

### 3.1.6 Antikörper und Enzym-konjugierte Nachweisantikörper

anti-Rind MHC II (bo 191)	H.J. Schubert, Hannover
anti-Rind MHC II (bo 139)	H.J. Schubert
anti-Maus IgG-Magnetic Beads	Serotec, England
anti-Penta-His	Invitrogen, Groningen (NL)
anti-Tetra-His	Qiagen, Hilden
Kaninchen anti Mensch IFN (PAK)	Serotec, Eching
Kaninchen anti Mensch IFN (PAK)	Strathmann Biotech, Hannover
Schaf anti Mensch IFN (PAK)	Strathmann Biotech
Ziege anti Maus Ig (AP)	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen Ig (AP)	Dianova
Kaninchen anti Schaf Ig (AP)	Dianova
anti Mensch HLA-DR, DP, DQ (Klon: TÜ39, FITC)	PharMingen, Heidelberg
anti Mensch CD86 (Klon: IT2.2, PE)	PharMingen
Schaf anti Maus (POD)	Dianova
Maus IgG2b (Isotypkontrolle, FITC)	PharMingen
Maus IgG2a (Isotypkontrolle, FITC)	Serotec

### 3.1.7 Enzyme und Reaktionskits

Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, USA
T4 DNA Ligase	Gibco, Karlsruhe
P-PER	Pierce, Bonn
B-PER II	Pierce
dNTPs	MBI Fermentas, USA
S.N.A.P MidiPrep Kit	Invitrogen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
QIAGEN PCR/HotStar Taq	Qiagen
MMLV (H-)	Promega, Mannheim
Omniscript	Qiagen
Thermoscript	Gibco

### 3.1.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid	Gibco
Acrylase	Stratagene
Agarose	Gibco
Antibiotika: Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma
Cabenicillin	Sigma
Rifampicin	Sigma
Gentamycin	Biochrom, Berlin
L-Arabinose	Sigma
Bisacrylamid	Gibco
Bovines Serumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Blutbeutel 500 ml	Biotest, Dreieich
Ca-Ionophor	Sigma
Concanavalin A (ConA)	Sigma
DMSO	Sigma

EDTAx2H <sub>2</sub> O	Serva
Ethidiumbromid	Serva
FICOLL 1,077	Biochrom
FICOLL 1.090	Biochrom
Freundsches Adjuvans	Gibco
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HAT/HT	Sigma
Hepes	Roche
Hexan	Sigma
Kälberseren	Biochrom
Fetales Kälberserum (FKS)	
Neonatales Kälberserum (NKS)	
Nähragar	Difco, Heidelberg
Orange G-Ladepuffer	Sigma
PEG	Roche
Phorbol 12-Myrisat 13-Acetat (PMA)	Sigma
Phythämagglutinin (PHA)	Sigma
Pokeweed Mitogen (PWM)	Sigma
Sodiumdodecylsulfat	Serva
TEMED	Roth
Tris	Serva
Zellkulturmedien	Biochrom
DMEM	
RPMI 1640	
Marker für SDS-PAGE	Amersham, Freiburg
Filterpapier NA 45	Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrocellulose-Filterpapier	Schleicher & Schuell
Röntgenfilm -max	Kodak, New York (USA)
Zellkulturplatten	Biochrom
Milliporefilter	Millipore, Eschborn
Eppendorfgefäße, Pipettenspitzen	Eppendorf, Köln
Nylonsieb	Becton Dickinson, Heidelberg

### 3.1.9 Geräte und sonstiges Zubehör

CO <sub>2</sub> -Feuchtbrutschrank	Heraeus, Berlin
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Göttingen
Thermoschüttler	B. Braun, Biotech
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf/Heraeus
UV-Transilluminator	Biometra
Varifuge 3.2 RS	Heraeus
Sorvall RC-5B	DuPont, Bad Homburg
Western-Blot-Gerätschaft	Biometra
Elektrotransformationsapparatur	BioRad, München

Weitere Standardchemikalien wurden von Merck (Darmstadt) oder Fluka (Neu-Ulm) bezogen.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Isolierung von DC aus der Haut

Lösungen, Reagenzien:

Dispase II (neutrale protease II) (Boehringer Mannheim)	1,2 U/ml in Aqua bidest., sterilfiltriert
DNase (Boehringer Mannheim)	10000 U/ml Stammlösung, gelöst in 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA, 50% Glycerin; pH 7,6
PBS (Phosphat Buffered Saline), pH 7,4	
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	8,0 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

Zur Isolierung dendritischer Zellen (DC) wurde die Haut von Pferden, die nicht länger als 24 h tot waren, verwendet. Die angewendete Methode beruht auf Protokollen der Kollegen Romani, Elbe-Bürger und Moll für die Isolierung von Maus-DC (persönliche Mitteilungen), die für das Pferd adaptiert wurde.

Die entnommene Haut wurde zunächst mit Wasser und Seife gereinigt, dann wurde das Fell mit einer Skalpellklinge rasiert und das Bindegewebe weitestgehend entfernt. Dieser Hautlappen wurde für 30 sec in 70% Alkohol desinfiziert. Auf einer sterilen Petrischale wurde er in 0,5 cm x 0,5 cm kleine Stücke zerschnitten, die danach 3 x in PBS gewaschen wurden. Die Probe wurde in einer 5 cm großen Petrischale verteilt und mit 5 ml Dispase II (1,2 U/ml) versetzt. Nach 3 h bei 37°C im Brutschrank wurde die Probe über Nacht bei +4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Epidermis vorsichtig mit einer Skalpellklinge von der Dermis abgelöst und in 5 ml RPMI mit 10% FCS aufgenommen. Die Epidermiszellen wurden mit einem Pistill durch ein Nylonsieb (Cell Strainer, Becton Dickinson) gedrückt und in 20 ml RPMI mit 10% FCS aufgefangen. Nach Zugabe von 10 µl DNase wurden sie bei Raumtemperatur für 20 min auf den Schüttler gestellt und danach 5 min bei 1500 U/min (Minifuge 2, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und mit 20 µl Anti-MHC II (10 µl bo191 und 10 µl bo139) für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Röhrchen auf 10 ml mit PBS aufgefüllt und 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der

Überstand wurde wiederum verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl RPMI mit 10% FCS gelöst und nach Zugabe von 10 µl Anti-Mouse-Beads (Dynal) für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurden 2 ml PBS zugegeben und das Röhrchen in eine Magnethalterung gestellt. Nach 3 min wurde die nicht am Magneten gebundene Probe vorsichtig entfernt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden die gebundenen Zellen in 1 ml RPMI mit 10% FCS aufgenommen und für 3 h in den Brutschrank gestellt. Die Aufreinigung mit den Magneten wurde danach wiederholt.

### 3.2.2 Isolierung von DC aus den Lymphknoten

Lösungen, Reagenzien:

PBS                                    siehe 3.2.1

Collagenase D                    0,1 g Collagenase D in 5 ml HBSS lösen und  
(Roche)                            sterilfiltriert

HBSS (Hanks balanced salt solution), pH 7,4

KCl	5,4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 mM
NaHCO <sub>3</sub>	4,2 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,3 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
MgSO <sub>4</sub>	0,6 mM
NaCl	137 mM
D-Glucose	5,6 mM
Phenolrot	0,02%
Aqua bidest.	ad 1 l

Die Isolierung von DC aus dem Lymphknoten erfolgte nach der Beschreibung von Inaba und Mitarbeitern (1998) mit einigen Modifikationen. Um die DC aus equinen Lymphknoten gewinnen zu können, wurde dieser zunächst sehr fein zerkleinert und in PBS mehrmals gewaschen. Zum Verdau wurde 1 ml Collagenase D, 5 ml HBSS, 5 ml PBS und 5 ml serumfreies RPMI-Medium hinzugegeben und 90 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zugabe von 20 µl DNase wurde 30 min geschüttelt. Die Probe wurde zur weiteren Aufreinigung durch ein Nylonsieb gegeben. Nach 5 min Zentrifugieren wurde das Pellet in 6 ml Medium resuspendiert, auf 5 ml FICOLL (1.077) geschichtet und 15 min bei 1200 U/min (Minifuge 2, Heraeus) zentrifugiert. Die mittlere Bande wurde vorsichtig gewonnen und mit PBS



Differenzierung wurden den Zellen rekombinante Proteine (z.B. IL-4, GM-CSF, IFN ) zugesetzt. Nach unterschiedlicher Inkubationszeit wurden die monozytären Zellen für weitere Untersuchungen verwendet.

Die nicht-adhärenenten Zellen wurden mit 4 µl ConA (Endkonzentration: 20 µg/ml), 4 µl PWM (2 µg/ml), 4 µl PHA (2 µg/ml) oder je 2 µl PMA (0,1 µg/ml)/Ca-Ionophor (1 µg/ml) stimuliert und nach 1-3 d Inkubation bei 37°C für die RNA-Extraktion gewonnen.

### **3.3 Morphologische Untersuchungen**

#### **3.3.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen**

Zum Nachweis der dendritischen Zellen (DC) der Haut (Langerhans Zellen) von Pferden wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin, histologische Präparate der Dermis, der Epidermis, der gesamten Haut und der Haut des Ohres angefertigt. Die in 4%igem Formalin mindestens 24 h fixierten Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x70 %, 2x96 %, 2x100 %) sowie in Xylol entwässert und entfettet. Anschließend bei 60°C in Paraffin eingebettet und mit einem Tetranderмикrotom (Jung, Heidelberg) 5-7 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet und 24-36 h im Brutschrank bei 60°C nachgetrocknet. Die getrockneten Präparate wurden in Xylol 10 min entparaffinisiert, in einer absteigenden Alkoholreihe (100% - 50%) rehydratisiert und in Aqua bidest. überführt. Zur lichtmikroskopischen Untersuchung wurden die Hautproben mit Hämatoxyllin - Eosin (HE) nach Hansen gefärbt (Romeis, 1989). Bei dieser Färbung stellen sich die Zellkerne blau, das Bindegewebe und die Muskulatur rosa und der Knorpel blaßblau bis violett dar. Daneben wurden zur Darstellung der Basalmembranen sowohl Grocott-Färbung, als auch die Perjod-Acid-Schiff-Färbung (PAS) eingesetzt (Romeis, 1989). Grocott führt zu einer dunklen Färbung der Schleimstoffe u.a. der Glykoproteine und zu einer grün Färbung des Gewebes. Das Prinzip PAS-Reaktion beruht auf der Oxidation der an Kohlenhydraten enthaltenen OH-Gruppen mit Perjodsäure zu Aldehyden, die einen roten Farbstoff bilden.

