

2. Material und Methoden

Die Reihenfolge der Abschnitte der Methoden entspricht grundsätzlich dem Ablauf der Arbeit: Zu Beginn wurden mit Hilfe molekularbiologischer Arbeitsschritte Hefeklone erzeugt, die durch genomische Integration der entsprechenden DNA zur Expression der gesuchten Fusionsproteine befähigt waren. Die von diesen Klonen exprimierten Proteine sind dann durch proteinbiochemische Methoden charakterisiert worden, um sie am Ende in funktionellen Assays auf ihre Funktionsfähigkeit zu untersuchen.

2.1. Material

2.1.1. Molekularbiologische und proteinchemische Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien, Lösungsmittel und Zusätze sind, wenn nicht anders beschrieben, von den Firmen Sigma, Steinheim oder Merck, Darmstadt in der höchsten Reinheitsstufe bezogen.

Zusätze, Lösungen, Chemikalien

| | |
|----------------------------|---------------------|
| PBS Dulbecco`s | GibcoBRL, Karlsruhe |
| ohne Calcium und Magnesium | |
| ohne Natriumbikarbonat | |
| IPTG | Roth, Karlsruhe |
| dNTP | Roche, Mannheim |
| Trypsin Sol 2.5% gepuffert | GibcoBRL, Karlsruhe |

2.1.2. Enzyme

| | | |
|--------------------|--------------------|----------------------------|
| Ligase | T 4 DNA Ligase | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
| Restriktionsenzyme | <i>Avr</i> II | National Lab, Mölln |
| | <i>Not</i> I | National Lab, Mölln |
| | <i>Sal</i> I | National Lab, Mölln |
| | <i>Spe</i> I | National Lab, Mölln |
| | <i>Pme</i> I | National Lab, Mölln |
| Polymerase | TAQ DNA Polymerase | Roche, Mannheim |

2.1.3. Primer

Alle Primer wurden von der Firma Metabion, München auf Bestellung synthetisiert und HPLC-gereinigt.

| | | |
|-----------------------|----|--|
| 5' AOX | 5' | GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC |
| 3' AOX | 5' | GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC |
| 5' A33rbCDdiagnostic | 5' | GGG AGC TCC AGA TGA CCC |
| 3' A33rbCDdiagnostic | 5' | CGT TTG TAA TCGATC GCT TCT GA |
| 5' A33rbGFPdiagnostic | 5' | GCG ATG GCC ATG GTG AGC CCT AGG GAG CTC CAG ATG AC |
| 3' A33rbGFPdiagnostic | 5' | TGT TCG GAT CCT GCG GCC GCT TAT TTG TAG AGC TCA TCC ATG CC |
| 5' CDyeast | 5' | CCT CAA CTA GTG GTG GAG GTG GAA GTG TGA CAG GGG GAA TGG CAA GC |
| 3' CDyeast | 5' | GGC GAA TTA ATT CGC GGC CGC TTA CTC ACC AAT ATC TTC AAA CCA ATC CTG AGG |

2.1.4. Vektoren und Plasmide

| | |
|----------|---------------------------|
| pET25 | Invitrogen, Groningen |
| pPIC 9 | Invitrogen, Groningen |
| pPIC 9 K | Invitrogen, Groningen |
| pORF-Fcy | InvivoGen, San Diego, USA |

2.1.5. Größenmarker

| | | |
|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Proteingrößenmarker | BENCHMARK Prestained Protein Ladder | GibcoBRL, Karlsruhe |
| | BENCHMARK Protein Ladder | GibcoBRL, Karlsruhe |
| | | |
| DNA-Größenmarker | 1 Kb DNA Ladder | GibcoBRL, Karlsruhe |
| | 100 bp DNA Ladder | BioLabs, Beverly, USA |
| | GeneRuler 1 kb DNA Ladder | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |

2.1.6. Antikörper und Nachweisreagenzien zur Proteincharakterisierung

| | | |
|----------------------|---|---|
| Primäre Antikörper | Maus, Anti-GFP | Dianova, München |
| Sekundäre Antikörper | Ziege, Anti-Maus-IgG Peroxidase gekoppelt | Transduction Laboratories, Lexington, USA |
| | | |
| Primäre Liganden | Protein L biotiniert | Pierce, Rockfort, USA |
| Sekundäre Liganden | Streptavidin Peroxidase gekoppelt | Pierce; Rockfort, USA |
| | | |

2.1.7. Molekularbiochemische Puffer

Ligationspuffer (10x) MBI Fermentas, St. Leon-Rot

| | | | |
|-----|----|------------------|--------|
| 400 | mM | Tris-HCl | |
| 100 | mM | Magnesiumchlorid | |
| 100 | mM | DTT | |
| 5 | mM | ATP | pH 7.8 |

Restriktionsenzym-puffer (10x) Amersham Pharmacia, Freiburg

| | | | |
|-----|----|-----------------|--------|
| 100 | mM | Tris-Acetat | |
| 100 | mM | Magnesiumacetat | |
| 500 | mM | Kaliumacetat | pH 7.5 |

TBE-Puffer GibcoBRL, Karlsruhe

| | | | |
|---------|----|----------------------|---------|
| 12.11 | g | Tris | |
| 5.56 | g | Borsäure | |
| 0.37 | g | Na ₂ EDTA | |
| ad 1000 | ml | H ₂ O | pH 8.33 |

PCR Reaktionspuffer (10x) Roche, Mannheim

| | | | |
|-----|----|-------------------|--------|
| 15 | mM | MgCl ₂ | |
| 100 | mM | Tris-HCl | |
| 500 | mM | KCl | pH 8.3 |

2.1.8. Proteinbiochemische Puffer, Lösungen und Reagenzien

Trenngelpuffer 1.5 M Tris / HCl pH 8.8

Sammelgelpuffer 0.5 M Tris / HCl pH 6.8

| | | | | |
|---------------------|--------|----|------------------|----------------------|
| Elektrodenpuffer | 60 | g | Tris | |
| (10x) | 188 | g | Glycin | |
| | 20 | g | SDS | |
| | ad 2 | l | H ₂ O | pH 8.8 |
| SDS 10% | 10 | g | SDS | |
| | ad 100 | ml | H ₂ O | |
| Semidry Blotpuffer | 39 | mM | Glycin | |
| | 48 | mM | Tris | |
| | 0.0373 | % | SDS | |
| | 20 | % | Methanol | |
| Probenpuffer (4x) | 25 | ml | Tris / HCl | |
| | 8 | g | SDS | |
| | 40 | ml | Glycerin | |
| | 40 | mg | Bromphenolblau | |
| | 8 | ml | Mercaptoethanol | |
| | ad 100 | ml | H ₂ O | pH 6.8 |
| Blockierpuffer A | 50 | ml | PBS | |
| | 1 | ml | Tween 20 | |
| | 2.5 | g | Magermilchpulver | Glücksklee, Reichelt |
| Blockierpuffer B | 50 | ml | PBS | |
| | 2.5 | g | Magermilchpulver | |
| Inkubationspuffer A | 2 | ml | Blockierpuffer A | |
| | 8 | ml | PBS | |
| Inkubationspuffer B | 50 | ml | PBS | |
| | 2.5 | g | Magermilchpulver | |

| | | | | |
|-------------|-----|---|-----------------|------------------|
| Färbelösung | 0.1 | % | Servablau R-250 | Merck, Darmstadt |
| Coomassie | 30 | % | Isopropanol | |
| | 10 | % | Essigsäure | |
| Entfärber | 30 | % | Isopropanol | |
| Coomassie | 10 | % | Essigsäure | |

