amersham Biosciences
Restriktionsendonukleasen	GibcoBRL Amersham Biosciences New England Biolabs
Shrimp Alkaline Phosphatase	usb
T4-DNA Ligase	usb
Phototype-HPR Western Detection System	New England Biolabs (NEB)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen

5.4 Bakterienstämme

<i>E.coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (π 80 <i>lacZ</i> Δ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> (Gibco)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ , <i>hsdS</i> , <i>gal</i> , <i>ompT</i> , r _B ⁻ , m _B ⁻ (Novagen)

5.5 Bakterienkulturmedien

LB	10 g/l Bacto tryptone, 5 g/l Bacto yeast extract, 5 g/l NaCl
LB-Agar	LB mit 15 g/l Agar
SOB	20 g/l Bacto tryptone, 5 g/l Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , pH 6,7-7

5.6 Zelllinien

HeLa	Humane Epithelzelllinie aus Zervixkarzinom
293	Humane Epithelzelllinie aus Nierengewebe, die mit Adenovirus 5 DNA transformiert wurde
COS-7	Affen-Nierenzelllinie
Namalwa	Humane B-Lymphozyten-Zelllinie aus Burkitt Lymphom
Reh	Humane leukämische Pre-B-Zelllinie
HDLM-2, KM-H2, L1236, L428, L540, L540Cy, L591	Humane Zelllinien aus Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen des Hodgkin-Lymphoms

5.7 Antikörper

Bcl-X _L	Transduction Laboratories, Heidelberg
Cdc37 (C-19)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Cdc37 (Kaninchen)	zur Verfügung gestellt von Emmanuel De Billy, Mailand
c-FLIP _{s/L} (Dave-2)	Alexis, Grünberg
c-myc (9E10)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
CyclinD2	BD Pharmingen, Heidelberg
flagM2	Sigma, München
HA (Y-11)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Hsp90 (H-114)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Hsp90 β (D-19)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Hsp90 α SPS771	Stressgen, USA
IκBα (C-21)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
IKKα	BD Pharmingen, Heidelberg
IKKβ	Biosource, USA
IKKβ	Cell Signaling, Frankfurt am Main
IKKγ (FL-419)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
JNK1	BD Pharmingen, Heidelberg
JunB (C-11)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
p65 (A)	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Phospho-IKK	Cell Signaling, Frankfurt am Main
RIP1	BD Pharmingen, Heidelberg
TNFα	BD Pharmingen, Heidelberg
TNFβ	BD Pharmingen, Heidelberg
Ubiquitin	Babco, USA

Sekundäre-Antikörper, gekoppelt mit Peroxidase (HRP) zur Detektion im Western Blot:

Anti-Kaninchen IgG	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-Maus IgG	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Anti-Ziege IgG	JacksonImmunoResearch, UK

5.8 Plasmide

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit verwendet:

flagCdc37 pCDNA3	humane Cdc37 cDNA, PCR-Amplifikation aus RZPD-Library-Klon IRAUp969B0131D6, Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> in pCDNA3 flag-Vektor
flagCdc37 Δ C2 pCDNA3	umfasst eine verkürzte Cdc37 cDNA (AS 1-164), PCR-Klonierung <i>EcoRI/XhoI</i> mit entsprechenden Primern
flagCdc37 Δ C4 pCDNA3	verkürzte Cdc37 cDNA (AS 1-222), Klonierung <i>EcoRI-blunt</i> (<i>MscI</i> in <i>EcoRV</i> -Schnittstelle) in pCDNA3 flag
flagCdc37 Δ N pCDNA3	Cdc37, AS 165-378, <i>EcoRI/XhoI</i> in pCDNA3 flag
flagCdc37 Δ N2 pCDNA3	Cdc37, AS 55-378, Klonierung <i>blunt BstUI</i> in <i>EcoRV/XhoI</i>
flagCdc37 Δ NC pCDNA3	Cdc37, AS 37-230, <i>SmaI</i> -Fragment in <i>EcoRV</i> -Schnittstelle
flagCdc37 S13A pCDNA3	Cdc37 mit Substitution Serin 13 zu Alanin, <i>EcoRI/XhoI</i> in pCDNA3 flag
flagIKK α pRK5	Tularik Inc., Plasmid 42, humane IKK α cDNA mit N-terminalem flag-Epitop-tag in pRK5-Vektor
flagIKK β pRK5	Tularik Inc., Plasmid 43, humane IKK β cDNA mit N-terminalem flag-Epitop-tag in pRK5-Vektor
flagIKK γ pCDNA3	S. Tegethoff, humane IKK γ cDNA mit N-terminalem flag-Epitop-tag in dem Vektor pCDNA3
HA-IKK β pRC β act	Dr. M. Karin, humane IKK β cDNA mit HA-Epitop-tag unter der Kontrolle des β -Actin-Promotors
mycCdc37 pRK5	siehe flag-Konstrukt, <i>SalI/NotI</i> in pRK5myc
mycCdc37 Δ C2 pRK5	siehe flag-Konstrukt, <i>SalI/NotI</i> in pRK5myc
mycCdc37 Δ N pRK5	siehe flag-Konstrukt, <i>SalI/NotI</i> in pRK5myc
mycIKK α pRK5	Tularik Inc., Plasmid 36, humane IKK α cDNA mit N-terminalem myc-Epitop-tag in pRK5-Vektor
mycIKK α K44A pRK5	Tularik Inc., Plasmid 39, mutierte, Kinase-inaktive IKK α cDNA
mycIKK β pRK5	Tularik Inc., Plasmid37, humane IKK β cDNA mit N-terminalem myc-Epitop-tag in pRK5-Vektor
mycIKK β K44A pRK5	Tularik Inc., Plasmid40, mutierte, Kinase-inaktive IKK β cDNA
GST-Cdc37 pGEX-6P1	humane Cdc37 cDNA, <i>EcoRI/XhoI</i> kloniert in pGEX-6P1
GST-Cdc37 Δ C2	siehe entsprechende pCDNA3-Konstrukte, in pGEX-6P1
GST-Cdc37 Δ N	
GST-Cdc37 S13A	
GST-I κ B α 1-53	E. Hatada

5.9 Rekombinante Proteine

IKK β exprimiert in Sf9-Zellen, gereinigt von R. Dettmer

5.10 Oligonukleotide

Sequenzierungsprimer:

T7-Primer: 5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'

Sp6-Primer: 5' -ATTTAGGTGACACTATAG-3'

pGEX-5'GST: 5' -GGCGACCATCCTCCAAAATCGG-3'

pGEX-3'rev : 5' -CCGAAACGCGCGAGGCAGATCG-3'