Die aus Pferdeblut isolierten monozytären Zellen wurden mit Glutaraldehyd (Endkonzentration 2,5%) fixiert, lichtmikroskopisch untersucht und anschließend

auf Objektträger zentrifugiert, nach Pappenheim (Romeis, 1989) gefärbt und dann nochmals untersucht.

### 3.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Lösungen:

Agargemisch (mittlere Härte):

Agar 100	20 ml
DDSA	16 ml
MNA	8 ml
BDMA	1,3 ml

Natriumphosphatpuffer, pH 7,2:

Lsg. A: $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8,9 g ad 500 ml Aqua bidest.
Lsg. B: $\text{NaH}_2\text{PO}_4$	6,9 g ad 500 ml Aqua bidest.
2/3 Lsg. A und 1/3 Lsg. B, pH 7,2 einstellen und sterilfiltrieren.	

Die monozytären Zellen wurden mit 2,5%igem Glutaraldehyd fixiert, in Eppendorfröhrchen überführt und bei 9000 U/min (Eppendorf, Zentrifuge 5403) 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Veterinär-Pathologie der FU Berlin, dreimal 10 min mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, gewaschen (9000 U/5 min), in 1%igem Osmiumtetroxid 3 h vorkontrastiert und erneut (s.o.) gewaschen. Danach wurde es mit 30% EtOH 10 min, mit 50% EtOH ebenfalls 10 min und anschließend mit 70% EtOH mit Uranylacetat und Phosphorwolframsäure behandelt. Über Nacht wurde die Probe mit abs. Alkohol 10 min dehydratisiert und daraufhin zweimal in Propylenoxid gewaschen (9000 U/5 min). Die Zellen wurden in ein Agargemisch mittlerer Härte gebettet. Die Aushärtung erfolgte im Eppendorfgesäß bei 50°C und 24 h im Brutschrank. Von den fertigen Blöcken wurde mit dem TM-60 (Reichert-Jung) der überschüssige Agar getrimmt.

Aus dem angespitzten Block wurden mit dem ULTRACUT S (Reichert-Jung) 35 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt und die Schnittbänder auf Netze verbracht. Die Nachkontrastierung nach Reynolds (1963) erfolgte 5 min in Uranylacetat (Leica) und nach zweimaligem Spülen mit Aqua bidest. 10 min in Bleicitrat (Leica). Nach erneutem Spülen in Aqua bidest. wurde das Präparat





### 3.3.4 Gemischte Leukozytenreaktion (MLR)

Lösungen:

HCl 0,1 M

PBS siehe 3.2.1

PBS/1% FCS

Die funktionelle Eigenschaft der T Zell Stimulation wurde aufgrund der Stimulationskapazität monozytärer Zellen in der gemischte Leukozytenreaktion (MLR) bestimmt. In die Reaktion wurden monozytäre Zellen (3.2.3) von einem Pferd eingesetzt und mit frisch isolierten T Lymphozyten eines zweiten Pferdes kokultiviert.

Zur Gewinnung von T Lymphozyten wurden PBMC isoliert (3.2.3) und in diesem Fall die nicht-adhärenen Lymphozyten abgenommen. Für die weitere Isolierung der T Lymphozyten wurden Nylonwolle-Säulen vorbereitet (Julius et al., 1973). Die Nylonwolle wurde 30 min in 0,1 M HCl gewaschen und dann mehrere Tage in Aqua bidest. gewässert. Anschließend wurde sie getrocknet, gezupft, in Spritzen (als Säule) gestopft und autoklaviert. Unmittelbar vor Verwendung wurden die Säulen mehrfach mit PBS/ 1% FCS und warmem RPMI-Medium gewaschen. Die nicht-adhärenen PBMC wurden in 37°C warmem RPMI-Medium aufgenommen, auf die Säule gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Säule mit 37°C warmem RPMI-Medium gewaschen und dabei die T Lymphozyten herausgespült.

Bei der MLR wurden  $5 \times 10^5$  frisch isolierte T Lymphozyten mit  $2 \times 10^4$  monozytären Zellen für 72 h bei 37°C im Brutschrank kokultiviert. Zur Untersuchung der Proliferation wurde, in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Klinik III der Charité, die DNA-Synthese durch Einbau von [Methyl- $^3\text{H}$ ] -Thymidin bestimmt. Jeder Ansatz wurde als Duplikat erstellt, um eventuelle Proliferationsschwankungen mitteln zu können. In jedem Versuch lief eine Negativkontrolle (T Zellen ohne Stimulation) und eine Positivkontrolle (5 µg/ml PHA als Mitogen) mit. 16 h vor Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 µCi [Methyl- $^3\text{H}$ ] -Thymidin (0,037 MBq) zugegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Cell Harvester (Canberra Packard) auf einen Glasfaserfilter transferiert und fünfmal mit Aqua bidest. gewaschen. Auf diese Weise wurden die Zellen lysiert, die DNA auf dem Filter fixiert und die nicht gebundenen Nukleotide entfernt. Der Filter wurde 20 min bei 50°C getrocknet und dann mit 30 µl

Szintillationsflüssigkeit (Microscint, Canberra Packard) pro Loch bestückt. Nach Versiegelung des Filters erfolgte die Messung als counts per minute (cpm) im TopCount Mikroplate Scintillation Counter (Canberra Packard).

Um die Ergebnisse aus verschiedenen Ansätzen besser vergleichen zu können wurde der Stimulationsindex (Si) berechnet. Unstimulierte T Zellen (Kontrolle) lieferten Basiswerte (CPM) die ohne Stimulation gleich 1 gesetzt wurden. Die Ergebnisse von stimulierten Zellen wurden als mehrfaches von 1 berechnet.

### **3.4 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.4.1 RT-PCR**

##### **3.4.1.1 RNA-Extraktion**

Lösungen, Reagenzien:

TRIzol  
(Gibco BRL) ist eine einphasige Lösung von Phenol und Guanidinisothiocyanat

Ethanol 75% verdünnt mit RNase-freiem Wasser

Das Protokoll zur RNA-Extraktion stellt eine Modifizierung der Methode von Chomcynski und Sacchi (1987) dar.

Zu  $5-10 \times 10^6$  Zellen bzw. 100 mg Gewebe wurde 1 ml TRIzol pipettiert, kräftig gemischt und die Suspension 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform wurden die Proben 15 sec kräftig geschüttelt, 2-3 min bei RT inkubiert und 15 min bei 9000 U/min, 4°C zentrifugiert (Eppendorf, Zentrifuge 5403). Danach wurde die wässrige Phase in ein steriles RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, 0,5 ml Isopropanol hinzugeführt, mittels Vortexer durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde 10 min bei 9000 U/min, 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert, das Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 7500 U/min, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet unter einer Lampe getrocknet, in 100  $\mu$ l RNase-freiem Wasser aufgenommen und die RNA 10 min bei 60°C inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers



### 3.4.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Primer wurden mit Hilfe der Computersoftware MacVector (Genetics Computer Group, GCG) ausgewählt und die Reaktionsbedingungen optimiert. Die Amplifikationsreaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Als Matrize dienen 2-10 µl cDNA bzw. DNA.

PCR-Ansatz:

QIAGEN Kit	Ansatz 50 µl
10x PCR-Reaktionspuffer	5 µl
Q-Solution	10 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Primer vorwärts (20 µM) (3.1.5)	1 µl
Primer rückwärts (20 µM) (3.1.5)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl

Der Ansatz wurde in 0,5 ml Amp-Tubes pipettiert, die cDNA bzw. DNA zugefügt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen des Reaktionsansatzes zu verhindern.

Die Reaktion verlief nach folgendem Programm (UNO-Thermoblock; Biometra) :

Initiale Denaturierung	95°C, 3 min
Denaturierung	94°C, 1 min
Annealing	primerspezifische Temperatur (3.1.5), 1 min
Synthese	72°C, 1,5 min
Finale Extension	72°C, 10 min
Anzahl der Zyklen	30-40

### 3.4.1.4 Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)

Die Charakterisierung des 3'-Endes der cDNA von eq.GM-CSF erfolgte nach Optimierung mehrerer Protokolle. Die Reaktion wurde in getrennten Ansätzen durchgeführt.

Die Polymerasekettenreaktion verlief nach folgendem Programm:

PCR-Ansatz für RACE:

QIAGEN Kit	Ansatz 50 µl
10x Reaktionspuffer	5 µl
Q-Solution	10 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
UPML (20 µM) (3.1.5)	1 µl
UPMS (20 µM) (3.1.5)	1 µl
GM-Rv1 (20 µM) (3.1.5)	1 µl
HotStarTaq (5 U/µl)	0,5 µl
DNA (2 µg)	8 µl
Aqua bidest.	18,5 µl

Die einzelnen Komponenten wurden in 0,5 ml Amp-Tubes pipettiert, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Die RACE-PCR verlief nach folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	95°C, 15 min	
Denaturierung	94°C, 1 min	
Annealing	72°C, 1 min	Anzahl der Zyklen 20
Synthese	72°C, 1 min	
Denaturierung	94°C, 1 min	
Annealing	68°C, 1 min	Anzahl der Zyklen 10
Synthese	72°C, 1 min	
Denaturierung	94°C, 1 min	
Annealing	45°C, 1 min	Anzahl der Zyklen 10
Synthese	72°C, 1 min	
Finale Extension	72°C, 10 min	
Kühlung auf 4°C		

nested-PCR Ansatz für RACE:

QIAGEN Kit	Ansatz 50 ml
10x Reaktionspuffer	5 µl
Q-Solution	10 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
NUP (20 µM) (3.1.5)	1 µl
GM-Rv2 (20 µM) (3.1.5)	1 µl
HotStarTaq (5 U/µl)	0,5 µl
DNA (2 µg)	5 µl
Aqua bidest.	21,5 µl