2.1.9. Medien

2.1.9.1. Zellkultur

| | | | | |
|------|------|-------|--------------------|---------------------|
| RPMI | | | | GibcoBRL, Karlsruhe |
| mit | 10 | % | FCS | GibcoBRL, Karlsruhe |
| | 104 | U/ml | Penicillin | GibcoBRL, Karlsruhe |
| | 105 | µg/ml | Streptomycinsulfat | GibcoBRL, Karlsruhe |
| | 1.04 | mM | Na-Pyruvat | Sigma, Deisenhofen |
| | 3 | ml | Glutamax | GibcoBRL, Karlsruhe |
| | 3 | ml | Phenolrot | Sigma, Deisenhofen |

2.1.9.2. Hefekultur

| | | | | |
|------|---------|----|------------------------|---------------------------|
| BMMY | 10 | g | Hefeextrakt | Difco BD, Sparks, USA |
| | 20 | g | Pepton | Difco BD, Sparks, USA |
| | 13.4 | g | Yeast Nitrogen Base | |
| | 0.004 | g | Biotin | Invitrogen, Groningen, NL |
| | 5 | ml | Methanol | |
| | ad 1000 | ml | dest. H ₂ O | |

| | | | | |
|-------------|----------------------|----|------------------------|---------------------------|
| BMGY | 10 | g | Hefeextrakt | Difco BD, Sparks, USA |
| | 20 | g | Pepton | Difco BD, Sparks, USA |
| | 13.4 | g | Yeast Nitrogen Base | |
| | 0.004 | g | Biotin | Invitrogen, Groningen, NL |
| | 10 | ml | Glycerin | |
| | ad 1000 | ml | dest. H ₂ O | |
| RDH Platten | 186 | g | Sorbitol | |
| | 20 | g | Agar | |
| | 20 | g | D-Glucose | |
| | 3.4 | g | Yeast Nitrogen Base | |
| | 10 | g | Amoniumsulfat | |
| | 0.005 | % | L-Glutamat | |
| | 0.005 | % | L-Lysin | |
| | 0.005 | % | L-Leucin | |
| | 0.005 | % | L-Isoleucin | |
| | 0.005 | % | L-Methionin | |
| | 4 * 10 ⁻⁵ | % | Biotin | Invitrogen, Groningen, NL |
| | ad 1000 | ml | dest. H ₂ O | |
| | YPD Medium | 10 | g | Hefeextrakt |
| 20 | | g | Pepton | GibcoBRL, Karlsruhe |
| 20 | | g | D-Glucose | |
| ad 1000 | | ml | dest. H ₂ O | |

2.1.9.3. Bakterienkultur

| | | | | |
|----------------|---------|----|------------------------|---------------------|
| LB Medium Amp. | 10 | g | Pepton | GibcoBRL, Karlsruhe |
| | 5 | g | Hefeextrakt | |
| | 5 | g | Natriumchlorid | |
| | 1 | ml | Ampicillin 100 mg/ml | |
| | ad 1000 | ml | dest. H ₂ O | |

LB Agar Platten Amp.

| | | | |
|---------|----|------------------------|---------------------|
| 10 | g | Pepton | GibcoBRL, Karlsruhe |
| 5 | g | Hefeextrakt | |
| 5 | g | Natriumchlorid | |
| 1 | ml | Ampicillin 100 mg/ml | |
| 16 | g | Agar | |
| ad 1000 | ml | dest. H ₂ O | |

SOC Medium

GibcoBRL, Karlsruhe

| | | |
|-----|----|-------------------|
| 2 | % | Trypton |
| 0.5 | % | Hefeextrakt |
| 10 | mM | NaCl ₂ |
| 2.5 | mM | KCl |
| 10 | mM | MgCl ₂ |
| 10 | mM | MgSO ₄ |
| 20 | mM | Glukose |

2.1.10. Kompetente Zellen**2.1.10.1. Bakterien**

TOP 10F⁺ Invitrogen, Groningen, NL

2.1.10.2. Hefen

GS115 Invitrogen, Groningen, NL

KM71 Invitrogen, Groningen, NL

2.1.11. Zelllinien

COLO 205 American Type Culture Collection, Manassas, USA

LS-174-T Cell line service, Heidelberg

| | |
|----------|---|
| CX 2 | Cell line service, Heidelberg |
| CX 94 | Cell line service, Heidelberg |
| HCT 116 | American Type Culture Collection, Manassas, USA |
| HT 29 | American Type Culture Collection, Manassas, USA |
| LIM 1215 | Ludwig Institute of Cancer Research Melbourne Branch, Australia |

2.1.12. Laborinventar

| Inventar | Name | Hersteller, Ort |
|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Elektrophoreseausstattung | Mini-PROTEAN 3 Cell | Bio-Rad, München |
| Elektroporator | GenePulser | Bio-Rad, München |
| Feinwaage | Universal | Sartorius, Göttingen |
| Gelkammer für Agarosegels | Horizon 58 | GibcoBRL, Karlsruhe |
| Laborwaage | Sac 52 | SCALTEC, Heiligenstadt |
| Mikrowelle | Moulinex | Moulinex, Solingen |
| PCR Thermocycler | MultiCycler PCT 200 | Biozym, hess. Oldendorf |
| Photometer | GeneQuant II | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Pipettierhilfe | Eppendorf-Pipette | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfe | pipetus-akku | Hirschmann, Eberstadt |
| Power Supply | Power Pac 300 | Bio-Rad, München |
| Power Supply | PS 305 | GibcoBRL, Karlsruhe |
| Schüttler/Inkubator | SI 50 | Dunn Labortechnik, Asbach |
| Semidry Blot Transferkammer | Transblot SD | Bio-Rad, München |
| Sofortbildkamera | Polaroid | Polaroid, Offenbach |
| Thermoblock | Biometra Thermoblock | Biometra, Göttingen |
| Thermomixer | Eppendorf 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge | Eppendorf 5415 C | Eppendorf, Hamburg |
| UV Schirm | Reprostar II | Lamag, Berlin |
| Vortexer | VF 2 | IKA-Labortechnik |
| Zentrifuge | Eppendorf 5402 | Eppendorf, Hamburg |

2.1.13. Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Bezugsquelle, Ort |
|---|------------------------------|
| Hybond P (Transfermembran) | Amersham Pharmacia, Freiburg |
| Pipettenröhrchen | BD Falcon, Heidelberg |
| Pipettenspitzen | Brand GmbH, |
| Reaktionsgefäße | BD Falcon, Heidelberg |
| Röntgenfilme, Biomax Mr | Kodak |
| Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml | BD, Heidelberg |
| Whatman-Papier | Pierce, Rockfort, USA |
| Zellkulturflaschen | NUNC, Karlsruhe |
| Zellkulturschaber | BD, Heidelberg |

2.2. Kits

2.2.1. QIAprep Miniprep Plasmidisolierung

Prinzip:

Die Plasmid-DNA wird durch alkalische Lyse gewonnen und mittels Natriumacetatfällung und Ionenaustausch-Chromatographie isoliert und gereinigt.