NF-κB-Oligonukleotid als Sonde für EMSA:

H-2K κB (aus dem MHC I-Promoter)

5' -GATCCAGGGCTGGGGATTCCCCATCTCCACAGG -3'

3' - GTCCCGACCCCTAAGGGGTAGAGGTGTCCCTAG-5'

AP-1-TRE-Oligonukleotid als Sonde für EMSA:

5' -AGCTAGCATGAGTCAGACAC -3'

3' - TCGTACTCAGTCTGTGTCTCGA-5'

Oct-1-Oligonukleotid als Sonde für EMSA:

aus dem humanen Histon H2B-Promotor

5' -GATCCTATAGAATCGCTTATGCAAATAAGTGAAGAGTTGG -3'

3' - GATATCTTAGCGAATACGTTTATTCACTTCTCAACCCTAG-5'

5.11 Puffer und Lösungen

2x HBS	280 mM NaCl, 25 mM HEPES, 1,2 mM Na ₂ HPO ₄
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄
TBE (10x)	0,5 M Tris, 0,5 M Borsäure, 10 mM EDTA
RIPA	50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, 10% Glycerin

6. Methoden

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Kultur adhärenter Zellen

HeLa-, COS7- und 293-Zellen wurden auf 60 mm oder 100 mm Zellkulturschalen mit DMEM (10% FCS) im CO₂-Inkubator bei einer Luftfeuchtigkeit von 90% und 5% CO₂ (v/v) kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte jeden zweiten bis dritten Tag durch Ablösen der zuvor zweifach mit PBS gewaschenen konfluenten Zellen mit 1ml Trypsin / EDTA (0,5% Trypsin / 0,5% EDTA in PBS). Durch Zugabe von DMEM und 10% FCS wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen konnten 1:3 – 1:6 verdünnt ausplattiert werden.

6.1.2 Kultur von Suspensionszellen

Anzucht und Stammhaltung der Suspensionszelllinien erfolgte in RPMI-Medium (10% FCS) in T-Flaschen. Alle zwei bis drei Tage wurde die Suspension in Medium auf ca. 5×10^5 Zellen / ml verdünnt (Hodgkin/Reed-Sternberg-Zelllinien auf $2,5 \times 10^5$).

6.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Anlegen von Zellvorräten wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Adhärent wachsende Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70% trypsinisiert (siehe 6.1.1), in frischem Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Die Zellen einer 100 mm Zellkulturschale wurden in 1 ml Einfriermedium (DMEM, 20% FCS, 15% DMSO) resuspendiert und in Gefriergefäßen (Nalgene) über Nacht in einem Zellgefriercontainer (Nalgene) auf -70°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Suspensionszellen wurden bei einer Dichte von 1×10^6 Zellen / ml bei 1200 rpm abzentrifugiert. Je 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml Gefriermedium (RPMI1640, 20% FCS, 15% DMSO) aufgenommen und gleichermaßen eingefroren.

Eingefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, in ein 14 ml Falcon-Röhrchen transferiert, mit 10 ml Medium (10% FCS) versetzt und zur Entfernung des DMSO 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in 100 mm Zellkulturschalen bzw. T-Flaschen in Kultur genommen.

6.1.4 Behandlung von Zellen mit Stimulatoren

Die Stimulation der Zellen erfolgte durch direkte Zugabe der Agenzien in das Medium. Wenn nicht anders angegeben wurden folgende Endkonzentrationen eingesetzt: $\text{TNF}\alpha$ 20 ng/ml, $\text{IL-1}\beta$ 10 ng/ml, PMA 100 ng/ml und LPS 10 $\mu\text{g/ml}$. Die Zeitpunkte der Stimulation richteten sich nach dem jeweiligen Experiment und sind in der Beschreibung der entsprechenden Methode angegeben. Die Hsp90-Inhibitoren wurden in folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: Geldanamycin 0,5 μM , Radicicol 1,3 μM .

6.1.5 Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

293-Zellen wurden mit der unter 6.1.5.1 beschriebenen CaPO_4 -Methode (Graham und van der Eb 1973) transfiziert. Bei HeLa- und COS7-Zellen wurde die Plasmid-DNA durch Lipofektion (6.1.5.2) in die Zellen eingeschleust. Bei allen Transfektionsmethoden wurde die jeweils angegebene Menge an Gesamt-DNA durch Zugabe des Leervektors pcDNA3 erreicht.

6.1.5.1 Transfektion mit CaPO_4

Die CaPO_4 -Methode basiert auf der Ausbildung von CaPO_4 -Kristallen, die Plasmid-DNA eingeschlossen haben. Durch die unspezifische Aufnahme dieser Kristalle in die Zellen erfolgt die Internalisierung der Plasmid-DNA. 293-Zellen wurden am Vortag so verdünnt, dass sie zum Zeitpunkt der Zugabe des Transfektionsansatzes eine Konfluenz von 40-50% hatten. Die zur Transfektion einer 60 mm Schale eingesetzten Mengen an Gesamt-DNA, CaCl_2 sowie 2x HBS entsprachen jeweils der Hälfte einer Transfektion einer 100 mm Schale. Für eine 100 mm Schale wurden 10 μg Gesamt-DNA mit 37 μl 2 M CaCl_2 versetzt und das Volumen mit bidestilliertem Wasser auf 300 μl aufgefüllt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 300 μl 2x HBS vorgelegt und das DNA/ CaCl_2 -Gemisch tröpfchenweise zugegeben. Die Suspension wurde 20 Min. bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig unter gleichmäßiger Verteilung auf die Zellen pipettiert. 24 - 36 h später wurden die Zellen geerntet.

6.1.5.2 Transfektion mittels Lipofektion

Bei der Lipofektion von HeLa- und COS7-Zellen mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen) bildet das liposomenhaltige Reagenz mit der zugegebenen DNA spontan Komplexe, in denen die DNA eingeschlossen ist. Diese Komplexe können mit der Zellmembran

fusionieren und so ihren Inhalt, die DNA, in die Zellen entlassen. Die Zellen wurden in 100 mm Zellkulturschalen in Medium ohne Antibiotika ausplattiert und am nächsten Tag bei einer Konfluenz von ca. 90% transfiziert. Die DNA (10 µg Gesamtansatz) und 12 µl Lipofectamine 2000 wurden in jeweils 1 ml OptiMEM (Invitrogen) aufgenommen, 5 Min. inkubiert und anschließend gemischt. Nach 20 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Liposom / DNA-Gemisch auf die Zellen gegeben. 24 – 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Für die Transfektion von Zellen auf 6- oder 24-Loch-Platten wurde entsprechend der geringeren Fläche weniger DNA, Lipofectamine 2000 und OptiMEM eingesetzt.