Die einzelnen Komponenten wurden in 0,5 ml Amp-Tubes pipettiert, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen des Reaktionsansatzes zu verhindern. Die nested-PCR verlief nach folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	95°C, 15 min	
Denaturierung	94°C, 1 min	
Annealing	57,2°C, 1 min	Anzahl der Zyklen 30
Synthese	72°C, 1 min	
Finale Extension	72°C, 10 min	
Kühlung auf 4°C		

### 3.4.1.5 Agarosegelelektrophorese

Lösungen:

TAE-Puffer, pH 8,0

Tris-acetat	0,04 M
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	0,001 M

5x Probenpuffer:

Bromphenol blue	0,25% (w/v)
Ficoll 1.077	15% (v/v)

Laufpuffer: 2000 ml TAE + 80 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Die horizontale Gelelektrophorese diente der Größenfraktionierung von Nukleinsäuren. Die Agarose wurde in einer Konzentration von 1,3% in Laufpuffer verwendet. Dazu wurde sie in einer Mikrowelle gelöst, auf ca. 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromidlösung (0,4 µg/ml Endkonzentration) versetzt. Alle Proben wurden in 1/5 Probenpuffer aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurden Längenstandards aufgetragen, die der zu erwartenden Größe der DNA entsprachen (100 bp Leiter-Marker). Die Elektrophorese wurde bei 80 V (Power Supply Model 1000/500, BioRad) durchgeführt. Nach Beendigung des Laufs wurden die DNA-Banden auf einem UV-Transluminator (Biometra, FLX-20M) bei 312 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

### **3.4.1.6 Präparative Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolierung**

Die präparative Agarosegelelektrophorese diente der DNA-Isolierung aus einzelnen Banden nach einem Restriktionsenzymverdau oder PCR-Amplifikation. Analog zu den unter 3.4.1.6 genannten Bedingungen wurde die DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die gewünschte Bande mit einer Rasierklinge auf dem UV-Transluminator (Biometra, FLX-20M) aus dem Gel geschnitten. Die DNA wurde aus dem Gel mittels des QIAquick Gelextraktionskits (Qiagen) isoliert. Die Isolierung wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Durch die Zugabe eines speziellen salzhaltigen Puffers wurden Bindebedingungen für die Nukleinsäure (durch Entzug der Hydrathülle) geschaffen. Die DNA konnte dadurch an eine Kieselgel Membran gebunden werden. Mit Waschpuffer wurden die Salze entfernt und mit Tris-Puffer die DNA eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der gereinigten DNA photometrisch bestimmt.

### 3.4.2 Klonierung in Bakterien

#### 3.4.2.1 Ligation

PCR-Fragmente oder Fragmente aus Restriktionsenzymverdau und Vektoren (1-5 ng/ $\mu$ l) wurden nach Gel Extraktion (3.4.1.7) im Verhältnis 3:1 in die Ligation eingesetzt. Weiterhin wurden 1  $\mu$ l 10x Ligase Puffer, 0,5-1  $\mu$ l T4 DNA Ligase (3 U/ $\mu$ l) und ad 10  $\mu$ l Aqua bidest. hinzugegeben. Bei 4°C wurde die Probe über Nacht inkubiert.

#### 3.4.2.2 Präparation kompetenter *E. coli*

Bakterien, Lösungen, Medien:

Bakterien *E. coli* Top 10, Top 10F' & LMG 194

LB-Medium, pH 7,8

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Aqua bidest.	ad 1 l

CaCl<sub>2</sub> 1 M Stammlösung, sterilfiltriert

Kompetente Bakterien sind in der Lage, Plasmide aufzunehmen. Zur Amplifizierung der rekombinanten Plasmide wurden diese kompetenten Bakterien aus dem *E.coli*-Stamm Top 10, LMG 194 und Top 10F' hergestellt. Diese Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium gegeben und für 14 -16 h bei 37°C geschüttelt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml der Kultur in 50 ml LB-Medium. Diese Zellsuspension wurde bis zu einer OD<sub>600</sub>=0,5 bei 37°C geschüttelt, in ein gekühltes 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min auf Eis gestellt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 3500 U/min und 4°C (Minifuge 2, Heraeus) wurde der Überstand vorsichtig entfernt, das Pellet in 10 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Es wurde wie oben zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet in 2 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gelöst und zu je 200  $\mu$ l in 10 Eppendorfröhrchen verteilt. Die Zellen wurden



umgehend in der Transformation verwendet. Alternativ wurden für größere Plasmide kompetente *E. coli* XL-10 verwendet.

### 3.4.2.3 Transformation

Bakterien, Lösungen, Medien:

Bakterien	kompetente <i>E.coli</i> siehe 3.4.2.2
Ampicillin	20 mg/ml Stammlösung, sterilfiltriert

LB-Agarplatten

LB-Medium	200 ml siehe 3.4.2.2
Agar Noble	3 g

NZY-Medium, pH 7,5

NZ amine	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Aqua bidest.	ad 1 l

Die Medienbestandteile wurden in Aqua bidest. gelöst, der pH wurde mit 1 M NaOH eingestellt und die Lösung wurde auf 1 l aufgefüllt. Das Medium wurde autoklaviert und nachdem es auf 60°C abgekühlt war, wurden 12,5 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>-, 12,5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>- und 10 ml 2 M Glucose als sterilfiltrierte Lösungen zugegeben.

Zum Gießen der Bakterienkulturplatten wurden 200 ml LB-Agar aufgekocht, im Wasserbad auf 50°C temperiert, mit 1 ml Ampicillin-Stammlösung versetzt und je ca. 15 ml in 10-cm-Kulturschalen gegossen. Nach Erstarren und vollständigem Auskühlen wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C aufbewahrt. Von der Ligationsprobe wurden max. 10 µl zu den 200 µl kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien 90 sec auf 42°C erwärmt, erneut 1-2 min auf Eis gestellt, mit 800 µl NZY-Medium versetzt und 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden je 150 µl der transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.4.2.4 Blau/Weiß Selektion

Reagenzien:

X-gal	4-Chlor-5-Brom-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid 5% (w/v) in Dimethylformamid
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid 20% (w/v) in dH <sub>2</sub> O

Als Zwischenvektor zur Klonierung und Sequenzierung von PCR-Amplifikaten wurde das pGEM-T Easy Vektor System (Promega) verwendet. Durch die sogenannte Blau/Weiß Selektion konnte das Vorhandensein der Fremd-DNA schnell untersucht werden. Dazu wurden LB-Agarplatten (3.4.2.3) mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) verwendet. Pro Platte wurden 35  $\mu$ l X-gal (5%) und 15  $\mu$ l IPTG (20%) zugegeben, mit einem Glasspatel ausgestrichen und getrocknet. IPTG induziert die Herstellung von  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Galactosidase setzt X-gal um, wobei ein blauer Farbstoff entsteht. Bei erfolgreicher Transformation inaktiviert das Insert, die für das  $\beta$ -Peptid der  $\beta$ -Galactosidase codierende Region des lacZ'-Gens und aus diesem Grund kann keine  $\beta$ -Galactosidase hergestellt werden. Anschließend folgte ein Ausstrich von jeweils 100-150  $\mu$ l der transformierten Bakterien pro Platte. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei Vorhandensein eines Inserts färbten sich die Kolonien weiß und bei Nichtvorhandensein blau.

#### 3.4.2.5 Expression rekombinanter Proteine (pBAD/gIII)

Zur optimalen Expression der rekombinanten Proteine wurde L-Arabinose (0,02-0,2%) als Induktor hinzugegeben. Eine *E.coli* Kolonie wurde in 4 ml LB-Medium (3.4.2.2) und Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) über Nacht bei 37°C angesetzt. Von der Übernachtskultur wurden 200  $\mu$ l in 4 ml ampicillinhaltiges LB-Medium umgesetzt und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 wachsen gelassen. Nach Zugabe von 4  $\mu$ l bzw. 40  $\mu$ l 20% iger L-Arabinose (Endkonzentration 0,02% bzw. 0,2%) wurde sie bei 30°C 4 h inkubiert, danach wurde 1 ml bei 3500 U/min 5 min zentrifugiert (Minifuge 2, Heraeus), das entstandene Pellet in 100  $\mu$ l Laufpuffer (3.5.1) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

### 3.4.2.6 Plasmid-Präparation

Lösungen:

STET-Puffer	Saccharose 8% (w/v), Triton X-100 0,1% (v/v), 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8)
Lysozym (Boehringer Mannheim)	50 mg/ml Stammlösung, sterilfiltriert
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid, 5% (w/v)

Von den zu selektionierenden Bakterienkolonien wurden Einzelkolonien gepickt und in 5 ml ampicillinhaltigem (100 µg/ml) LB-Medium über Nacht bei 37°C und 120 U/min inkubiert. Von den Übernachtskulturen wurden ca. 1,5 ml in sterile 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und bei 12000 U/min für 5 min zentrifugiert (Ole Dich Microzentrifuge 154). Der Überstand wurde vollständig entfernt, die Pellets wurden in 200 µl STET-Puffer und 4 µl Lysozym gelöst und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben 45 sec gekocht und bei 12000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden mit einem autoklavierten Zahnstocher entfernt und dem Überstand 8 µl CTAB-Stammlösung hinzugefügt. Erneut wurden die Proben bei 12000 U/min für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Pellets wurden in 300 µl 1,2 M NaCl resuspendiert, 750 µl kaltes 96% Ethanol hinzugefügt, erneut gemischt und bei 12000 U/min für 10 min zentrifugiert. Danach wurden die Pellets mit 700 µl 70%igem Ethanol gewaschen, wie oben zentrifugiert, an der Luft getrocknet, in 40 µl TE plus 20 mg RNaseA /ml TE aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurden mit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) gemäß den Arbeitsanweisungen des Herstellers präpariert. Wurden größere Mengen Plasmid-DNA benötigt, so wurden diese unter Verwendung des Plasmid Midi Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben aus transformierten Bakterienkulturen isoliert.

Die Konzentration der gereinigten Plasmid-DNA wurde nach elektrophoretischer Messung durch folgende Formel bestimmt:  $DNA = OD_{260} \times 0,05 \text{ mg/ml} \times \text{Verdünnung}$ .