Hersteller : Qiagen, Hilden

| | | |
|----------|---------------------|--------------------------------------|
| Inhalt : | Puffer P1 | RNase-A-haltiger Resuspensionspuffer |
| | Puffer P2 | Zellysepuffer |
| | Puffer N3 | Neutralisationspuffer |
| | Puffer PB | Entsalzungspuffer |
| | Puffer PE | ethanolhaltiger Waschpuffer |
| | QIAprep spin column | |
| | 2 ml Sammelgefäß | |

Anwendung :

Die Anwendung folgte der Anleitung des Herstellers. Eine Bakterienkultur wurde 12 h bei 37 °C und 150 U/min geschüttelt. Hiervon wurden 500 µl in ein gefrierfestes Gefäß gegeben und mit 50 µl Glycerin versetzt und gemischt. Das Gefäß wurde zur Aufbewahrung des

jeweiligen Klons bei -20°C eingefroren. Die verbleibende Kultur wurde 10 min bei 2500 G zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 250 μl P1 Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch gründliches Mischen in 250 μl P 2 Puffer lysiert und die Suspension anschließend durch gründliches Mischen mit 350 μl N 3 Puffer neutralisiert. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 500 G wurden unlösliche Bestandteile entfernt, vor allem ausgefälltes Protein und genomische DNA. Der verbleibende Überstand enthielt die gelöste Plasmid-DNA, die mittels einer Zentrifugations-Chromatographiesäule (QIAprep Spin Column) in einem 2 ml Sammelgefäß („Eppendorf-Röhrchen“) weiter gereinigt wurde. Durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte von je 30 s in einer Minizentrifuge bei ca. 10000 G wurde zuerst die Säule mit dem Plasmid-haltigen Überstand beladen, wobei die Plasmid-DNA aufgrund ihrer Ladung an das Gel der Säule band, dann wurde aus der Fällung übriggebliebenes Acetat und ungebundenes Material in zwei Schritten mit 500 μl PB Puffer und anschließend 750 μl PE Puffer ausgewaschen. Dabei wurde die letzte Zentrifugation ohne erneute Ethanolzugabe wiederholt, um die Säule vollständig zu trocknen. Daraufhin wurde die QIAprep Säule in ein neues Reaktionsgefäß umgesetzt und nach Zugabe von 50 μl sterilem Wasser 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch abschließende Zentrifugation bei 10000 G für 1 min wurde die gereinigte DNA eluiert.

2.2.2. HiSpeed Plasmid Purification Midi Kit

Prinzip:

Die Isolierung der Plasmid-DNA wird mit einer alkalischen Lyse, die Reinigung mit Hilfe einer Natriumacetatfällung und die Isolation durch eine Ionenaustauschersäule realisiert.

Hersteller : Qiagen, Hilden

| | | |
|----------|---------------------------|--------------------------------------|
| Inhalt : | Puffer P1 | RNase-A-haltiger Resuspensionspuffer |
| | Puffer P2 | Zellysepuffer |
| | Puffer P3 | Neutralisationspuffer |
| | Puffer QBT | Equilibrationspuffer |
| | Puffer QC | Waschpuffer |
| | Puffer QF | Elutionspuffer |
| | HiSpeed Midi Tips | DNA-bindende Säule |
| | QIAfilter Midi Cartridges | Zellysatfilter |

| | |
|-------------------|---------------------|
| QIAprecipitator | DNA-bindende Filter |
| 20 ml Spritze | |
| 5 ml Spritze | |
| 50 ml Sammelgefäß | |

Anwendung:

Die Anwendung folgte der Anleitung des Herstellers. Eine Bakterienkultur wurde 12 h bei 37 °C und 150 U/min geschüttelt. Hiervon wurden 500 µl in ein gefrierfestes Gefäß gegeben und mit 50 µl Glycerin versetzt und gemischt. Das Gefäß wurde zur Aufbewahrung des jeweiligen Klons bei -20 °C eingefroren. Die verbleibende Kultur wurde 10 min bei 2500 G zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 6 ml P1 Puffer resuspendiert. Durch Beifügen von 6 ml Puffer P2 wurden die Zellen innerhalb von 5 min lysiert. Dieses Gemisch wurde durch das Zusetzen von 6 ml Puffer P3 für 10 min neutralisiert und in eine verschlossene Filtersäule (QIAfilter) überführt. Während dieser Zeit wurde die Chromatographiesäule (HiSpeed Midi Tip) mit 4 ml Puffer QBT equilibriert. Mit Hilfe eines Spritzenkolbens wurde das Lysat unter leichtem Druck durch den QIAfilter gepresst und direkt auf den HiSpeed Midi Tip gegeben, um somit die gefällten Proteine abzutrennen. Die Plasmid-haltige Flüssigkeit lief mit Hilfe der Schwerkraft über die DNA-bindende Säule. Diese wurde dann mit 20 ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit Hilfe von 5 ml Puffer QF aus der Säule gelöst und in ein neues Sammelgefäß gegeben, wo sie zur Fällung mit dem 3.5 fachen Volumen Isopropanol für 5 min inkubiert wurde. Das Gemisch wurde in eine 20 ml Spritze umgefüllt und durch einen DNA-bindenden Filter (QIAprecipitator) gepresst, um die DNA zu isolieren. Der QIAprecipitator wurde mit 20 ml Luft getrocknet. Mit Hilfe der 5 ml Spritze wurde mit 1 ml sterilem Wasser die DNA aus dem QIAprecipitator gelöst und in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.2.3. Gel-Extraktions-Kit

Prinzip:

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA in einem Agarosegel wird eine einzelne Bande von Interesse ausgeschnitten. Dieses Agarosegelstück wird durch eine natriumjodidhaltige Lösung zersetzt und die freiwerdende DNA wird an Silicapartikel gebunden, um von diesen durch Waschprozeduren wieder eluiert zu werden.