6.1.6 Bestimmung der Apoptose mithilfe der Durchflusscytometrie

Während der Apoptose (programmierter Zelltod) finden Änderungen in der Zellmembran statt, u. a. die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Membran. AnnexinV ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin und bindet daher Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin (Raynal et al. 1994). Mit Fluorescein konjugiertes AnnexinV (Roche) erlaubt die Messung des Anteils apoptotischer Zellen mithilfe der Durchflusscytometrie.

Die zu untersuchenden Suspensionszellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 rpm pelletiert, mit Annexin-Bindungspuffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2) gewaschen und 10-15 Min. bei RT in 100 µl AnnexinV-FLUOS-Markierungslösung inkubiert. Der Anteil an intensiv fluoreszierenden Zellen wurde im Durchflusscytometer bestimmt.

6.1.7 Präparation von Zellextrakten

Adhärente Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann in 1 ml kaltem PBS auf Eis von der Zellkulturschale abgeschabt. Das Zellpellet wurde, wenn nicht anders angegeben, in einem Puffer mit isotonischem Salzgehalt (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0,2 mM EDTA, 0,5% NP-40, 10% Glycerin, sowie frisch zugesetzten Protease- und Phosphataseinhibitoren (*Complete*-Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche); 0,4 µM Pefabloc; 1 mM DTT; 8 mM β -Glycerophosphat; 0,2 mM Na_3VO_4)) lysiert. Alternativ hierzu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS direkt auf der Zellkulturschale in dem jeweiligen Puffer lysiert. Die Zellen wurden abgeschabt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach starkem Vortexen

und 10 Min. Inkubation bei 4°C in einem Drehrad wurde das Lysat in einer Kühlzentrifuge bei 4°C 10 Min. mit 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Gefäß überführt.

Suspensionszellen wurden pelletiert, mit PBS gewaschen und direkt mit dem entsprechenden Lysepuffer lysiert.

6.2 Nukleinsäuretechniken

6.2.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten aus Restriktions- oder PCR-Ansätzen wurden Agarosegele von 1-1,5% Agarose in TBE-Puffer mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 0,2 Vol. 6x DNA-Probenpuffer (1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol, 40% Glycerin) versetzt, zusammen mit einem DNA-Längenstandard (1kb „Plus“-DNA-Ladder, Invitrogen) aufgetragen und die Elektrophorese bei 90 V in TBE-Puffer durchgeführt.

6.2.2 Ethanolpräzipitation von DNA

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und 2 Volumen eiskaltem EtOH abs. versetzt und gut gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für mindestens 30 Min. bei -80°C bzw. 60 Min. bei -20°C. Die DNA wurde durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 4°C mit 14000 rpm für 15 Min. pelletiert und einmal mit 100 µl eiskaltem 70%igem EtOH gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in H₂O bidest. aufgenommen.

6.2.3 Reinigung von DNA

6.2.3.1 Phenolextraktion

Zur Reinigung von DNA in einer wässrigen Lösung, wurde diese mit einem Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt. Das verwendete Phenol war TE-Puffer-gesättigt und hatte bei der Zugabe RT. Die Suspension wurde ausgiebig gevortext, wodurch die in der Lösung befindlichen Proteine durch das Phenol denaturiert wurden. Im Anschluss wurde das Gemisch für 10 Min. bei RT mit 13000 rpm abzentrifugiert. Die denaturierten Proteine befanden sich in einer Grenzschicht zwischen der unteren organischen Phase und der oberen, DNA-haltigen, wässrigen

Phase. Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA wie unter 6.2.2 beschrieben gefällt und aufgenommen.

6.2.3.2 Qiagen-Säulen

DNA, die einer enzymatischen Modifikation wie Restriktion oder Dephosphorylierung unterzogen worden war, oder PCR-Reaktionen konnten über Säulen („*QIAquick PCR Purification Kit*“) der Firma Qiagen nach den Vorschriften des Herstellers aufgereinigt werden.

6.2.3.3 Gelextraktion

Die Aufreinigung von DNA über ein Agarosegel verfolgt das Ziel, die gewünschte DNA von DNA-Fragmenten anderer Größen oder nicht inkorporierten Nukleotiden zu trennen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem präparativen Agarosegel wurde die mit Ethidiumbromid angefärbte und unter UV-Licht sichtbare DNA-Bande von Interesse ausgeschnitten. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des "*QIAquick Gel Extraction Kit*" nach Angaben des Herstellers.

6.2.4 Restriktionsanalyse

Bakterielle Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen und hydrolysieren in diesen an definierten Stellen die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge. Hierbei entstehen je nach Enzym 5'- oder 3'-Überhänge („*sticky*“) bzw. glatte („*blunt*“) Enden. Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen und entsprechende Puffer nach Angaben des Herstellers verwendet. Ein typischer Restriktionsansatz enthielt neben der in Aqua bidest. gelösten DNA 1/10 Volumenteil 10 x Restriktionspuffer und entsprechende Mengen eines oder zweier Restriktionsenzyme (max. 10% des Reaktionsendvolumens). Im Allgemeinen reichten 1-2 U des Enzyms aus, um 1 µg DNA zu schneiden. Die Inkubation erfolgte 1-2 h bis ü/N bei 37°C. Die Restriktion wurde durch Hitzinaktivierung des Restriktionsenzym oder durch die Aufreinigung der DNA beendet.

6.2.5 Dephosphorylierung von DNA-Enden

DNA-Ligasen benötigen 3'-OH- und 5'-Phosphatgruppen am Ende der doppelsträngigen DNA-Fragmente, die miteinander verbunden werden sollen. Durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase („*Shrimp Alkaline Phosphatase*“; SAP)

können die 5'-Phosphatgruppen entfernt werden und so die Religation von zuvor gespaltenen Restriktionsschnittstellen verhindert werden. Die Dephosphorylierung erfolgt direkt im Anschluss an den Restriktionsverdau. Sofern möglich wurde das Restriktionsenzym durch einen Inkubationsschritt für 10 Min. bei 65-70°C inaktiviert, war dies nicht möglich, musste die DNA wie unter 6.2.3.2 beschrieben aufgereinigt werden. Die verwendete Phosphatase konnte in allen Restriktionspuffern verwendet werden. Im Allgemeinen wurde mit 1 U SAP für maximal 5 µg DNA und einer Inkubation von 1 h bei 37°C eine vollständige Dephosphorylierung der DNA-Enden erreicht. Nach einer Dephosphorylierung erfolgte immer eine Aufreinigung der DNA über ein Agarosegel.