### 3.4.2.7 Restriktionsenzymverdau

Zur restriktionsenzymatischen Spaltung wurde Plasmid-DNA in Ansätzen bis 1 µg DNA in 25 µl Volumen mit Restriktionsenzymen (20.000 U/ml) geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde 2 h bei optimaler Enzymtemperatur (in der Regel bei 37°C) inkubiert und zur Kontrolle auf ein Agarosegel (3.4.1.6) aufgetragen. Als Marker wurde der 100 bp Ladder Marker verwendet.

#### Ansatz von 25 µl:

DNA	10 µl
10x Puffer	2,5 µl
Enzym	je 1 µl
Aqua bidest.	ad 25 µl

### 3.4.2.8 Glyceroldauerkulturen

Bakterien wurden zur dauerhaften Konservierung zunächst als über Nacht Kulturen angesetzt und am nächsten Tag 200 µl davon in 4 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml) LB-Medium (3.4.2.2) umgesetzt. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer  $OD_{600}=0,4$  inkubiert. 850 µl der Kultur wurden in ein steriles 2 ml-cryo-Röhrchen (Nunc) gegeben, 150 µl steriles Glycerol hinzugefügt und mittels Vortex durchmischt. Anschließend wurden die Bakterien bei -70°C aufbewahrt.

Zum erneuten Ausstreichen wurde mit einer sterilen Impföse Bakterien der Dauerkultur entnommen, auf einer LB-Agarplatte (3.4.2.3) mit Ampicillin (100 µg/ml) verstrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.4.2.9 DNA-Fällung

Lösungen:

4 M Ammoniumacetat

70% Ethanol

Je 60 µl DNA Lösung wurden 30 µl 4 M Ammoniumacetat, 180 µl Isopropanol hinzugefügt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Probe bei 4°C 30 min mit 11000 U/min zentrifugiert (Ole Dich, Microzentrifuge). Das Pellet wurde mit

200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 15 min bei 4°C 11000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 40 µl Aqua bidest. resuspendiert.

### 3.4.3 Transformation von *P. pastoris*

#### 3.4.3.1 Anzucht von *P. pastoris*

Medien:

##### YPD-Medium

Peptone	20 g
Hefeextrakt	10 g
Dextrose	2% (v/v)

Peptone und Hefeextrakt wurden mit einem Endvolumen von 900 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde die andere Komponente aus steriler Stammlösung zugesetzt, so daß ein Endvolumen von 1 l erreicht wurde.

##### YPD-Agarplatten

YPD-Medium	200 ml
Agar Noble	3 g

Komponenten autoklavieren.

##### RD-Medium

Sorbitol	186 g
Dextrose	2% (v/v)
YNB 10x	1,34% (w/v)
Biotin 500x	4x10 <sup>-5</sup> % (w/v)

Das Sorbitol wurde in einem Endvolumen von 800 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden die anderen Komponenten aus sterilen Stammlösungen zugesetzt, so daß ein Endvolumen von 1 l erreicht wurde.

*P.pastoris* GS115 Zellen wurden als Schüttelkultur in YPD-Medium bei 28-30°C und 250 U/min angesetzt. Für die Kultivierung der Hefezellen war eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff besonders wichtig, daher erfolgte die Anzucht in mit Watte luftdurchlässig verschlossenen Erlenmeyerkolben oder in 50 ml Falcon-Röhrchen, deren Deckel nicht fest verschlossen war. Für die Kurzzeitlagerung wurden die Hefen auf YPD-Agarplatten ausgestrichen, 2 d bei 28°C kultiviert und bei 4°C aufbewahrt. Für die Herstellung von Stammkulturen

wurden je 450 µl einer über Nacht YPD-Kultur mit 150 µl sterilem 60% (v/v) Glycerin gemischt, schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.4.3.2 Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris*

Lösungen:

LiAc/DTT/TE

Lithium-Acetat	0,1 M
Dithiothreitol	10 mM
Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM

Sorbitol 1 M Stammlösung, sterilfiltriert

Zur Herstellung elektrokompetenter *P.pastoris* wurde eine Vorkultur des Stamm GS115 ÜN angezchtet, 2 ml davon in 100 ml YPD-Flüssigmedium (3.4.3.1) überführt und bei 30°C und 250 U/min bis zum Erreichen einer Zelldichte von ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml (etwa 2 d) inkubiert. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $1 \text{ OD}_{600\text{nm}} = 5 \times 10^7$  Zellen/ml). Danach wurden die Zellen bei 4°C 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert (GS-3 Rotor, Sorvall). Die pelletierten Hefezellen wurden in 50 ml LiAc/DTT/TE 1 h bei RT inkubiert, danach sedimentiert und in 100 ml sterilem, eiskaltem Aqua bidest. resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden sie mit 50 ml sterilem, eiskaltem Aqua bidest. gewaschen und nach Zentrifugation (s.o.) in 50 ml eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen, abermals zentrifugiert (s.o.). Dieser Schritt wurde in 5 ml eiskaltem 1 M Sorbitol wiederholt und schließlich wurden die Hefezellen in 300 µl eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert, in 100 µl Portionen aliquotiert und am gleichen Tag für Elektroporationen verwendet.

### 3.4.3.3 Elektrotransformation von *P. pastoris*

Medien:

#### RD-Agarplatten

RD-Medium	siehe 3.4.3.1
Agar Noble	18 g

Sorbitol und Agar wurden in einem Endvolumen von 800 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden die anderen Komponenten aus sterilen Stammlösungen zugesetzt, so daß ein Endvolumen von 1 l erreicht wurde.

Zu den 100 µl auf Eis gelagerten, elektrokompetenten Hefezellen (3.4.3.2) wurden 20 µg linearisierte (3.4.2.7) und gereinigte Plasmid-DNA (3.4.2.6) und 20 µg hitzedenaturierte einzelsträngige „Träger“-DNA aus Lachssperma pipettiert. Nach vorsichtigem Mischen wurden diese 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit dem „GenePulser“ und Küvetten mit 0,2 cm Elektrodenabstand (BioRad) durchgeführt. Für die Impulsgabe wurden folgende Parameter eingestellt: Spannung: 1,5 kV, Widerstand: 200 Ω, elektrische Kapazität: 25 µF. Unmittelbar nach Impulsgabe wurde die transfizierten Zellen mit 900 µl 1 M Sorbitol versetzt und 1 h bei 30 °C ohne Schütteln zur Regeneration inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen in 100-300 µl Portionen auf RD-Agarplatten ausgestrichen und bei 28°C für 4-7 Tage inkubiert.

### 3.4.3.4 Expression von Proteinen in *P. pastoris*

Medien:

#### YPG-Medium

Pepton	20 g
Hefeextrakt	10 g
Glycerol	1% (v/v)

#### YPM-Medium

Pepton	20 g
Hefeextrakt	10 g
Methanol	4% (v/v)

Pepton und Hefeextrakt wurden mit einem Endvolumen von 900 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden die anderen Komponenten aus sterilen Stammlösungen zugesetzt, so daß ein Endvolumen von 1 l erreicht wurde.

Zur Expression von Proteinen in Schüttelkultur wurden 10 ml YPG-Medium mit rekombinanten Hefeklonen eingebracht und 20 h bei 30°C und 200 U/min inkubiert. Nach Zentrifugation (3500 U/10min, Biofuge A, Heraeus) der Zellen wurden diese in 5 ml YPM-Medium resuspendiert. Die Ansätze wurden 48 h bei 30°C und 200 U/min kultiviert, wobei nach 20 h 0,5% (v/v) Methanol Endkonzentration zupipettiert wurde, um die durch Verdunstung und Metabolisierung bedingten Verluste an Kohlenstoffquellen auszugleichen. Die Schüttelkulturen wurden bei 3500 U/min 10 min zentrifugiert und in Western-Blots analysiert.

### **3.4.3.5 g418-Resistenz Selektion rekombinanter *P. pastoris* Klone**

Die Identifizierung möglicher „multi-copy“-Klone, d.h. Klone mit mehreren genomisch integrierten Kopien der Expressionskassette, wurde durch Selektion auf g418-haltigen Medien wie folgt durchgeführt. Einzelkolonien transformierter *P.pastoris* wurden auf Mikrotiterplatten mit 200 µl YPD-Medium (3.4.3.1) 2 Tage bei 30°C inkubiert. Von dieser Kultur wurden 10 µl in 190 µl YPD-Medium übertragen und erneut für 2 Tage angezüchtet, um eine möglichst gleichmäßige Dichte der Kolonien zu erzielen. 10 µl dieser Proben wurden auf YPD-Agarplatten (3.4.3.1) mit dem Antibiotikum g418 (Geneticin) in den Endkonzentrationen 0 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml und 2 mg/ml aufgetragen. Die Auswertung erfolgte nach viertägiger Inkubation bei 28°C.



### 3.4.3.6 Kolonie-Blot

Medien, Lösungen:

Milchpulver 2,5% (w/v) in PBS, pH 7,2

PBS/Tween

PBS siehe 3.2.1  
Tween 20 0,05% (v/v)

MM-Platten

Agar Noble 9 g  
YNB 1,34% (w/v)  
Biotin  $4 \times 10^{-5}$ % (w/v)  
Methanol 0,5% (v/v)

Der Agar wurde in einem Endvolumen von 400 ml Aqua bidest autoklaviert und auf ca. 60 °C abgekühlt. Anschließend wurden die anderen Zusatzstoffe aus sterilen Stammlösungen zugegeben. Diese Platten sind bei 4°C bis zu einem Monat zu lagern.