Hersteller : Qiagen, Hilden

Inhalt : QIAEX II DNA-bindende Suspension

Puffer QX 1 Solubilizationspuffer

Puffer PE ethanolhaltiger Waschpuffer

Anwendung :

Die Anwendung folgte der Anleitung des Herstellers. Das ausgeschnittene Gelstück wurde gewogen und in einem Ansatz von einer Volumeneinheit Gel mit 3 Volumeneinheiten Puffer QX 1 gemischt. Das DNA-bindende QIAEX II wurde 30 s mit einem Vortex-Mixer gemischt, um es wieder in Suspension zu bringen. Bei einer DNA-Menge $< 2 \mu\text{g}$ wurde das Gel-Puffer-Gemisch mit $10 \mu\text{l}$ QIAEX II versetzt, bei DNA-Mengen zwischen $2 \mu\text{g}$ und $10 \mu\text{g}$ mit $30 \mu\text{l}$ QIAEX II. Das Gemisch wurde 10 min bei 50°C und 8000 U/min inkubiert, um das Agarosegel zu lösen. Die Reinigung der an die Silicapartikel gebundenen DNA erfolgte durch drei Waschprozeduren, wobei die erste mit $500 \mu\text{l}$ QX 1 Puffer und die beiden weiteren mit $500 \mu\text{l}$ PE Puffer durchgeführt wurden. Vor jeder Waschprozedur wurde mittels Vortex-Mixer durchmischt, um die Silicapartikel in Suspension zu bringen. Nach der Suspension im Puffer wurde bei 10000 G zentrifugiert, um die Partikel vom Puffer zu trennen. Der Rückstand nach dem letzten Waschschrift wurde unter einer sterilen Arbeitsbank 30 min getrocknet, um in $20 \mu\text{l}$ sterilem Wasser resuspendiert zu werden, damit sich die DNA im sterilen Wasser löste. Es wurde 5 min inkubiert und 30 s bei 10000 G zentrifugiert. Der Überstand mit der extrahierten DNA wurde abpipettiert.

2.2.4. Topo TA Cloning Kit

Prinzip:

Um DNA-Fragmente, die durch eine PCR synthetisiert wurden, zu propagieren, können diese in Plasmidvektoren kloniert und dann bakteriell vermehrt werden.

Das Enzym Taq-Polymerase addiert bei der Synthese von DNA-Fragmenten während einer PCR am 3' Ende des entstandenen DNA-Strangs einen Basenüberhang aus einem Desoxyadenosin (A). Der hier verwendete linearisierte Vektor besitzt an seinen flankierenden Enden einen Basenüberhang aus einem Desoxythymidin (T). Durch diese komplementären Enden wird die Ligation des synthetisierten DNA-Fragments in den Vektor ermöglicht. Die Topoisomerase I aus dem *Vaccinia Virus* bindet an der Doppelstrang-DNA und ligiert die

Basenpaare spezifisch nach einer 5'CCCTT Sequenz, die Teil des Vektors ist. Die Topoisomerase I ist kovalent an den Vektor gebunden. Diese Bindung kann durch einen 5'-Hydroxylrest des synthetisierten DNA-Fragments getrennt werden, wodurch die Topoisomerase I aktiviert wird und das DNA-Fragment mit dem Vektor ligiert. Dieses Vektorkonstrukt wird anschließend in chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen mittels Hitzeschock transformiert. Die transfizierten Klone besitzen durch ein Resistenzgen des Vektors einen Selektionsvorteil auf ampicillinhaltigen Agarböden und können somit identifiziert werden.

Hersteller : Invitrogen, Groningen

| | | |
|----------|------------|----------------------------|
| Inhalt : | Vektor | pCR II-TOPO (10ng/μl) |
| | Salzlösung | Puffer |
| | TOP 10F' | chemisch kompetente Zellen |

Anwendung :

Die Anwendung folgte der Anleitung des Herstellers. Es wurden 1 μl des pCR II-TOPO (10ng/μl) mit 2 μl des PCR-Ansatzes, 1 μl Salzlösung und 2 μl sterilem Wasser gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Ligation des PCR-Produkts mit dem Vektor zu ermöglichen. Zeitgleich wurden die chemisch kompetenten TOP 10F' Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2 μl des Gemisches mit dem ligierten Vektorkonstrukt und den TOP 10F' Zellen vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation des Vektorkonstrukts in die Bakterienzellen erfolgte durch einen 30 s langen Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden sofort wieder auf Eis inkubiert und mit 250 μl SOC Medium versetzt. Dieses Gemisch wurde unter Schütteln und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde je 50 μl auf ampicillinhaltigen Agarböden (0.1 g/l Ampicillin) ausgestrichen und 12 h bei 37°C inkubiert. Die wachsenden Klone wurden propagiert und mittels QIAprep miniprep Plasmidisolierung und Restriktionsspaltung auf ihre Integration überprüft.

2.3. Methoden

2.3.1. Molekularbiochemische Methoden

Alle Methoden die im Zusammenhang mit der Hefe des Stammes *Pichia pastoris* stehen, basierten auf Angaben aus dem Handbuch „Pichia Expression Manual“ (71) sowie aus „Pichia Protocols“ (65).

Alle molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders beschrieben, in Anlehnung an „Molecular Cloning – A Laboratory Manual“ (72) durchgeführt.

2.3.1.1. Restriktionsspaltung

Zur Überprüfung der Identität und Charakterisierung präparierter Plasmid-DNA sowie zur weiteren molekularbiologischen Manipulation wie der Linearisierung von Vektorkonstrukten zur anschließenden Ligation mit spezifischen DNA-Fragmenten wurden Restriktionsspaltungen durchgeführt. Restriktionsenzyme schneiden innerhalb einer DNA-Erkennungssequenz an einer bestimmten Stelle und lassen so definierte DNA-Fragmente entstehen, die von vorhersagbarer Anfangs- und Endsequenz und bei bekannter Gensequenz von vorhersagbarer Größe sind.

50 µl Ansatz: Es wurden 5 µl Restriktionsenzym-puffer mit jeweils 10000 U des Restriktionsenzym gemischt und mit der zu verdauenden DNA-Lösung auf 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde mindestens 2 h und maximal 12 h bei 37 °C inkubiert.

20 µl Ansatz: Es wurden 2 µl Restriktionsenzym-puffer mit jeweils 10000 U des Restriktionsenzym gemischt und mit der zu verdauenden DNA-Lösung auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde mindestens 2 h und maximal 12 h bei 37 °C inkubiert.

Am Ende der Inkubationszeit wurde ein Teil des Restriktionsansatz mit 1/10 Bromphenolblau versetzt. Hiermit wurde eine Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle und bildhaften Auswertung der Spaltung durchgeführt.

2.3.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

In einem Gleichspannungsfeld wandern DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Daraus ergeben sich zu jedem

Zeitpunkt unterschiedliche Wanderstrecken im Gel. Benutzt man Fragmente mit bekanntem Molekulargewicht (Marker), so kann man an deren Positionen im Gel die unbekannte Molekulargröße des zu untersuchenden Fragments abschätzen.

Die DNA wird mit Hilfe von Ethidiumbromid (EtBr) sichtbar gemacht, da dieses mit der DNA interkaliert und durch UV-Strahlung fluoresziert.

Die Agarose wurde in 0.5 fachem TBE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle bei 700 W bis zum Aufkochen erwärmt. Danach wurde EtBr in einem Verhältnis von 1 µl EtBr / 20 ml Gel zugesetzt und das flüssige Gel in eine Gelkammer gegossen, in der ein Gelkamm zur Taschenausformung steckte. Das Gel erkaltete auf Raumtemperatur, wodurch es fest wurde. Es wurde mit 0.5 fachem TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Lösungen wurden mit 1/10 des Volumens mit Bromphenolblau versetzt.