6.2.6 Ligation

Aus Agarosegelen isolierte DNA-Fragmente wurden zur Ligation eingesetzt. Dazu wurden ca. 100 ng linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA mit einem ca. drei- bis fünffach molaren Überschuss an Insert-DNA in einem Ligationsansatz mit 1x Ligationspuffer und 5 U T4-DNA-Ligase (usb) über Nacht bei 16°C oder 1-3 h bei RT inkubiert.

6.2.7 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Gleiche molare Mengen von komplementären Oligonukleotiden wurden in einem 20 mM Tris-HCl pH 8 und 20 mM NaCl enthaltenden Puffer für 5 Min. bei 95°C in einem Heizblock inkubiert. Der Heizblock wurde abgeschaltet und mit dem Hybridisierungsansatz auf RT abkühlen gelassen.

6.2.8 Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA

6.2.8.1 [³²P]-Endmarkierung von DNA

Das Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I verfügt zwar noch über 5'→3'-DNA-Polymerase- und 3'→5'-Exonukleaseaktivitäten, es besitzt aber keine 5'→3'-Exonukleaseaktivität mehr. Es wird daher für das Auffüllen 5'-überhängender Enden doppelsträngiger Oligonukleotide in Anwesenheit von [³²P]-dATP benutzt. In einer Standardreaktion wurden 200 ng DNA in einem 25 µl Ansatz mit folgenden Komponenten für 30 Min. bei 30°C inkubiert: 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 250 µM der Desoxynukleotide dCTP, dGTP, dTTP, 40 µCi α[³²P]dATP und 1 U Klenow-Enzym (usb). Das markierte Fragment wurde mit dem „QIAquick

Nucleotide Removal Kit (Qiagen) von freien Nukleotiden getrennt (siehe 6.2.3) und die radioaktive Strahlung durch Messung im Szintillationszähler bestimmt.

6.2.8.2 Markierung von Sonden nach der *RandomPrime*-Methode

Für die Hybridisierung von auf Nylon-Membranen fixierter RNA mit [³²P]-markierten Sonden (Northern Blot, 6.2.17.) wurden DNA-Fragmente mit dem *RandomPrime DNA Labelling System* (Amersham) mit α [³²P]-dATP und α [³²P]-dCTP markiert. Dabei dienen zufällige Nonamer-Sequenzen als Primer, von denen ausgehend das Klenow-Fragment den markierten Strang synthetisiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden anschließend durch das „*QIAquick Nucleotide Removal Kit*“ (Qiagen) abgetrennt.

6.2.9 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur *in vitro* Amplifizierung eines DNA-Bereiches definierter Länge und Sequenz eingesetzt. Zur Einführung zusätzlicher Restriktionsschnittstellen wurden Primer verwendet, die zusätzlich zur Hybridisierungssequenz auch die Erkennungssequenz einer Restriktionsendonuklease enthalten. Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die in Expressionsvektoren kloniert werden sollten, wurde die Polymerase *DeepVent* (NEB) oder *Pfu*-Polymerase (Stratagene) eingesetzt, die durch eine zusätzliche Exonuklease-Aktivität eine hohe Lesegenauigkeit gewährleisten. Eine Standardreaktion für eine PCR mit *DeepVent*-Polymerase enthielt 50-100 ng Template-DNA, je 50 pmol des Vorwärts- und Rückwärtsprimers, je 400 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1x Polymerase-Puffer mit MgSO₄, und 1 U Polymerase. Die PCR wurde in einem programmierbaren Thermoblock mit folgendem Programm durchgeführt: Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 Min. wurden 30 Zyklen von jeweils 30 s Denaturierung bei 95°C, 30 s Hybridisierung der Primer bei 58-70°C (Annealing) und 1 min Synthese pro kb PCR-Produkt des komplementären DNA-Stranges (Elongation) bei 72°C durchgeführt. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die PCR-Fragmente mit dem „*QIAquick PCR Purification Kit*“ von Primern und Nukleotiden befreit.

6.2.9.1 Polymerase-Kettenreaktion von Bakterienkolonien

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Transformation von Bakterien wurde eine Bakterienkolonie mit einem Zahnstocher in 15 μ l Wasser überführt. Zu den 15 μ l

wurden die übrigen Bestandteile eines PCR-Ansatzes, (10x Reaktionspuffer, dNTPs, Vor- und Rückwärtsprimer, AmpliTaq-Polymerase (Applied Biosystems)) zugegeben. Das Gesamtvolumen war 25 µl. Vor Beginn der Amplifikationszyklen wurde ein Schritt von 10 Min. bei 95°C eingefügt, um die Bakterien zu denaturieren. Im Anschluss an die PCR konnte auf einem Agarosegel überprüft werden, ob das entsprechende Plasmid in der getesteten Kolonie vorhanden war und somit ein PCR-Produkt synthetisiert werden konnte.

6.2.9.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Mithilfe der Reversen Transkription wird eine Sequenz von einem RNA-Template in DNA überführt. Die Reaktion wird durch das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert. Durch den Einsatz sequenzspezifischer Primer in einer anschließenden PCR kann das Vorhandensein von bestimmten Transkripten in dem RNA-Pool einer Zelle überprüft werden. Hier wurde für eine gekoppelte RT-PCR das *OneStep RT-PCR Kit* der Firma QIAGEN eingesetzt.

6.2.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

3-5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum der zu präparierenden Plasmide wurden mit einer Bakterienkolonie, die über Nacht auf einer LB-Platte gewachsen war, inokuliert und für mind. 6 h im Warmluftschüttler (200 rpm) bei 37°C kultiviert. Aus 2 ml der Kultur wurden die Bakterien pelletiert und in 100 µl P1 (25 mM Tris pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) lysiert. Die Neutralisation des Lysates erfolgte durch Zugabe von 150 µl kalter Kaliumacetat-Lösung P3 (11,5% Eisessig in 5 M KAc), wodurch neben SDS-Proteinkomplexen auch höhermolekulare RNA-Komplexe präzipitiert wurden, während zirkuläre Plasmid-DNA in Lösung blieb. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm wurde der Überstand mit 750 µl Ethanol versetzt und die gefällte DNA durch Zentrifugation wie zuvor pelletiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in ca. 30 - 50 µl Aqua bidest. aufgenommen. Alternativ erfolgte die Präparation mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.