Zur Identifizierung rekombinanter *P.pastoris* Klone, die Proteine exprimiert haben, wurde ein Kolonie-Blot durchgeführt. Dazu wurden Hefekolonien in einem Schachbrettmuster auf YPD-Platten (3.4.3.1) aufgetragen. Nach 16 h Anwachsen bei 28°C wurde etwas Zellmaterial durch Abklatsch auf Nitrozellulosemembran transferiert. Diese Membran wurde mit den Kolonieabdrücken nach oben auf MM-Platten gelegt und für 2 d bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Membran mit PBS/Tween sorgfältig gewaschen, bevor der Immunblot erfolgte. Dazu wurde die Membran 1 h bei RT in 2,5% Milchpulver geblockt, 1 h bei RT mit Maus-anti-tetra-His (1:1000), 1 h bei RT mit dem Antikörper AP-konjugierter Ziege-anti-Maus (1:1000) inkubiert und mit der Substratreaktion angefärbt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils dreimal mit PBS/Tween gewaschen und vor der Farbreaktion NBT/BCIP (Zymed) kurz in Substrat-Puffer (3.5.3) äquilibriert.

### **3.4.4 Klonierung in tierische Zellen**

#### **3.4.4.1 Transfektion von P3X 63Ag8.653-Zellen**

Für die Transfektion wurden P3X-Zellen 3 Tage in RPMI-Medium mit 5% FCS angezchtet und dann auf eine 6-Loch-Platte verteilt. Die Zellen befanden sich während der Transfektion in logarithmischem Wachstum. In 1,5 ml sterile Eppendorfgefäße wurden 100 µl serumfreies ISCOVE-Medium mit 12 µl FuGENE 6 Reagent (nicht liposomal) gegeben und 5 min bei RT inkubiert. FuGENE 6 ermöglicht eine Transfektion ohne Elektroporation der Zellen. In neue sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße wurden 2 µg DNA z.T. linearisiert vorgelegt, zu denen das verdünnte FuGENE 6 pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert wurde. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zu den P3X-Zellen gegeben und bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

#### **3.4.4.2 Kryokonservierung von Zellen**

Die Zellen wurden durch vorsichtiges Spülen gelöst, in 50 ml-Falconröhrchen aufgenommen und zentrifugiert (1200 U/min 10 min, 4°C, Minifuge 2, Heraeus).  $10^6$  bis  $10^8$  Zellen wurden in 1 ml FCS resuspendiert, in 1 ml Einfrierröhrchen überführt und 100 µl DMSO zugegeben. Anschließend wurden sie langsam auf -70°C heruntergekühlt und nach 24 h in einem Stickstoffbehälter gelagert.

Bei Bedarf wurden die gefrorenen Zellen zügig aufgetaut, in vorgewärmtes Medium aufgenommen und für 10 min bei 1200 U/min sedimentiert (Minifuge 2, Heraeus).

Die Zellen wurden erneut in warmem Medium (RPMI + 10% FCS + 1% Gentamycin + 1% Hapes) resuspendiert und bei 37°C kultiviert.

#### **3.4.4.3 g418- bzw. Blastocidin-Resistenz Selektion rekombinanter P3X-Zellen**

Geneticin (g418) diente bei der Transfektion eukaryotischer Zellen in BCMGSneo Vektor als Selektionsmarker, Blastocidin im pcDNA6/V5-His Vektor. Die transfizierten P3X-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion selektioniert. Dazu wurde dem RPMI-Medium mit 10% FCS 5 µl/ml g418 bzw. 1 µl/ml Blastocidin

zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{l/ml}$  g418 bzw. 1  $\mu\text{l/ml}$  Blastidin in RPMI-Medium mit 10% FCS gefüttert. Die Dosierung der Selektionsmarker wurde in Vorversuchen auf ihre Toxizität für P3X-Zellen ausgetestet. In den folgenden 14 Tagen erfolgte mehrfacher Mediumwechsel mit den Selektionsmarkern.

### 3.4.5 Transiente Transformation von Pflanzenzellen

#### 3.4.5.1 Anzucht von *A.tumefaciens* und Herstellung von Stammkulturen

Medien:

YEB-Medium, pH 7,4

Fleischextrakt	5 g
Hefeextrakt	1 g
Pepton	5 g
Saccharose	5 g

Die Medienkomponenten wurden in 900 ml gelöst, der pH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt ad 1 l Aqua bidest. aufgefüllt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 2 ml sterilfiltrierte 1 M  $\text{MgSO}_4$ -Lösung und die entsprechenden Antibiotika zugegeben.

GSM, pH 7,4

Glycerol	50% (w/v)
Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
$\text{MgSO}_4$	200 mM

*A.tumefaciens* Kulturen wurden in 5 ml YEB-Medium mit den Antibiotika Rifampicin (100  $\mu\text{g/ml}$ ), Kanamycin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) sowie 1 M  $\text{MgSO}_4$  ÜN bei 28°C und 225 U/min angezogen. Von dieser Vorkultur wurde 1 ml in 70 ml antibiotikahaltiges YEB-Medium überführt und bis zu einer  $\text{OD}_{600}=1-1,5$  angezüchtet. Zur Anlegung von Stammkulturen wurden 20 ml Bakterienkultur 10 min bei 3500 U/min und 4°C zentrifugiert (Minifuge 2, Heraeus). Das entstandene Pellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  YEB-Medium aufgenommen, mit einem Volumen GSM gemischt und zu 200  $\mu\text{l}$  Aliquots bei -70°C eingefroren. Der Rest der Bakterienkultur wurde für die Herstellung kompetenter Zellen genutzt.

### 3.4.5.2 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*

Lösungen, Medien:

TE-Puffer, pH 7,6

Tris-HCL, pH 7,6	10 mM
EDTA	1 mM

YEB- rif<sup>r100</sup>-Medium (siehe 3.4.5.1) mit 100 µg/ml Rifampicin

50 ml Bakterienkultur (3.4.5.1) wurde 10 min bei 3500 U/min und 4°C zentrifugiert (Minifuge 2, Heraeus) und anschließend in 20 ml TE-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml YEB-rif<sup>r100</sup>-Medium gelöst, in 500 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.4.5.3 Transformation von *A. tumefaciens*

Medien:

YEB-Rif<sup>r100</sup>-Km<sup>25</sup>-CB<sup>100</sup>-Agarplatten

YEB-Medium	1 l (siehe 3.4.5.1)
Agar Noble	18 g

Die Medienkomponenten wurden ad 1 l Aqua bidest. gelöst, der pH-Wert mit 1 M NaOH eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 2 ml sterilfiltrierte 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung und die entsprechenden Antibiotika (Rifampicin 100 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, Cabenicillin 100 µg/ml) zugegeben.

Zu den langsam auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterienzellen wurde 0,5-3 µg Plasmid DNA gegeben, vorsichtig gemischt, für 15 min auf Eis und 5 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5 min in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Um die Regeneration der Zellen zu ermöglichen, wurden sie mit 1 ml YEB-Medium für 3 h bei 28°C leicht geschüttelt. 150 µl des Transformationsansatzes wurden auf YEB-Rif<sup>r100</sup>-Km<sup>25</sup>-CB<sup>100</sup>-Agarplatten ausgestrichen und bei 28°C für 3-4 d inkubiert.

Zur Analyse wurden Klone gepickt, in 100 µl sterilem Aqua bidest. resuspendiert und bei 13000 U/min 5 min zentrifugiert (Eppendorf, Zentrifuge 5403). Das Pellet wurde erneut zweimal in 100 µl sterilem Aqua bidest. gewaschen. Anschließend

wurde es in 20 µl Aqua bidest. aufgenommen, für 15 min bei 96°C inkubiert und kurz zentrifugiert. Von der Probe wurden 10 µl in die PCR (3.4.1.4) eingesetzt.

### 3.4.5.4 Anzucht und Induktion von *A. tumefaciens* zur Transformation von Tabakblättern

Medien:

Induktionsmedium, pH 5,6

Fleischextrakt	0,5% (w/v)
Hefeextrakt	0,1% (w/v)
Trypton	0,1% (w/v)
Saccharose	0,5% (w/v)
MES	10 mM
Aqua bidest.	ad 1 l

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl eingestellt und die Lösung auf 900 ml aufgefüllt. Das Medium wurde autoklaviert und nachdem es auf 60°C abgekühlt war, wurden 2 ml einer sterilfiltrierten 1 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung, 100 ml einer 200 mM Acetosyringonlösung und die entsprechenden Antibiotika (Rifampicin 50 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml, Cabenicillin 50 µg/ml) zugegeben.

MMA-Medium, pH 5,6

MS-Salze	0,43% (w/v)
MES	10 mM
Sucrose	2% (w/v)
Aqua bidest.	ad 1 l

Das Medium wurde autoklaviert und nachdem es auf 60°C abgekühlt war, wurde 1 ml einer 200 mM Acetosyringonlösung zugegeben.

Für die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von Tabakblättern (Deblaere et al., 1985) wurden die Bakterien in Acetosyringon-haltigen Medien angezogen, um die Agrobakterien zur Transformation von Pflanzenzellen vorzubereiten. Eine 80 ml YEB-Rif<sup>50</sup>-Km<sup>25</sup>-Cb<sup>50</sup>-Flüssigkultur wurde mit einem Aliquot einer Stammkultur rekombinanter Agrobakterien angeimpft und für ca. 30 h kultiviert (28°C, 225 U/min). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (4000 U/min, 15 min, bei RT, GS-3 Rotor, Sorvall) sedimentiert, in 80 ml Induktionsmedium aufgenommen und ÜN unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienkulturen zentrifugiert (4000 U/min, 15 min, bei RT), in 50 ml MMA-Medium resuspendiert und für 2 h bei RT stehen gelassen, so

daß tote Bakterienzellen sedimentierten. Nach Bestimmung der optischen Dichte der Kulturen bei 600 nm wurden diese auf eine  $OD_{600nm} = 1,5$  verdünnt und zur Transformation von *N.tabacum* L.cv. Petite Havana SR1 eingesetzt.