Der Gelkamm wurde entfernt, und die entstandenen Taschen wurden mit den Bromphenolblau versetzten DNA-Proben sowie einem Marker gefüllt. Es wurde eine Spannung angelegt (50 ml Gel 75 V, 100 ml Gel 120 V), wobei die DNA aufgrund ihrer negativen Außenladung in Richtung Anode lief. Über einer UV-Lichtquelle konnte das Wanderungsverhalten beobachtet und fotografisch festgehalten werden.

2.3.1.3. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente können unter Ausbildung von Phosphordiesterbindungen zu einem Strang ligiert werden. Dabei unterscheidet man die gerichtete von der ungerichteten Ligation. In dieser Arbeit ist nur die gerichtete Ligation zum Einsatz gekommen. Darunter versteht man die Ligierung von Fragmenten, deren Orientierung sich im neu synthetisierten Strang durch unterschiedliche komplementäre randständige Sequenzen von 5'- und 3'-Ende der zu ligierenden DNA-Sequenz ergibt.

Hierbei war das Verhältnis zwischen Vektor (1. DNA-Fragment) und Insert (2. DNA-Fragment) im Ansatz 1:3. Dieses Verhältnis wurde aufgrund des Fluoreszenzunterschieds der mit Ethidiumbromid interkalierten DNA-Banden im Agarosegel unter UV-Licht abgeschätzt.

Hiervon wurden 20 µl mit 2 µl Ligationspuffer und 1 µl Ligase versetzt und 4 h bei 16 °C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 65 °C inaktiviert.

2.3.1.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur DNA-Amplifizierung mit Hilfe von DNA-Polymerasen. Sie kann zu analytischen Zwecken, zur Manipulation von DNA oder zur Generierung neuer Sequenzabschnitte eingesetzt werden. Das Grundprinzip der PCR ist eine vielfach wiederholte DNA-Replikation durch DNA-Polymerasen anhand des komplementären Stranges als Vorlage. Technische Voraussetzungen sind die Verfügbarkeit thermostabiler DNA-Polymerasen und die Möglichkeit, einen vorprogrammierten Zyklus exakter Temperaturabfolgen vielfach reproduzierbar zu wiederholen. Für diese Aufgabe wurden spezielle Laborgeräte, sogenannte Thermocycler, verwendet.

In jedem Zyklus wird die Doppelstrang-DNA zuerst durch Erhitzung auf über 90°C denaturiert, so dass sie in Einzelsträngen vorliegt.

Im zweiten Schritt lagern sich kurze synthetische DNA-Sonden bekannter Sequenz, die sogenannten Primer, an die denaturierte DNA an. Diese Primer wurden als Paare eingesetzt, die Start- und Endpunkt der amplifizierten Sequenz definieren. Der Start- oder 5'-Primer entspricht exakt einem bekannten Abschnitt in der Nähe des 5'-Endes der DNA (bzw. des N-Terminus des kodierten Proteins), der End- oder 3'-Primer enthält die Komplementärsequenz zu einem Abschnitt in der Nähe des 3' Endes der DNA (bzw. des C-Terminus der kodierten Proteinsequenz). Die Temperatur dieses Anlagerungsschrittes (engl.: Annealing) hängt von den physikalischen Eigenschaften der jeweiligen Primer ab und liegt typischerweise zwischen 48 °C und 62 °C.

Im dritten Schritt bindet die DNA-Polymerase an Doppelstrang-Stücke aus Vorlagen-DNA und Primer und synthetisiert den fehlenden Komplementärstrang vom Primer ausgehend in 5'-3'-Richtung aus Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP), die der Reaktionslösung zugegeben wurden. Die am häufigsten verwendeten DNA-Polymerasen wurden aus *Thermophilus aquaticus* (taq DNA-Polymerase) und *Pyrococcus furiosus* (pfu DNA-Polymerase) isoliert. Die letztgenannte Polymerase hat eine Gegenlese-Funktion (engl.: Proofreading), welche die Fehlerhäufigkeit der Abschrift erheblich reduziert. Das Temperaturoptimum für beide Enzyme liegt zwischen 70 °C und 72 °C.

Im ersten Zyklus führt dieser dritte Schritt zu bidirektionalen Kopien der DNA-Vorlage von unbekannter Länge, da der Primer tatsächlich nur den Startpunkt der Reaktion definiert. Im folgenden Zyklus binden die Primer bereits in der Hälfte der Fälle an die im ersten Zyklus

synthetisierten Kopien, so dass die Abschrift mit deren 3'-Ende terminiert wird. Diese Kopien sind die erste Generation exakter Amplifikate mit der gewünschten, durch beide Primer definierten Länge. Ihre Zahl und damit ihr Anteil an der Gesamt-DNA in der Reaktionslösung verdoppelt sich mit jedem weiteren Zyklus, so dass in 30 Zyklen aus jedem Molekül der Vorlagen-DNA ca. 1 Milliarde Amplifikate gewonnen werden.

Analytische Anwendung:

Zur Feststellung der Integration des gesuchten Gens in das Hefegenom ist die PCR zur Anwendung gekommen.

Von den auf Agarplatten wachsenden Klonen wurde eine Pipettenspitze in 10 µl Aqua dest. resuspendiert und abwechselnd zwei mal bei -80 °C und +80 °C für 10 min lysiert. Die Ansätze wurden bei 10000 G zentrifugiert und jeweils 27 µl mit 5 µl 10x PCR-Reaktionspuffer, 5 µl 25 mM Magnesiumchlorid, 1 µl dNTP Gemisch (von jedem Nukleotid 25 mM), jeweils 1 µl der 10 pmol/µl konzentrierten diagnostischen Primer und 27 µl Aqua dest. sowie 5 µl mit 0.16 U/µl Taq-DNA-Polymerase versetzt.

Das Gemisch wurde für 30 Zyklen in einen PCR-Thermoblock gegeben, wobei die Reaktionsbedingungen für den Denaturierungsschritt 1 min bei 95 °C, für den Anlagerungsschritt 1 min bei 54 °C und für die Kettenverlängerung 1 min bei 72 °C waren.

Von den Ansätzen wurden 20 µl mit 1/10 des Volumens Bromphenolblau versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

Präparative und synthetische Anwendung:

Die PCR wurde darüber hinaus zur Präparation und Modifikation zu klonierender DNA-Abschnitte eingesetzt. Grundsätzlich wäre in diesem Fall eine Präparation von mRNA aus dem Spenderorganismus mit anschließender reverser Transkription der mRNA in sogenannte komplementäre DNA (cDNA) notwendig. Auf diese Weise würde bei höheren eukaryontischen Organismen erreicht, dass die in die kodierenden Exons eingestreuten nicht-kodierenden Intron-DNA-Abschnitte eliminiert werden und eine DNA zur Vorlage für die PCR genommen wird, die die tatsächlich exprimierten Kodons enthält.