6.2.11 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden in größerer Menge wurde mit einem DNA-Präparations-Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 100-200 ml Ampicillin-haltiges (100 µg/ml) (bzw. 25 µg/ml Kanamycin – je nach Plasmid) LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie oder 10 µl Bakteriensuspension angeimpft und über Nacht im Warmluftschüttler bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert und weiter nach Angaben des Herstellers lysiert, die DNA über „tip500“-Säulen gereinigt, präzipitiert und nach dem Waschen in 200–500 µl Aqua bidest. aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Extinktionsmessung bei 260 nm im UV-Photometer.

6.2.12 Konzentrationsbestimmung von DNA

Nukleinsäuren weisen ein charakteristisches Absorptionsspektrum im UV-Bereich auf, wobei ein relatives Maximum der Absorption bei ca. 260 nm liegt (A_{260}). Verunreinigungen durch Proteine, die ihr Absorptionsmaximum bei ca. 280 nm haben, lassen sich durch die Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} nachweisen. Bei nicht kontaminierten Nukleinsäurenlösungen hat dieser Quotient einen Wert von 1,5-2. Bei einer A_{260} von 1,0 enthält eine Lösung ca. 50 µg/ml doppelsträngige DNA, 40 µg/ml einzelsträngige DNA bzw. RNA oder 20 - 25 µg/ml Oligonukleotide.

6.2.13 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode

(Inoue et al 1990)

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde 250 ml SOB-Medium mit 10 ml einer Übernachtskultur *E. coli* DH5 α (in LB mit 10 µg / ml Tetrazyclin) angeimpft und bei 18°C bis zu einer OD_{600} von 0,6 geschüttelt. Die für 10 Min. im Eisbad abgekühlte Bakterienkultur wurde bei 2500 x g für 10 Min. bei 4°C pelletiert und das Bakterienpellet in 80 ml eiskaltem TB (10 mM PIPES pH 6,7, 55 mM $MnCl_2$, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl) resuspendiert. Nach weiteren 10 Min. auf Eis und erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem TB aufgenommen. Die Suspension wurde mit DMSO versetzt (Endkonzentration von 7%) und in 200- und 400 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die kompetenten Bakterien zeigten eine Transformationseffizienz von $1,5 \times 10^7$ Kolonien pro µg transformierter Plasmid-DNA.

6.2.14 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien nach der Hitzeschock-Methode

Im Transformationsansatz wurden 100 µl kompetente Bakterien mit 10-50 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatz gemischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42°C im Wasserbad und eine weitere Inkubation für 1 min auf Eis. Nach Zugabe von 400 µl LB-Medium ohne Antibiotika wurde die Suspension 40 min bei 37°C geschüttelt. 50-200 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten (LB-Medium, 15 g / l Agar, 100 µg / ml Ampicillin oder 25 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert.

6.2.15 DNA-Kapillar-Sequenzierung

Bei der Sequenzierung unter Verwendung eines Kapillar-Sequenzierautomaten kam das System 310 der Firma Applied Biosystems zum Einsatz. Die Sequenzier-Produkte wurden in einer PCR-Reaktion nach der Kettenabbruch-Methode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden generiert. Es wurden ca. 300 ng Plasmid-DNA mit 5 pmol Sequenzier-Primer, 2 µl 5x Sequencing Puffer (Applied Biosystems) und 0,5 µl Reaktionsmix (ABI PRISM *BigDye Terminator* v1.1, Ready Reaction Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) zur PCR eingesetzt. Für Standard-Reaktionen wurde folgendes Programm benutzt:

95°C 3 Min.
96°C 35 sec
50°C 12 sec 25 Zyklen
60°C 4 Min.
4°C ∞

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte durch Ethanolpräzipitation, wurde das Pellet in 20 µl einer speziellen Formamid-Lösung (*Template Suppression Reagent*, Applied Biosystems) aufgenommen, 2 Min. bei 90° C denaturiert und in das Sequenzier-Gerät gestellt. Bei der Kapillarsequenzierung wird die Auftrennung der unterschiedlich langen Sequenzierungsprodukte in einer Kapillare, die mit einem speziellen Polymer gefüllt ist, unter sehr hohen Spannungen erreicht. Erreichen die markierten Produkte den Detektor, werden die Farbstoffe durch einen Laser zur Fluoreszenz-Emission angeregt. Je nach Farbstoff wird durch eine spezielle Kamera ein unterschiedliches Emissionsspektrum detektiert. Die so erhaltenen Rohdaten werden anschließend durch ein Analyseprogramm ausgewertet und die Sequenz kann dargestellt und abgelesen werden.

6.2.16 Präparation von RNA

Die Präparation von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen.

6.2.17 Northern Blotting

Beim Northern Blot werden RNA-Proben über ein denaturierendes Agarose-Gel nach der Größe aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wird dann mit einer radioaktiv markierten Sonde für das zu untersuchende Gen hybridisiert und so die Menge oder Regulation des jeweiligen Transkripts sichtbar gemacht.

10-15 µg Gesamt-RNA wurden pro Probe eingesetzt. In einem Ansatz von 20 µl wurde die RNA mit 2 µl 10x MOPS-Puffer (200 mM MOPS, 10 mM EDTA, 50 mM Na-Acetat, pH 7,0, autoklaviert), 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid für 5 Min. bei 65° C denaturiert. Anschließend wurden 2 µl Ficoll Auftragspuffer (0,25% XylenCyanol, 0,25% Bromphenolblau, 25% Ficoll, 1mM EDTA) und 1 µl Ethidiumbromidlösung (1:10-Verdünnung von 10mg/ml) zugegeben. Die Elektrophorese im 1% Agarose-Gel (für 100 ml: 1 g Agarose, 10 ml 10x MOPS-Puffer, 17 ml Formaldehyd (37% v/v) wurde in 1x MOPS-Puffer durchgeführt. Der Transfer auf HybondN+-Membran (Amersham) erfolgte ü/N in 20x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Na₃Citrat, pH 7,0). Die Membran wurde zuvor 15 Min. in H₂O und 15 Min. in 20x SSC-Puffer vorbehandelt. Nach dem Transfer wurde die Membran jeweils 5 Min. in 20x SSC und in 2x SSC gewaschen und die RNA unter UV-Licht (im „Stratalinker“, Stratagene) 2x fixiert. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran in 50 mM NaPO₄, pH 7,2 inkubiert. Die Hybridisierung wurde in „QuickHyb“-Hybridisierungslösung (Stratagene) durchgeführt. Nach 20-30 Min. Prähybridisierung in QuickHyb-Lösung bei 68° C, wurde die markierte Sonde (50 µl mit 100 µl Lachs Sperma DNA (10 mg/ml), 3 Min. bei 95° C denaturiert) zugegeben und eine Stunde bei 68° C hybridisiert. Die Membran wurde 2x mit 2x SSC, 0,1%SDS bei ca. 30° C und 2x bei 60° C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Auf die in Folie eingewickelte Membran wurde ein Film aufgelegt. Zur Hybridisierung mit weiteren Sonden kann die Membran „gestrippt“ werden. Dafür wurde sie 2x 15 Min. in kochender 0,1x SSC, 0,1% SDS-Lösung gewaschen.