### **3.4.5.5 Transformation von Tabakblättern durch Vakuuminfiltration**

Die *A.tumefaciens*-vermittelte Transformation von Blättern wurde mit der von Kapila und Mitarbeiter (1996) beschriebenen Methode der Vakuuminfiltration durchgeführt. Frisch abgeschnittene Tabakblätter wurden in Weckgläser gelegt und mit einer Suspension rekombinanter *A.tumefaciens* vollständig bedeckt. Die Weckgläser wurden luftdurchlässig verschlossen und in einen Vakuumexsikkator (Glaswerk, Wertheim) gestellt. Durch Anschließen einer Vakuumpumpe (Trivac S4, Leybold-Heraeus) wurde ein Unterdruck von 60 mbar erzeugt und für ca. 20 min aufrechterhalten. Dieser Schritt diente der vollständigen Entfernung von Luft aus dem Blattgewebe. Um den Agrobakterien ein Eindringen in die Pflanzenzelle zu ermöglichen, wurde der Unterdruck abrupt aufgehoben. Erfolgreich infiltrierte Blätter waren an ihrem gleichmäßig durchscheinenden Habitus erkennbar und wurden mit Wasser gewaschen, bevor sie in Schalen auf angefeuchtetem Whatman-Filterpapier ausgelegt wurden. Die Schalen wurden mit Frischhaltefolie verschlossen und für 3 d in einer Phytokammer (23°C, 16 h Licht, 8 h Dunkelheit, 5000-10000 Lux) inkubiert.

### 3.4.6 DNA-Sequenzierung nach Sanger

#### 3.4.6.1 Denaturierung von Doppelstrang-Templates

Lösungen:

- 2 M NaOH
- 3 M NaAcetat (pH 4,8)
- 75% Ethanol

In 1,5 ml-Eppendorf-Gefäße wurden 1,5-2 µg DNA aus der Mini-Präparation pipettiert und 8 µl 2 M NaOH hinzugefügt, mittels Vortexer durchmischt, kurz an zentrifugiert und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach Hinzufügen von 7 µl 3 M NaAcetat, 4 µl Aqua bidest. und 120 µl Ethanol wurde die Probe gut durchmischt, für mindestens 30 min bei -70°C gefällt und für 20 min bei 15000 U/min und 4°C zentrifugiert (Ole Dich, Microzentrifuge 154). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 120 µl 75%igem Ethanol gewaschen, wie oben zentrifugiert, unter einer Lampe getrocknet, in 7 µl Aqua bidest. aufgenommen und als denaturierte DNA in die Sequenzreaktion (3.4.6.2) eingesetzt oder bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.4.6.2 Sequenzreaktion

Lösungen:

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| Annealing Puffer<br>(Pharmacia) | 1 M Tris-HCl (pH 7,6); 100 mM MgCl <sub>2</sub> ;<br>160 mM DTT |
|---------------------------------|---|

Ansatz:

- 7 µl denaturiertes Template (3.4.6.1)
- 2 µl Primer (5 µM)
- 2 µl Annealing Puffer
- 3 µl DMSO

Der Ansatz wurde in 1,5-ml-Eppendorf-Tubes 20 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend für mindestens 10 min bei RT, kurz an zentrifugiert und dann in die Sequenzierreaktion eingesetzt.

## Material und Methoden

---

S <sup>35</sup> dATP (Pharmacia)	T7Sequenzierung™ Kit, 250 µCi/25 µl
T7 DNA Polymerase	in gepufferter Glycerol-Lösung 1:5 Verdünnung mit dH <sub>2</sub> O
Labelling Mix-dATP	jeweils 1,375 µM dCTP, dGTP und dTTP; 333,5 mM NaCl
A Mix-kurz	jeweils 840 µM dCTP, dGTP, dTTP; 93,5 µM dATP; 14 µM ddATP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl
C Mix- kurz	jeweils 840 µM dATP, dGTP, dTTP; 93,5 µM dCTP; 14 µM ddCTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl
G Mix- kurz	jeweils 840 µM dATP, dCTP, dTTP; 93,5 µM dGTP; 14 µM ddGTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl
T Mix- kurz	jeweils 840 µM dATP, dCTP, dGTP; 93,5 µM dTTP; 14 µM ddTTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl
A Mix-lang	jeweils 840 µM dCTP, dGTP, dTTP; 93,5 µM dATP; 2,8 µM ddATP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl
C Mix- lang	jeweils 840 µM dATP, dGTP, dTTP; 93,5 µM dCTP; 2,8 µM ddCTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl
G Mix- lang	jeweils 840 µM dATP, dCTP, dTTP; 93,5 µM dGTP; 2,8 µM ddGTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl
T Mix- lang	jeweils 840 µM dATP, dCTP, dGTP; 93,5 µM dTTP; 2,8 µM ddTTP; 40 mM Tris-HCl (pH 7,6); 50 mM NaCl
Stop Lösung	0,3 % Bromphenolblau; 0,3 % Xylencyanol FF; 10 mM EDTA (pH 7,5); 97,5 % Formamid

Pro Template wurden vier 1,5-ml-Eppendorf-Tubes mit G (Guanosin), A (Adenosin), T (Thymidin) und C (Cystidin) beschriftet. In jedes dieser Röhrchen wurden 2,5 µl des entsprechenden Sequenzmix (dGTP; dATP; dTTP; dCTP) pipettiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde der radioaktive Ansatz vorsichtig gemischt.

Radioaktiver Ansatz: 2 µl T7 DNA Polymerase (1:5 verdünnt)  
1 µl dH<sub>2</sub>O  
3 µl Labelling Mix-dATP  
1 µl S<sup>35</sup> dATP (µCi)

Zu 6 µl Ansatz wurden 14 µl Template-Primer gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Mindestens 1 min vor Ablauf der Zeit wurden die vorbereiteten Röhrchen auf 37°C erwärmt. Von den 20 µl Reaktionsansatz wurden je 4,5 µl zu dem Sequenziermix gegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden je 5 µl Stop-Lösung



hinzugefügt und die Proben bis zur Sequenz-Gelelektrophorese (3.4.6.3) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Alternativ erfolgte die Sequenzierung im Institut für Biologie (RWTH Aachen) mit Hilfe des automatischen Sequenzierers Li-Cor 4200 L-2 (MWG-Biotech). Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem Thermosequenase Cycle Sequencing Kit gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide (3.1.5) waren am 5'-Ende mit Farbstoffen fluoreszenzmarkiert und die von ihnen ausgehenden Signale wurden aufgezeichnet. Proben wurden weiterhin zu der Sequenzier Firma AGOWA (Berlin) geschickt. Die Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm EditView (Perkin Elmer).

### 3.4.6.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösungen:

10x TBE, pH 8,0

Tris-HCL, pH 8,0	0,9 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	0,02 M
Aqua bidest.	ad 1 l

Harnstofflösung                      467 g Harnstoff (Serva) auf 1 l Aqua bidest.

APS 10 %ig                              Ammoniumpersulfat, frisch verdünnt in Aqua bidest.

TEMED                                      Tetramethylethylendiamin  
(Pharmacia)

Laufpuffer                                1x TBE

Die Gelelektrophorese wurde mit einer Gelkammer der Firma Life Technologies (Model S2) durchgeführt. Die Glasplatten wurden gründlich mit einer Bürste mit 10% igem SDS gereinigt, unter fließendem Wasser abgespült, abgetrocknet und mit Hexan abgerieben. Anschließend wurde die kleinere Platte mit 3 ml Acrylase (Stratagene) beschichtet. An die Ränder der größeren Platte wurden Spacer gelegt und darauf die kleinere Platte gelegt. Die beiden Platten wurden sorgfältig mit Klebeband abgeklebt.

Das 6%ige Gel bestand aus folgenden Anteilen:

75 ml Harnstofflösung 46,7% ig

15 ml Acrylamid 40% ig

10 ml TBE 10x

350  $\mu$ l 10% iges APS

150  $\mu$ l TEMED

Auf einem schräggestellten Gießtisch wurde das Gel langsam in die Kammer gegeben. Nach abgeschlossener Polymerisation wurde ein feuchtes Papiertuch aufgelegt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Die Prä-Elektrophorese erfolgte für 60 min bei konstant 60 Watt (Biometra, Powersupply PP 3000). Vor dem Auftragen wurden die Proben 2-3 min auf 75-80°C erhitzt. Die Gele liefen 3,5 oder 6 h bei 60 Watt. Nach dem Lauf wurden die Glasplatten vorsichtig voneinander getrennt, wobei das Gel auf der größeren Platte haftete. Auf Filterpapier abgezogen, mit Frischhaltefolie abgedeckt, wurde das Gel mindestens 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet (Geltrockner, BioRAD, Model 583). Anschließend wurde es mit aufgelegtem Film (Sigma, Kodak X-OMAT AR) unterschiedlich lang (24 h- 8 d) in eine Kassette eingelegt und entwickelt. Die resultierenden Sequenzen wurden in das Computerprogramm MacVector (GCG) eingegeben.

### 3.5 Proteinchemische und immunologische Methoden

#### 3.5.1 SDS-PAGE

Lösungen: (Mengenangaben pro Gel - 10x10 cm Kammer)

Trenngel (6 ml pro Gel):	<b><u>12,5%</u></b>
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	2 ml
1,88 M Tris/HCl, pH 8,8	1,2 ml
0,5% SDS	1,2 ml
Aqua bidest.	1,6 ml
TEMED	6 $\mu$ l
Ammoniumpersulfat 10%	40 $\mu$ l
Sammelgel (2 ml pro Gel)	<b><u>5 %</u></b>
30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid	0,25 ml
0,625M Tris/HCl, pH 6,8	0,4 ml
0,5% SDS	0,4 ml
Aqua bidest.	0,95 ml
TEMED	3 $\mu$ l
Ammoniumpersulfat 10%	13 $\mu$ l
Elektrophoresepuffer, pH 8,3 (1l, 10fach)	
Tris Base	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	5 g
Laufpuffer (2,5x)	
0,0625 M Tris/HCl, pH 6,8	0,189 g
SDS 2%	0,5 g
Glycerin 10%	2,5 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol 5%	1,25 ml
Bromphenolblau 1%	250 $\mu$ l
Aqua bidest.	ad 10 ml

Vor Gebrauch der Gelkammer (Biometra) erfolgte eine sorgfältige Reinigung der Glasplatten mit Alkohol. Die Platten wurden mit Silikondichtungen abgedichtet und mit Klammern fixiert. Mit Hilfe des Kammes konnte eine Markierung gesetzt und das Trenngel vorsichtig blasenfrei zwischen die zwei Glasplatten bis zur Markierung gegossen werden. Anschließend wurde es mit ca. 1 ml Aqua bidest. überschichtet, um das Gel während der Polymerisation vor Austrocknung zu schützen. Filterpapier diente zum Absaugen des Wassers und das Sammelgel mußte aufgegossen werden. Nach der Polymerisation wurde der Kamm langsam gezogen, die Gummidichtung entfernt und das Gel in die Kammer eingesetzt. Bevor die einzelnen Proben (ca. 20 µl) aufgetragen wurden, erfolgte ein Vermischen mit halben Volumen Laufpuffer und Kochen für 5 min im Wasserbad. Die angelegte Stromstärke betrug ca. 15 mA durch das Sammelgel und ca. 30 mA durch das Trenngel. Der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande das Ende des Trenngels erreicht hatte. Das Gel konnte jetzt für die Coomassiefärbung oder den Westernblot verwendet werden.