Tatsächlich standen für die in dieser Arbeit verwendeten Proteine bereits Vektoren mit der entsprechenden cDNA zur Verfügung, so dass das praktische Vorgehen weitestgehend der

oben beschriebenen analytischen PCR entsprach. Anstelle der beschriebenen Zelllyse trat hier allerdings die bereits beschriebene Plasmidpräparation.

Die wesentliche Aufgabe der präparativen PCR bestand darin, an den beiden Enden der vorliegenden cDNA Signalsequenzen wie Start- oder Stop-Codons sowie Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme einzufügen oder zu entfernen. Für diese Modifikationen wurden die bereits im Materialteil vorgestellten Primersequenzen geplant, die zusammengefasst einen Anteil von je ca. 12 endständigen Nukleotiden der jeweiligen Originalsequenz (bzw., bei 3'-Primern, deren Komplementärsequenz) enthielten und daran nach außen anschließend die gewünschte Signal- oder Erkennungssequenz (bzw. deren Komplementärsequenz). Wie im Materialteil zu sehen, waren die so entstandenen Primer zum Teil von erheblicher Länge. Deshalb war eine sorgfältige Planung, die mit Hilfe der Software VectorNTI (Informax, Inc., Frederick, Maryland, USA) vorgenommen wurde, notwendig, um zu erreichen, dass die entstehenden Primer:

- möglichst ähnliche Schmelzpunkte mit ihren jeweiligen Partnern hatten, um eine einheitliche Anlagerungstemperatur in der PCR verwenden zu können,
- möglichst wenig interne komplementäre Sequenzen enthielten, die zur Formation von sogenannten Haarnadelstrukturen durch Eigenanlagerung führen konnten, und
- Anlagerung der Primer untereinander durch komplementäre Sequenzen (Primer-Dimere) zu verhindern.

2.3.1.5. Hitzeschock Transformation von Bakterien

Die durch kurzzeitige Erwärmung permeabel gewordene Zellwand der Bakterien erlaubt die Passage von als Plasmid vorliegender Fremd-DNA in das Zytosol. Das hier verwendete Plasmid übertrug mit dem Gen für beta-Lactamase eine Penicillin-Resistenz auf Plasmid-positive Bakterien, wodurch die Selektion von transformierten Klonen auf penicillinhaltigen Agarböden ermöglicht wird.

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 20 µl des Ligationsansatzes gemischt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte die Transformation innerhalb von 30 s bei 42 °C. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis gestellt und mit 250 µl SOC Medium versetzt und 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Der Ansatz wurde auf LB-Platten, die 0.1 g/l Ampicillin enthielten, ausgestrichen und 12 h bei 37 °C inkubiert. Die

nach 12 h gewachsenen Klone wurden mittels der QIAprep Miniprep Plasmidisolierung und anschließendem Restriktionsverdau auf das gesuchte Plasmid analysiert.

2.3.1.6. Elektroporation von Hefezellen

Das Einbringen von Fremd-DNA in eine Zelle mit Hilfe eines elektrischen Strompulses wird Elektroporation genannt. Dabei hat der Strompuls die Aufgabe, die Zellwand für kurze Zeit permeabel für die Fremd-DNA zu machen. Diese Technik wurde hier für Hefezellen des Stammes *Pichia pastoris* angewandt. In diesem Fall sollte die Fremd-DNA nach dem Eindringen in die Zelle stabil in das Hefegenom integriert und somit an alle Tochterzellen weitergegeben werden. Da der verwendete Vektor (pPIC 9 K) ein Gen trägt, das die Synthese von Histidin ermöglicht, wachsen Klone, die den Vektor in ihr Genom integriert haben, im Gegensatz zum Wildtyp auf Histidin-defizienten Agarböden. Darüber hinaus können diese Zellen mit Hilfe eines Kanamycin-Resistenzgens, das ebenfalls Bestandteil des Vektors (K) ist, durch das Zellgift G418 selektiert werden.

Bevor die Zellen transformiert wurden, mussten sie durch die folgenden Schritte kompetent gemacht werden: Innerhalb von 12 h ließ man eine 50 ml Kultur mit YPD Medium die *Pichia-pastoris*-Hefenstämmen (KM71 und GS115) bei 30 °C schüttelnd wachsen. Von dieser Kultur wurden 0.1-0.5 ml mit 500 ml YPD Medium versetzt und weitere 12 h bei 30 °C geschüttelt bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ zwischen 1.3 und 1.5. Die Kultur wurde 5 min bei 2000 G zentrifugiert und der Rückstand in 500 ml eiskaltem sterilen Wasser gelöst. Dieser Vorgang wurde zweimal mit absteigenden Flüssigkeitsvolumina (250 ml, 20 ml) wiederholt. Der Zellrückstand des letzten Zentrifugationsschritts wurde in 1.5 ml eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen.

Für die Elektroporation wurden 80 µl der Hefe-Sorbitol-Suspension pro Ansatz verwendet, die mit 5-20 µg linearisierter DNA versetzt und in der Elektroporationsküvette 5 min aus Eis inkubiert wurden. Der Ansatz wurde bei 1500 V, 25 µF und 200 Ω transformiert und anschließend mit 1 ml eiskaltem 1 M Sorbitol versetzt. Hiervon wurden jeweils 300 µl auf Histidin-defiziente RDH-Agarplatten ausgestrichen und für 5 Tage bei 30 °C inkubiert.

Die hierauf gewachsenen Klone wurden dann auf YPD-Agarplatten mit 1 mg/ml, 2 mg/ml und 4 mg/ml G418 ausgestrichen und 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Die hier wachsenden Klone wurden einer analytischen PCR unterzogen.

2.3.2. Proteinbiochemische Methoden

Alle proteinbiochemischen Methoden wurden, wenn nicht anders beschrieben, in Anlehnung an „Current Protocols in Protein Science“ (73) durchgeführt.

2.3.2.1. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Gelelektrophorese ist ein Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld genutzt wird. Das Wanderungsverhalten hängt von der Porengröße des Gels, der angelegten Spannung, sowie der Größe und Ladung des sich bewegenden Makromoleküls ab.

Es wurde ein 10% Trenngel gegossen, indem 1.0 ml Trenngelpuffer, 1.34 ml Polyacrylamid, 1.66 ml Wasser, 0.04 ml 10%iges SDS, 3 µl TEMED und 20 µl APS zusammengegeben wurden. Dieses Gemisch wurde in die vorbereitete Gelgießstation zwischen zwei senkrecht stehende Glasplatten mit dem gewünschten Abstand gegeben und mit Wasser überschichtet. Nach 15 min war das Trenngel zwischen den zwei Glasplatten auspolymerisiert. Hierauf wurde das Sammelgel gegossen, indem 0.5 ml Sammelgelpuffer, 0.333 ml Polyacrylamid, 1.17 ml Wasser, 0.02 ml 10%iges SDS, 1 µl TEMED und 10 µl APS zusammengegeben wurden; dieses Gemisch wurde direkt auf das Trenngel gegossen. In das Sammelgel wurde ein Gelkamm gesteckt, damit das Gel in Taschenform polymerisierte. Die Gele wurden in die Elektrode eingespannt, welche in einem Elektrodenpufferbad stand.