6.3 Proteinchemische und immunologische Techniken

6.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das „*Protein dye reagent concentrate*“ der Firma Biorad nach Vorschrift des Herstellers angewandt und die Extinktion bei 595 nm im Vergleich zu BSA-Standardwerten gemessen.

6.3.2 SDS-PAGE

Für die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde die BioRad Mini-Protean II Apparatur mit 7 x 10 cm großen und 0,75 mm dicken Gelen verwendet. Das Trenngel (375 mM Tris / HCl pH 8,8, 6-12% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,075 APS, 0,05% TEMED) wurde direkt nach dem Gießen mit 70% Ethanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. In das Sammelgel (125 mM Tris / HCl pH 6,8, 5% Acrylamid, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,1% TEMED) wurde ein Kamm mit 10 oder 15 Taschen eingepasst. Die Proteinproben wurden mit 4 x SDS-Probenpuffer (125 mM Tris / HCl pH 6,8, 50% Glycerin, 6% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 10% β -Mercaptoethanol) versetzt, 3-5 Min bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris / HCl, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) bei 100-150 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Zur Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine wurden vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (BioRad, Fermentas) aufgetragen.

6.3.3 Coomassiefärbung

Das SDS-Polyacrylamidgel wurde für 30 Min. in der Färbelösung (50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,025% Coomassie brilliant blue R 250) und anschließend in Entfärber (10% (v/v) Methanol, 10% Essigsäure) inkubiert. Anschließend wurde das Gel in einem Vakuumtrockner für 30 Min. bei 80°C getrocknet. Die Trocknung kann auf Whatman-Papier oder zwischen Zellophan erfolgen.

6.3.4 Proteintransfer auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine können mit der von Towbin et al. (1979) beschriebenen Methode („Western blotting“) auf PVDF-Membranen (Polyvinylidendifluorid) übertragen werden.

Nach Auftrennung der Proteine in einem SDS-Gel (siehe 6.3.2), wurden diese durch Elektrotransfer auf einer Membran immobilisiert. Dazu wurde auf das Gel eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran (Millipore) gelegt und zwischen puffergetränkten Whatman-Filter-Papieren in einer „semi-dry“ Blotapparatur bei 60 mA pro Gel für 30-120 Min. transferiert. Der Transfer wurde in Blotpuffer (48 mM Tris / HCl pH 8,3, 39 mM Glycin, 20% Methanol, 0,037% SDS (w/v)) bei RT durchgeführt.

6.3.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran kurz mit PBS/0,1% Tween-20 gewaschen und danach für 1 h bei RT mit 3% BSA in PBS/0,1% Tween blockiert. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4° C) in 1,5% BSA PBS / 0,1% Tween. Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBS/0,1% Tween, erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Zweitantikörper (1:2500) für 1 h, ebenfalls bei RT. Die Zweitantikörper sind mit Peroxidase konjugiert, welche durch Umbau eines Substrates zur Freisetzung von chemilumineszenter Strahlung führt. Als Substrat wurde das PhototopeR-HPR System (NEBiolabs) verwendet. Zum Detektieren der selben Membran mit einem anderen Primärantikörper wurde die Membran über Nacht in folgendem Puffer „gestrippt“: 0,2 M Glycin, 0,1% SDS, 1% Tween20, pH2,2, anschließend konnte wie beschrieben erneut blockiert und detektiert werden.

6.3.6 Expression rekombinanter Proteine

(nach Studier und Moffatt 1986)

Die cDNAs der zu untersuchenden Proteine wurden in pGEX-Vektoren (Amersham) kloniert, um die Proteine in Fusion mit Glutathion S-Transferase in *E.coli* Bakterien des Stammes BL21(DE3)pLysS zu exprimieren und über Glutathion-Sepharose aufzureinigen zu können.

100 µl Suspension kompetenter Bakterien wurden mit 50 ng Expressionsvektor transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Platten, die 100 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 40 ml LB-Ampicillin-Kultur angeimpft und

über Nacht geschüttelt. Mit dieser Kultur wurden am nächsten Tag 400 ml LB-Medium mit Ampicillin angeimpft. Die optische Dichte der Kultur wurde bei 600 nm bestimmt und regelmäßig kontrolliert. Bei Erreichen der OD_{600} von 0,6 wurde die Proteinexpression mit 0,1-0,4 mM IPTG induziert und die Kultur für weitere 3 h im Schüttler bei 30 oder 37°C belassen. Im Anschluss wurden die Bakterien abzentrifugiert und das Pellet bei -80°C eingefroren.

6.3.7 Aufreinigung über Glutathion-Sepharose

Bakterien, die mit einem pGEX-Vektor transformiert worden waren, enthielten das Zielprotein mit einer Glutathion-S-Transferase Fusion. Die Aufreinigung dieser Proteine erfolgte über Glutathion-Sepharose (Pharmacia). Das Bakterienpellet wurde aufgetaut und in Puffer (50 mM Tris pH7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,4 μ M Pefabloc) aufgenommen. Die Suspension wurde auf Eis in einem Sonifiziergerät 2 x 5 min bei einer Amplitude von 70% und einem Zeitintervall von 15 s Sonifizieren und 15 s Pause lysiert. Die deutlich klarere Suspension wurde für 30 Min. bei 4°C mit 10000 rpm abzentrifugiert. Sowohl Pellet als auch Überstand wurden auf einem analytischen SDS-Gel aufgetrennt, um die Menge des induzierten Proteins und seine Löslichkeit zu untersuchen. Die aufzureinigenden Proteine befanden sich im Überstand und konnten sofort mit Glutathion-Sepharose inkubiert werden. Die Bindung der Proteine an die Matrix erfolgte im Drehrad bei 4°C für 2 h. Die beladene Sepharose wurde mehrfach mit kaltem Lysepuffer gewaschen. Das Fusionsprotein wurde in 3 Schritten mit 20 mM reduziertem Glutathion bei RT von der Sepharose eluiert.