### 3.5.2 Coomassiefärbung

Lösungen:

Fixier- und Färbelösung:	Coomassie Blue R 250	2,5 g
	Methanol	50 ml
	Ethanol	425 ml
	Aqua bidest.	425 ml
	Eisessig	100 ml
Entfärber:	Aqua bidest.	225 ml
	Ethanol	225 ml
	Eisessig	50 ml

Die Gele wurden 2 h, RT in die Färbelösung verbracht und anschließend zum Entfärben des Hintergrundes in den Entfärber (vorsichtiges schütteln und mehrmals wechseln) gelegt.

### 3.5.3 Westernblot

Lösungen:

starker Anodenpuffer, pH 10,4	300 mM Tris-Base, pH 10,4 10% Methanol
schwacher Anodenpuffer, pH 10,4	25 mM Tris-Base, pH 10,4 10% Methanol
Kathodenpuffer, pH 9,4	25 mM Tris-Base, pH 9,4 40 mM -Aminocapronsäure 10% Methanol
Transfer-Puffer, pH 9,4	150 mM Glycin 20 mM Tris-Base, pH 9,4 20% Methanol
BB-Puffer:	0,2% I-Block (Casein) 1x PBS 0,1% Tween 20
Assay-Puffer, pH 10,0:	0,1 M Diethanolamine 1 mM MgCl <sub>2</sub>
Substratpuffer, pH 9,5	100 mM Tris-HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub>
PBS/Tween	siehe 3.4.3.6

Die PVDF-Membran wurde entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten und für 30 sec in absolutes Methanol gelegt. Danach wurde die Membran für 15 min in schwachem Anodenpuffer äquilibriert. Zur gleichen Zeit wurden 3 Blottingpapiere (à 1,5 mm; Schleicher & Schuell) in Kathodenpuffer, ein weiteres Blottingpapier in schwachem Anodenpuffer und zwei weitere Blottingpapiere in starkem Anodenpuffer gelegt. Das Polyacrylamidgel wurde 15 min in Kathodenpuffer äquilibriert. Der nun folgende Elektrotransfer erfolgte im Semidry-Verfahren (Biometra Kammer). Der Sandwichaufbau sah wie folgt aus:

- 3 Filter à 1,5 mm (Kathodenpuffer)
- Polyacrylamidgel (Kathodenpuffer)
- PVDF-Membran (schwacher Anodenpuffer)
- 1 Filter à 1,5 mm (schwacher Anodenpuffer)
- 2 Filter à 1,5 mm (starker Anodenpuffer)

Nachdem alle Luftblasen vorsichtig entfernt worden waren, wurde die Kammer geschlossen und es erfolgte der Blotvorgang bei 4 mA/cm<sup>2</sup> für 45 min. Anschließend

wurde die PVDF-Membran luftgetrocknet und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Der immunologische Proteinnachweis erfolgte nach dem Chemolumineszenzverfahren oder Farbreaktion. Die PVDF-Membran wurde für 20-30 sec in Methanol, dann 5 min in Transfer-Puffer eingelegt und kurz in Aqua bidest. geschwenkt. Danach wurde die Membran für das Chemolumineszenzverfahren für 90 min bei RT in BB-Puffer geschwenkt. Der 1. Ak Maus-anti-tetra-His wurde 1:1000 in BB-Puffer verdünnt und die Membran für 60 min bei RT geschwenkt. Es folgte viermaliges Waschen je 10 min in BB-Puffer. Unter Schwenken wurde die Membran in den 2. Ak AP-Ziege-anti-Maus 1:1000 in BB-Puffer für 45 min bei RT gelegt. Darauf wurde sie erneut 4 x 10 min mit BB-Puffer und dann 2 x 10 min in Assay-Puffer gewaschen. Die Membran wurde für 5 min mit CDP-Star (Promega) bedeckt. Die überschüssige Lösung vorsichtig mit einem Papiertuch aufgesogen. Von einer Plastikhülle umgeben wurde die PVDF-Membran in eine Röntgenkassette gelegt und in der Dunkelkammer mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die Belichtungsdauer der Filme war unterschiedlich (20 sec - 10 min). Anschließend wurden die Filme für 1 min in Entwickler gelegt und geschwenkt, kurz mit Wasser abgespült und für 3 min in Fixierlösung getaucht. Vor dem Trocknen wurden die Filme ebenfalls kurz mit Wasser abgespült.

Alternativ wurden die Proteine mit einer Farbreaktion NBT/BCIP (Zymed) dargestellt. Die PVDF-Membran wurde wie oben beschrieben in Methanol äquilibriert und 1 h bei RT in BB-Puffer geschwenkt. Anschließend wurde sie jeweils 1 h bei RT mit dem 1. Antikörper 1:1000 in PBS und mit dem 2. AK AP-Ziege-anti-Maus 1:1000 in PBS inkubiert. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Membran jeweils dreimal mit PBS/Tween gewaschen. Zur Äquilibration wurde die Membran 5 min in Substratpuffer gelegt und anschließend mit der Farblösung (NBT/BCIP) bedeckt. Durch gründliches Waschen mit Wasser wurde die Reaktion gestoppt.

### 3.5.4 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Lösungen:

PBS/Tween                                   siehe 3.4.3.6

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>-Puffer, pH 8,2 (1l)

NaHCO <sub>3</sub>	8,4 g
Aqua bidest.	ad 900 ml

pH 8,2 mit 1 M NaOH bzw. 1 M HCl einstellen, Aqua bidest. ad 1 l

Substrat-Puffer (für TMB-Lösung):

0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0 (100 ml)

Lsg. A: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M)	3,56 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Lsg. B: Citronensäure (0,1 M)	2,1 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

25,7 ml von Lsg. A mit 24,3 ml von Lsg. B mischen und 50 ml Aqua bidest. hinzufügen, auf pH 5,0 einstellen.

TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)-Tablette in 10 ml 0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer auflösen und 8 µl Wasserstoffperoxid kurz vor der Verwendung hinzufügen.

Diese Methode wurde zum Nachweis der monoklonalen Antikörper (3.6.2) eingesetzt. Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurde mit Antigen (0,5 µg/ml), in NaHCO<sub>3</sub> verdünnt, ÜN bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit PBS gewaschen, mit 200 µl/Loch PBS/10% FCS geblockt und 1 h bei 37°C inkubiert. Darauf folgte siebenmaliges Waschen mit PBS/Tween und Einsatz von 1:4000 verdünntem, polyklonalem Serum (verdünnt in PBS/10% FCS 50 µl/Loch) als Positivkontrolle oder 50 µl/Loch der Überstände der monoklonalen Antikörper. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurde die Platte achtmal mit PBS/Tween gewaschen und mit 100 µl/Loch 1:1000 Anti-Maus-POD Antikörper (verdünnt in PBS/10% FCS) bedeckt und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurde die Platte erneut achtmal mit PBS/ Tween gewaschen, mit 100 µl/Loch TMB-Substrat beschickt, ca. 10 min bei RT stehengelassen, mit 100 µl/Loch 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Farbreaktion mittels ELISA-Readers (Spektra, SLT) bei 620 nm gemessen.

### **3.5.5 Protein-Extraktion aus Bakterien und Reinigung sogenannter Einschlußkörper (unlöslicher Proteine)**

Das Pellet von einem 50 ml Bakterienkulturansatz ( $OD_{600} = 0,5$ ) wurde in 5 ml B-PER II Reagent (Pierce) gelöst, kurz gemischt und anschließend für 20-30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Durch erneute Zentrifugation (15000 U/min, 15 min, SS34 Rotor, Sorvall) konnten die löslichen von den unlöslichen Proteinen getrennt werden. Für die Reinigung der Einschlußkörper (inclusion bodies) wurden nochmals 5 ml B-PER II Reagent zum Pellet zugesetzt und dieses resuspendiert. Dann erfolgte ein Zusatz von 100  $\mu$ l Lysozym (Stammlösung: 10 mg/ml). Das Gemisch wurde gut geschüttelt und inkubiert 5 min bei RT. Anschließend wurden 15 ml des 1:10 verdünnten B-PER II Reagent zu dieser Suspension gegeben und mit dem Vortexer gemischt. Durch Zentrifugation (15000 U/min, 15 min) konnten die Einschlußkörper pelletiert werden. Das Pellet wurde in 20 ml des 1:20 verdünnten B-PER II Reagent zweimal gewaschen und das gewonnene Protein im SDS-Gel nachgewiesen.

### **3.5.6 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie**

Lösungen, Reagenzien:

Startpuffer, pH 7,4

Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (Na-Phosphat)	0,02 M
NaCl	0,5 M

Ladepuffer , pH 8,0

Tris HCl, pH 8,0	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	5 mM
-mercaptoethanol	1 mM
Guanidine hydrochloride	6 M

Waschpuffer, pH 8,0

Tris HCl, pH 8,0	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	20 mM
-mercaptoethanol	1 mM
Urea	6 M - 1 M



### Elutionspuffer, pH 8,0

Tris HCl, pH 8,0	20 mM
NaCl	0,5 M
Imidazol	500 mM
-mercaptoethanol	1 mM

Nickelsulfat II                      0,1 M in Aqua bidest.