Die Proben wurden in die Geltaschen geben, wobei sie vorher mit 4-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und 15 min bei 80 °C inkubiert wurden, um sie zu denaturieren.

Danach wurde an die Elektroden eine Gleichspannung von 90 V angelegt, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten und eine gemeinsame, anhand des gefärbten Probenpuffers erkennbare Lauffront bildeten. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Spannung auf 140 V erhöht, bis die Lauffront gerade das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.3.2.2. Transfermethode: halbtrockener (semi dry) Western Blot

Die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im SDS-Trenngel wurden auf eine Trägermembran übertragen und immobilisiert. Da das Aufteilungsmuster des Gels erhalten blieb, entstand eine exakte Kopie des Gels auf der Transfermembran.

Das mit den aufgetrennten Proteinen beladene Gel wurde 10 min in Blotpuffer equilibriert und auf eine mit Blotpuffer benetzte Transfermembran gelegt, die oben und unten mit jeweils zwei ebenfalls mit Blotpuffer benetzten Spezial-Filterpapieren (Whatman Papieren) bedeckt wurde. Dieses Sandwich wurde in eine Semidry-Blotkammer eingelegt, an die 25 min lang 12 V Gleichspannung angelegt wurde (Abb. 3.1.).

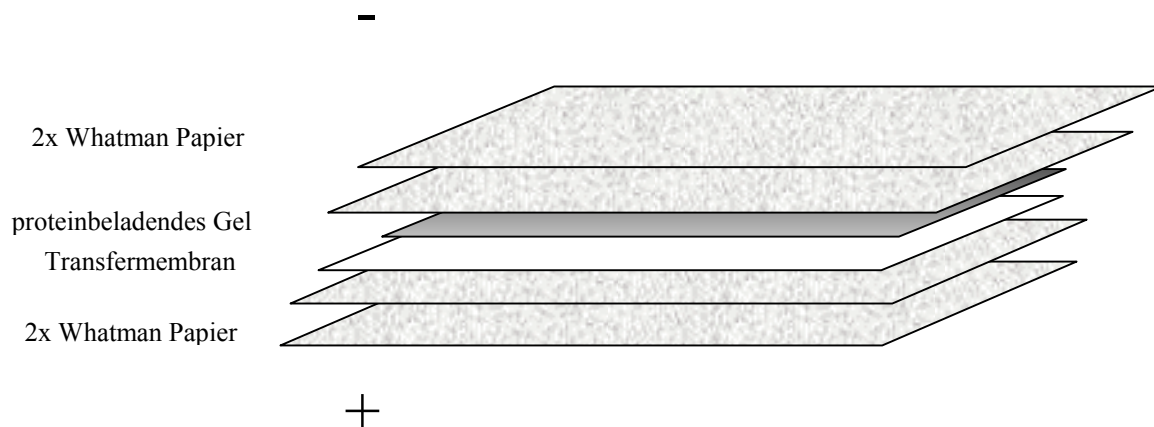


Abb. 3.1. Schematischer Aufbau eines Blot-Sandwichs. Die Proteine bewegen sich aufgrund ihrer negativen Ausladung durch die angelegte Spannung vom Gel auf die Transfermembran in Richtung der Anode (+).

2.3.2.3. Antikörper und Liganden beim Western Blot

Die Antikörper und Liganden dienen der Charakterisierung von Proteinen. Zur Darstellung der Single-Chain-Komponente wurde als Ligand Protein L verwendet, von dem $0.125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Nitrozellulosemembran eingesetzt wurde. Als sekundärer Ligand an Protein L wurde $0.125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Nitrozellulosemembran Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin eingesetzt. Vor der Inkubation mit Protein L wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit Blockierpuffer A für 30 min blockiert. Zwischen dem Wechsel der Nachweisreagenzien

sowie vor der Inkubation mit BCL- Reagenz wurde der Blot drei Mal für jeweils 10 min mit dem Inkubationspuffer A inkubiert, um nicht gebundenes Nachweisreagenz abzuwaschen.

Das gekoppelte Green-Fluorescent-Protein (GFP) wurde mit einem 1:2000 verdünnten murinen Anti-GFP-Antikörper zur Darstellung gebracht. Als sekundärer Antikörper gegen den murinen Anti-GFP-Antikörper wurde ein von der Ziege stammender Peroxidase-gekoppelter anti-Maus-Antikörper 1:2000 verdünnt eingesetzt. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungen wurde Blockierpuffer B und zum Waschen Inkubationspuffer B verwendet.

Die Peroxidase katalysierte eine quantitativ fluoreszenzgebende Reaktion des BCL-Reagenz', das dadurch mittels eines Röntgenfilms detektiert werden konnte.

2.3.2.4. Coomassie-Färbung von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen

Die Coomassie-Färbung ist eine unspezifische Färbung aller Proteine, die sich im Gel befinden. Dazu wird das zu färbende Gel direkt nach dem Ende der Elektrophorese in die Färbelösung überführt und 30 min unter mildem Schütteln inkubiert. Danach wird das Gel für 1 h mit der Entfärbelösung weiterhin unter Schütteln inkubiert und anschließend für 2 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet.

2.3.3. Kulturen von Tumorzelllinien

Für die Kultivierung und Propagierung der verwendeten Tumorzelllinien wurden ausschließlich sterile Lösungen und Medien verwendet, und die Vorkehrungen zum sterilen Arbeiten unter einer Sterilarbeitsbank wurden beachtet. Die hier beschriebenen Arbeitsschritte glichen sich für alle Zelllinien.

Die hier verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent in Kulturflaschen von 50 ml Volumen. Das adhärente Wachstum erforderte eine Inkubation in trypsinhaltiger Lösung, um die Zellen in Suspension zu überführen. Hierzu wurden sie 15-30 min mit 5 ml 0.025%iger Trypsin-Lösung inkubiert und mit 10 ml Medium unter dem Druck einer serologischen Pipette vom Boden der Kulturflaschen abgespült. Die Zellsuspension wurde mit Medium auf 20 ml aufgefüllt und 5 min bei 500 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Zellrückstand in 10 ml PBS aufgenommen und entweder für Experimente genutzt oder zu je

1-2 ml in eine mit 50 ml Medium gefüllte Kulturflasche gegeben. Die Kulturflaschen wurden 3 Tage bei 37 °C und 3.5% Kohlendioxid der Raumluft in einem Brutschrank inkubiert.

2.3.4. Bakterienkultur

Die plasmidtragenden Bakterien-Klone wurden zur Expression der gesuchten Proteine in flüssigen Medien kultiviert.