6.3.8 Immunopräzipitation (IP) von Proteinen

Die Immunopräzipitation dient dem spezifischen Nachweis eines Proteins sowie der Anreicherung bestimmter Proteine, um ihre enzymatische Aktivität zu untersuchen. Durch die Zugabe von spezifischen Antikörpern werden die Proteine gebunden und die Präzipitation dieses Antikörper-Protein-Komplexes wird durch die Zugabe von Protein-A oder -G, das an Sepharose gekoppelt ist, erreicht. Protein-A bzw -G bindet die konstante Region von IgG, IgM und IgA Antikörper Unterklassen. Protein-G-Sepharose wurde als fertige Suspension gekauft (Amersham). Protein-A-Sepharose wurde als Pulver (Amersham) gekauft, von dem 0,1 g in 10 ml PBS aufgenommen wurden und bei 4°C für 1 h in einem Drehrad äquilibriert wurden. Die Sepharose

wurde anschließend abzentrifugiert und nach wiederholtem Waschen in 600 µl PBS aufgenommen.

6.3.8.1 IP für *in vitro* Phosphorylierungsexperimente

Transfizierte 293-Zellen oder mit Inhibitoren/Stimulatoren behandelte HeLa oder Hodgkin/Reed-Sternberg-Zellen wurden in Kinase-Lysis-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% Glycerin, 1 mM DTT, 10 mM NaF, 80 mM β-Glycerophosphat, 100 µM NaVO₄, 0,4 µM Pefabloc, sowie *Complete*-Proteaseinhibitor-Cocktail) lysiert. Ein 100-200 µg Protein enthaltendes Volumen dieses Lysats wurde mit Lysis-Puffer auf 500 µl aufgefüllt, und zur Immunopräzipitation von zellulärem IKKα wurden je 1 µg monoklonaler IKKα-Antikörper und 25 µl Protein-A-Sepharose zugesetzt. (Überexprimierte IκBα-Kinasen wurden mit Antikörpern gegen das flag-, HA- oder myc- Epitop-tag präzipitiert). Dieser Ansatz wurde für 3 h im Kühlraum rotiert. Im Anschluss an die Immunopräzipitation wurde die Protein-A-Sepharose pelletiert und zweimal mit je 1 ml Kinase-Lysis-Puffer gewaschen. Die Immunokomplexe wurden einmal mit Kinase-Reaktionspuffer (20 mM HEPES pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 20 mM β-Glycerophosphat, 50 µM NaVO₄, 1 mM DTT und 20 µM ATP) gewaschen und anschließend in 15 µl Kinase-Reaktionspuffer aufgenommen für die *in vitro* Phosphorylierungsstudien (s. 6.3.10) eingesetzt.

6.3.8.2 Koimmunopräzipitation

Koimmunopräzipitationen dienen dem Nachweis von Proteininteraktionen. Zur Untersuchung der Interaktion kotransfizierter Proteine wurden 293 oder COS7-Zellen wie oben beschrieben transient transfiziert. Alternativ wurden auch mit Inhibitoren behandelte Namalwa-Zellen untersucht. Zellextrakte wurden 24 h später in TNESV-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 10% Glycerin, sowie Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) oder Kinase-Lysis-Puffer (siehe 6.3.8.1) wie unter 6.1.7 beschrieben hergestellt. Ein Aliquot des Lysats wurde zur Expressionskontrolle für den Western Blot abgenommen und der Rest des Lysats mit Protein-A-Sepharose von unspezifischen Bindungen an die Sepharose gereinigt. Die Immunopräzipitation wurde mit einem Antikörper gegen eines der koexprimierten oder zellulären Proteine für 3-15 h bei 4° C durchgeführt. Die Sepharose-Beads wurden anschließend 4x mit dem jeweiligen Lyse-/IP-Puffer gewaschen. Nach SDS-

PAGE und Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Koimmunopräzipitation des oder der anderen Proteine im Western Blot überprüft.

6.3.9 Gelretardationsexperiment (EMSA)

Durch das Gelretardations-Experiment werden sequenzabhängige DNA-Protein Interaktionen nachgewiesen. Dieser Versuch wird mit gereinigten Proteinen, oder Proteinen aus Zellextrakten durchgeführt. DNA-Fragmente migrieren auf einem nativen Polyacrylamidgel zur Anode. Sind die DNA-Fragmente an ein Protein gebunden, so verlangsamt sich die Laufgeschwindigkeit deutlich (Retardierung). Zum Nachweis der DNA-Protein-Komplexe wurden die Enden der DNA-Fragment wie unter 6.2.8.1 beschrieben radioaktiv markiert.

Die Zellen wurden zur Präparation von Gesamtzellextrakten in folgendem Puffer lysiert: 20 mM HEPES pH7,9, 350 mM NaCl, 20% , 1 mM MgCl₂, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1% NP-40.

Pro Ansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl ca. 10000-20000 cpm des radioaktiv markierten dsDNA-Oligonukleotids eingesetzt, 2-5 µg Protein des zu untersuchenden Proteinextrakts, sowie 10 µl 2x Shift-Puffer (40 mM HEPES-NaOH pH 7,9, 120 mM KCl, 8% Ficoll), 0,2 µl BSA (10 mg/ml), 0,4 µl DTT (100mM) und 1 µl poly(dI-dC) (2 µg/µl). Der Ansatz wurde 30 min bei RT inkubiert und dann auf ein 20 x 20 cm und 1,5 mm dickes natives Polyacrylamidgel (5% Acrylamid in 1x TBE) aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 25mA mit 1x TBE als Laufpuffer. Die Laufstrecke konnte anhand der parallel aufgetragenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol verfolgt werden. Nach Beendigung des Laufes, wurde das Gel auf Whatman-Papier vakuumgetrocknet und anschließend über Nacht bei -80°C mit Verstärkerfolie exponiert.

6.3.10 *In vitro*-Phosphorylierungsexperiment

(nach DiDonato et al. 1997)

Zur Untersuchung der katalytischen Aktivität einer Kinase wurden *in vitro* Phosphorylierungsstudien (Kinase-Assays) durchgeführt. So konnte der Einfluss von Inhibitoren und Aktivatoren auf die Aktivität des IKK-Komplexes bestimmt werden. Wie in 6.3.8.1 beschrieben wurden Immunopäzipitationen aus Zellextrakten durchgeführt. Die präzipitierten Kinasen lagen an Sepharose-Beads gekoppelt in 15 µl Kinase-Reaktionspuffer vor und wurden nach Zugabe von 1 µg rekombinantem Substratprotein und 3 µCi [32P]-γATP für 20 Min. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion

wurde durch Zugabe von 4x Probenpuffer gestoppt und für 5 Min. bei 95°C aufgeköcht. Die nach der Reaktion mit radioaktivem Phosphat markierten Substratproteine wurden auf einem 12%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde vakuumgetrocknet und durch Exposition von Röntgenfilm eine Autoradiographie angefertigt.