Startpuffer, pH 7,4 + 0,05 M EDTA

Die Proteinaufreinigung aus dem bakteriellen System erfolgte mittels HiTrap Affinitätssäule der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Dieses Prinzip nutzt die hohe Affinität von Metall-Ionen, rek. Proteine mit HisTag am C-Terminus zu binden. Die Bindung wird durch Imidazol gelöst.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei RT. Die 1 ml Säule wurde für die Reinigung der extrahierten Proteine (3.5.5) erst äquilibriert mit 5 ml Aqua bidest., danach mit 0,1 M Nickel II beladen, anschließend erneut mit 5 ml Aqua bidest. gewaschen und mit Startpuffer gespült. Danach wurde die Säule mit Ladepuffer gespült und die in Ladepuffer aufgenommene Probe aufgetragen, mit Ladepuffer nachgespült und mit Waschpuffer mit absteigender Harnstoff-Konzentration (6-1M) gewaschen. Dies soll zu einer Renaturierung des Proteines führen. Anschließend wurde die Fraktion mit Elutionspuffer (ohne Harnstoff) eluiert und in PBS dialysiert. Die Säulen wurden für den weiteren Gebrauch nach Arbeitsanleitung gereinigt und bei 4°C aufbewahrt.

### 3.5.7 Isolierung von Proteinen aus *N. tabacum*

Lösungen:

#### Proteinextraktionspuffer

Tris-HCl, pH 7,5	200 mM
EDTA	5 mM
DTT	0,1 mM
Tween-20	0,1% (w/v)
Ascorbinsäure	10 mM
-mercaptoethanol	10 mM

Zur Isolierung transient exprimierter Proteine wurden die transformierten Tabakblätter zerrieben. Dazu wurden sie nach Entfernung der Mittelrippe gewogen

und anschließend unter Zugabe von flüssigem Stickstoff und in 2 Volumen Proteinextraktionspuffer durch sorgfältiges Mörsern aufgeschlossen. Die homogenen Extrakte wurden zweimal zentrifugiert (14000 U/min, 10 min, 4°C, Eppendorf, Zentrifuge 4515 C), wobei das Sediment jeweils verworfen wurde. Die gewonnenen Überstände wurden auf Eis gestellt und in SDS-PAGE (3.5.1) und Westernblots (3.5.3) analysiert.

### **3.5.8 VSV-Inhibitionstest der antiviralen Wirkung von eq.IFN $\gamma$**

#### **3.5.8.1 Virusanzucht**

Lösungen:

TE-Puffer                    siehe 3.4.5.2

Zur Virusvermehrung wurden die ED-Zellen mit einer Infektionsmultiplizität (m.o.i.) von  $10^{-1}$  PFU pro Zelle infiziert, um die Bildung defekter Partikel zu verhindern. Das Inokulum blieb unter gelegentlichem Schwenken für 1 h auf den Zellen, nicht aufgenommenes Virus wurde abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Nährmedium (EDM+5%FCS) versehen und bis zur Ausbildung eines vollständigen zytopathogenen Effekts (CPE) weiter inkubiert. Der Überstand der infizierten Zellen wurde bei 8000 U/min (4°C) für 10 min zentrifugiert (SS34 Rotor, Sorvall), das diente der Entfernung von Zelltrümmern. Anschließend wurde der Überstand auf ein 5 ml Saccharosekissen (20% Saccharose in TE-Puffer) geschichtet und in einem SW-27 Rotor (Beckmann) 2 h bei 27000 U/min ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert, sterilfiltriert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **3.5.8.2 VSV-Inhibitionstest mit ED-Zellen**

Für den Inhibitionstest kamen 96-Loch-Platten zum Einsatz. Pro Loch erfolgte eine Vorlage von 100  $\mu\text{l}$  Nährmedium (RPMI + 10% FCS). Die Reihe A wurde dabei übersprungen. Danach kamen von A1 - A12 nach Vorgabe des Protokolls in jedes Loch 200  $\mu\text{l}$  IFN. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe zur Basis 2 angelegt.

Die überschüssigen 100 µl der Reihe H konnten verworfen werden. Nun kamen in jedes Loch 100 µl ED-Zellen ( $10^4$ ), die zuvor mit Trypsin abgelöst und in 9 ml RPMI+10% FCS aufgenommen wurden, dazu. Die Platten inkubierten im Feuchtbrutschrank bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden in jedes Loch 50 µl VSV-Stamm Indiana ( $10^4$  PFU/50 µl) dazupipettiert und die Platten für weitere 24 Stunden in den Feuchtbrutschrank gestellt. Anschließend fixierten und färbten die Zellen. Nach Trocknung konnten die entstandenen zytopathogenen Effekte (CPE) ausgezählt werden. Die Ergebnisse wurden in Laboreinheiten (LU) angegeben, wobei 1 LU der Menge Interferon entspricht, die 50% aller Zellen der Kultur vor viraler Infektion bzw. CPE schützt.

### **3.5.8.3 VSV-Inhibitionstest mit PBMC**

Nach der Methode von Marquardt und Mitarbeiter (1992) wurden PBMC in 24 ml RPMI mit 10% FCS, 1% Gentamycin und 1% Hapes aufgenommen und zu je 1 ml in eine 24-Loch-Platte verteilt. Danach kamen verschiedene Volumina eq. IFN (bakt. IFN , , = 200 µl; 50 µl und 10 µl) hinzu und wurden 16 h - 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl VSV ( $5 \times 10^4$  PfU) infiziert. Nach 1 h bei 37°C wurde das nicht aufgenommene Virus durch zweimaliges Waschen mit PBS (1200 U/5 min, Eppendorf, Labofuge 400R) entfernt. Der Zellrasen wurde in 2 ml Medium resuspendiert, davon wurde 1 ml als Kontrolle auf eine neue 24-Loch-Platte überführt, bei -70°C eingefroren und die andere Platte inkubiert bei 37°C 23 h, danach wurde sie ebenfalls bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde eine Virustitration in 96-Loch-Platten auf ED Zellen durchgeführt. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen 10 min in Formalin fixiert und in GIEMSA gefärbt. Die Auswertung erfolgte wie unter 3.5.8.2 beschrieben.

## 3.6 Herstellung von Antikörpern

### 3.6.1 Immunisierung von Mäusen / Herstellung polyklonaler Antiseren

Zur Herstellung von polyklonalen Antiseren wurden zwei bis drei Monate alte Mäuse des BALB/c Stammes mit Antigen geimpft. Die Grundimmunisierung erfolgte s.c. mit 100 µl Antigen unter Zusatz des gleichen Volumens an komplettem Freundschens Adjuvans. Zwei Boosterinjektionen mit der gleichen Menge Antigen, jedoch mit inkomplettem Freundschens Adjuvans, wurden nach 21 Tagen i.m. bzw. 42 Tagen i.p. durchgeführt. Nach der letzten Boosterimmunisierung wurde aus dem orbitalen Augenwinkel Blut entnommen. Das Serum wurde nach Zentrifugation (5 min, 2000 U/min, Eppendorf, Zentrifuge 5403) abgenommen und anschließend bei -20°C eingefroren. Weitere Immunisierungen erfolgten gegebenenfalls i.p. mit Antigen und inkomplettem Freundschens Adjuvans.

### 3.6.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

Reagenzien, Medien:

PEG Polyethylenglycol 1500  
(Boehringer Mannheim Biochemica)

Selektionsmedium

RPMI	500 ml
FCS	10% (v/v)
Hepes	5 ml
Gentamycin	5 ml
HAT (50x)	10 ml (Endkonz.: 5 mM Hypoxanthin, 20 µM Aminopterin, 800 µM Thymidin in dH <sub>2</sub> O)
oder	
HT (50x)	HAT ohne Aminopterin

Den unter 3.6.1 beschriebenen, immunisierten Mäusen wurde 3 Tage unmittelbar vor der Fusion täglich eine Boost-Dosis von 100 µl Ag ohne FA intraperitoneal gespritzt. Danach wurden die Tiere durch Äthernarkose getötet. Die Milz wurde in einer 6-Loch-Platte in serumfreiem RPMI-Medium aufgenommen, gegebenenfalls von Bindegewebe befreit und mehrmals in RPMI-Medium gewaschen. Die Milz wurde mit einem Pistil durch ein Nylonsieb gedrückt und anschließend in serumfreiem RPMI-Medium aufgenommen und für 10 min in den Brutschrank gestellt.

Die in Kultur gehaltenen P3X Myelomzellen (3.4.4.2) wurden in ein 50 ml Röhrchen aufgenommen, mit serumfreiem RPMI-Medium auf 50 ml aufgefüllt und 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert (Minifuge 2, Heraeus). Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit serumfreiem RPMI-Medium resuspendiert. Die Milzzellen wurden ebenfalls in ein 50 ml Röhrchen aufgenommen und mit serumfreien RPMI-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurden beide Röhrchen 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen gezählt und im Verhältnis 1:1 in 50 ml serumfreiem RPMI-Medium aufgenommen. Erneut wurden die Zellen 10 min bei 1600 U/min zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde durch vorsichtiges Klopfen aufgebrochen. Während der Fusion wurde das Röhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten. Über einen Zeitraum von 1 min wurde 1 ml auf 37°C vorgewärmtes PEG (Polyethylenglycol 1500, Boehringer Mannheim Biochemica) unter ständigem Rühren auf das Pellet gegeben und 1 min weiter gerührt. Danach wurde 1 min 1 ml serumfreies RPMI-Medium, das zuvor auf 37°C vorgewärmt wurde, zugegeben. Dann wurde 3 min lang 3 ml RPMI-Medium und anschließend ca. 2 min lang 10 ml Medium untergerührt. Zur Inkubation wurde das Röhrchen für 5 min in den Brutschrank (37°C) gestellt. Erneut wurden die Zellen 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Selektionsmedium vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden in 96-Loch-Platten ausgesät und in den Brutschrank gestellt. Nach 7 d wurden die Zellen mit 100 µl Selektionsmedium gefüttert und mikroskopisch nach lebenden Zellen untersucht. Diese wurden in 96-Loch-Platten in Selektionsmedium kloniert und nach einigen Tagen im ELISA (3.5.4) getestet. Die positiven Klone wurden nach 14 d auf HT-Medium umgesetzt, erneut kloniert und erneut im ELISA (3.5.4) und Westernblot (3.5.3) getestet. Nach weiteren 14 d wurden die mAk in RPMI-Medium mit 10% FCS inkubiert oder, wie unter 3.4.4.2 beschrieben, aufbewahrt.