In einem 250 ml Rundkolben wurden 50 ml LB Amp Medium, das 0.1g/l Ampicillin enthielt, mit einer Pipettenspitze eines Klones versetzt und bis zum Erreichen einer Dichte von OD₆₀₀ von 1.0 bei 37 °C und 150 U/min inkubiert. Zur Induktion wurde die Kultur mit 0.1 mM IPTG versetzt und über Nacht unter den genannten Bedingungen weiter inkubiert. Die Kultur wurde auf die Expression des gesuchten Proteins untersucht.

2.3.5. Hefezellkulturen

Die transformierten Klone wurden zur Expression der gesuchten Proteine in flüssigen Medien kultiviert. Bezüglich Kulturvolumen und Menge des exprimierten Proteins werden zwei Expressionsmaßstäbe voneinander unterschieden: Suche und Produktion.

Suche: Von auf Kanamycin-haltigen Platten wachsenden Klonen wurde eine Pipettenspitze in 5 ml BMGY für 24 h in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 150 U/min und 30 °C aufgezogen. Hiervon wurden 1.5 ml in ein gefrierfestes Röhrchen gegeben, mit 50 µl sterilem Glycerin versetzt und bei -80 °C eingefroren. Die verbleibende Hefekultur wurde bei 500 G für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. In einem weiteren 50 ml Reaktionsgefäß mit 5 ml BMMY wurden so viele Hefezellen resuspendiert, bis diese Kultur eine OD₆₀₀ von 1-3 hatte. Diese Kultur wurde alle 24 h mit 0.5% Methanol versetzt und bei 150 U/min und 30 °C gehalten. Nach 3 Tagen wurde der Überstand nach dem gesuchten Protein durch einen Western Blot analysiert.

Produktion: Von den tiefgefrorenen Kulturen wurde eine Pipettenspitze in 50 ml BMGY resuspendiert und für 24 h in einem 250 ml Reaktionskolben bei 150 U/min und 30 °C aufgezogen. Die Hefekultur wurde bei 500 G für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. In einem 1000 ml Reaktionskolben mit 250 ml BMMY wurden so viele Hefezellen resuspendiert, bis diese Kultur eine Absorption bei OD₆₀₀ von 1-3 hatte. Diese

Kultur wurde alle 24 h mit 0.5% Methanol versetzt und bei 150 U/min und 30 °C gehalten. Nach 3 Tagen wurde der Überstand nach dem gesuchten Protein analysiert. Der Überstand wurde auf 50 ml Sammelgefäße verteilt und bei -80 °C gelagert.

2.3.6. Immunhistologie

2.3.6.1. Fluoreszenzmikroskopie

Um die Fluoreszenz des an die Tumorzellen gebundenen A33rbGFP Antikörpers zu visualisieren, wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit einer Lichtquelle der Wellenlänge 325 -345 nm benutzt. Durch dieses Licht wurde das GFP zum Abstrahlen von grünem Licht angeregt.

Zellen der Linie LIM 1215 wurden durch Abschaben von der Kulturflasche in Einzelsuspension mit PBS überführt und auf einem Objektträger angetrocknet. Die in der Propagierung der Zellen verwendete Trypsinierung kam hier nicht zur Anwendung, da sie kurzfristige Änderungen der Antigendichte auf der Zelloberfläche bewirken kann. Der Objektträger wurde 20 min in ein Acetat-Bad getaucht, danach mit PBS gespült und getrocknet. Die so präparierten Zellen wurden 20 min mit 100 µl A33rbGFP-haltigem Kulturüberstand inkubiert, in einem PBS-Bad für 10 min gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt und fotografiert. Die Auswertung wurde durch einen Blindversuch objektiviert, indem die Fluoreszenzmikroskopie von einer Person beurteilt wurde, die keine Informationen über die Inkubation der Zellen (Puffer oder Kulturüberstand) hatte.

2.3.6.2. Fluoreszenzdurchflusszytometrie (FACS)

Alle methodischen Abläufe beziehen sich auf „Current Protocols in Cytometry“ (74).

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das eine gleichzeitige Messung der Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen erlaubt. Diese Messung wurde realisiert, indem eine Einzelzellsuspension aus einer Messküvette angesaugt und durch die sogenannte hydrodynamische Fokussierung so von einer Spülflüssigkeit umgeben wurde, dass die Zellen einzeln einen Argon-Ionen-Laser passierten, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm

emittierte. Das von den Zellen hierdurch abgestrahlte Licht wurde von fünf Detektoren gemessen, von denen drei die Fluoreszenzemission und zwei weitere die Lichtbrechung analysierten. Ein Detektor zur Analyse der Lichtbrechung misst die Vorwärtsstreuung entlang des Anregungsstrahls (forward scatter, FSC), der andere misst die Seitwärtsstreuung, die im rechten Winkel zum Anregungsstrahl abgegeben wird (side scatter, SSC). Die Vorwärtsstreuung erlaubt Rückschlüsse auf die Zellgröße, die Seitwärtsstreuung ist von der Granularität einer Zelle abhängig.

Darüber hinaus werden die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen von drei Detektoren gemessen, die verschiedene Emissionsmaxima erfassen. Da die Zellen mit dem A33rbGFP Fusionsantikörper inkubiert wurden, erfolgte die Analyse der Fluoreszenzänderungen mittels eines Detektors für Licht der Wellenlänge 325 – 345 nm (Kanal 1). Diese Wellenlänge entspricht dem Wellenspektrum des Green-Fluorescent-Protein nach Anregung mit UV-Licht. Um vergleichbare Messwerte für alle Experimente zu erhalten, wurde ein „life-gate“ definiert, das Zelltrümmer und kleine Partikel von der Messung ausschloss. Dieses Gate (Gate 1) beinhaltete alle Zellen innerhalb einer definierten Schwankungsbreite in den Streulichteigenschaften und der Granularität (Abb. 3.33.). Gate 1 wurde dann mit einem Gate 2 über eine Boole'sche UND-Verknüpfung ausgewertet. Gate 2 grenzte alle Zellen aus, die in Kanal 1 eine Fluoreszenzintensität kleiner oder gleich 1 besaßen, um so die Autofluoreszenz der Zellen auszufiltern. Aus dieser Verknüpfung entstand ein rechnerisches Gate 3, dessen Messwerte vollständig erfasst und ausgewertet wurden.

2.3.6.3. Inkubation der Zelllinien mit Antikörpern oder Fusionsantikörpern

Es wurde eine PBS-Zell-Suspension hergestellt, indem mit einem Zellschaber die adhären Zellen vom Boden der Kulturflaschen abgelöst wurden. Diese Zellsuspension wurde nach Zählung in der Neubauer-Kammer auf eine definierte Konzentration eingestellt, und 10^6 Zellen wurden mit einem gelösten Antikörper oder Fusionsantikörper im Überschuss inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zum Auswaschen von nicht gebundenen Antikörpern bei 8000 G für 15 s zentrifugiert und in 300 µl PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Bei einschrittigen Assays wurde hiernach die Zellsuspension im Durchflusszytometer analysiert. Bei zweischrittigen Assays schloss sich die zweite Färbung analog zur ersten an.