6.3.11 *Pulse-Chase Experiment*

Das Pulse-Chase Experiment dient der Analyse der Proteinstabilität sowie direkter Einflüsse auf die Proteinsynthese. Die Zellen werden für einen kurzen Zeitraum mit [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium inkubiert und inkorporieren das markierte Methionin in alle in dieser Zeit synthetisierten Proteine (*Pulse*). Durch das Entfernen des Markierungsmediums und die Zugabe von nicht radioaktivem Vollmedium wird der weitere Einbau von [³⁵S]-Methionin verhindert. Die Stabilität der während der *Pulse*-Phase synthetisierten Proteine kann nun über einen gewissen Zeitraum detektiert werden (*Chase*). Der Nachweis erfolgt nach radioaktiver Immunopräzipitation und Autoradiografie.

Zur Untersuchung von zellulären Proteinen wurden HeLa-Zellen eingesetzt, außerdem wurden transfizierte COS7-Zellen 24 h nach Transfektion verwendet. Da der Einfluss des Hsp90-Inhibitors Geldanamycin auf die Proteinsynthese untersucht werden sollte, wurden einige Proben bereits 2 h vor der Markierung und während der Markierung mit Geldanamycin inkubiert. Kontrollzellen wurden nicht behandelt oder Geldanamycin erst in der Chase-Phase, d. h. nach Beendigung der Markierung, zugegeben. Die Zellen wurden mit DMEM ohne Methionin (ICN) (versetzt mit 2% L-Glutamin und 10% gegen PBS dialysiertem FCS) gewaschen. Zur Markierung wurden dann 80 µCi/ml [³⁵S]-Methionin zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37° C im CO₂-Inkubator inkubiert. Anschließend wurde das Markierungsmedium entfernt und die Zellen zweimal mit nicht radioaktivem Vollmedium (DMEM) gewaschen. Eine Probe wurde direkt lysiert (*Chase* t=0). Je nach zu erwartender Stabilität des zu untersuchenden Proteins wurden die Zellen für weitere 2-6 h in nicht radioaktivem DMEM (mit oder ohne Geldanamycin) inkubiert, bzw. zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen entnommen, um den Verlauf zu verfolgen. Vor dem Lysieren wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte in RIPA-Puffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren.

Die Extrakte wurden für eine Stunde mit ProteinA-Sepharose vorgeklärt, um unspezifisch bindende Proteine abzutrennen. Die Immunopräzipitation gegen das untersuchte zelluläre oder transfizierte Protein erfolgte über Nacht bei 4° C. Die Sepharose wurde anschließend 5x mit kaltem RIPA-Puffer gewaschen, und mit 10 µl 2x SDS-Probenpuffer 5 Min. aufgeköcht. Der Überstand wurde zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Proteine wurden durch 10 Min. Inkubation in Fixierlösung (25% Isopropanol, 10% Essigsäure) im Gel fixiert. Nach einer weiteren Inkubation für 20 min in *Amplify*-Lösung (Amersham) bei RT wurde das Gel getrocknet. Durch dieses Reagenz werden die Signale schwacher β -Strahler wie ^3H oder ^{35}S verstärkt und so die Expositionszeiten gesenkt. Die Exposition von Röntgenfilmen erfolgte mit Verstärkerfolie bei -80°C.

6.3.12 Nachweis von Ubiquitin-konjugierten Proteinen

Durch das Anhängen des Proteins Ubiquitin an spezifische Lysinreste können Proteine für die Degradation durch das 26S-Proteasom gekennzeichnet werden. Um mono-oder polyubiquitinierte Proteine nachweisen zu können, muss das Proteasom durch Inhibitoren wie z. B. ALLN gehemmt werden. Es wurde die Ubiquitinierung von zellulären sowie von ektopisch exprimierten Proteinen nach Hsp90-Inhibition untersucht.

Namalwa-Zellen (2×10^7 Zellen pro Ansatz) oder transfizierte COS7-Zellen 24 h nach Transfektion (1 100-mm Schale pro Ansatz) wurden für 5,5 h mit dem Hsp90-Inhibitor Geldanamycin vorbehandelt (Kontrollansatz unbehandelt) und anschließend durch ALLN (50 µg/ml) für 1 h die proteasomale Degradation gehemmt. Zellextrakte wurden in Lysispuffer (siehe 6.1.7) unter Zusatz von 30 mM N-Ethylmaleimid präpariert. N-Ethylmaleimid dient der Inhibition von deubiquitinierenden Enzymen. Die Immunopräzipitation erfolgte nach Vorklärung der Extrakte mit ProteinA-Sepharose (1 h) über Nacht bei 4° C. Die Sepharose-Beads wurden 4x mit Lysispuffer gewaschen, in 10 µl 2x SDS-Probenpuffer 5 Min. aufgeköcht und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die ubiquitinierten Proteinspezies durch Inkubation der Membran mit anti-Ubiquitin Antikörper (4° C, über Nacht) nachgewiesen.

7. Abkürzungen

17-AAG	17-Allylamino-17-demethoxy-Geldanamycin
17-DMAG	17-Desmethoxy-17-N, N-dimethylaminoethylamino-Geldanamycin
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALLN	N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal
ARD	Ankyrin Repeat Domain
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
CK	Casein Kinase
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DD	Death Domain
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility Shift Assay
EtOH	Ethanol
FADD	Fas-R-assozierte DD
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin
GA	Geldanamycin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES buffered saline (HEPES gepufferte Kochsalzlösung)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
HRS	Hodgkin-/Reed-Sternberg
Hsp	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B Kinase
IL-1	Interleukin 1

IP	Immunopräzipitation
KA	Kinase-Assay, <i>in vitro</i> Kinase Versuch
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Broth Medium
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MOPS	γ -Morpholinopropansulfonsäure
mut	mutiert
NaAc	NatriumAcetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nb	nicht bestimmt
n.s.	nicht spezifisch
NEMO	NF- κ B Essential Modulator
NES	Kernexportsignal
NIK	NF- κ B Inducing Kinase
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
NLS	Kernlokalisierungssignal
NOD/SCID	Non-obese diabetic/severe combined Immunodeficiency Maus-Modell
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
P-IKK	Phospho-IKK
PMA	4 β -Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RHD	Rel Homologie Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RC	Radicicol
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRD	Signal Response Domäne
ss	singlestranded, einzelsträngig
T	Thymidin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TRAF	TNF Rezeptor assoziierter Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRADD	TNF Rezeptor assoziierte DD
U	Unit, Enzymeinheit
UV	ultraviolette Strahlung
wt	Wildtyp