

3. Material und Methoden

3.1 Laborchemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Chemikalien in *pro analysi* Qualität verwendet:

Acrylamid – 30% (w/v),	
0,8% (w/v) Bisacrylamid – Lösung, (Protogel)	National Diagnostics, Atlanta, USA
Ammoniumperoxodisulfat, (APS)	Merck, Darmstadt
Borsäure, (H ₃ BO ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat (CHAPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dithio-1,4-threitol, (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid, (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat, (EDTA, Titriplex [®])	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Jodacetamid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid, (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat, (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kupfersulfat-Pentahydrat, (CuSO ₄ · 5 H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumazid, (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid, (NaCl, Kochsalz)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, (NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat, (SDS)	Bio-Rad, München
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, (Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nonidet P40 (NP40)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure (HCl), 37%, rauchend	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine, (Tricine)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, (Tris, Trizma [®] Base)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zinkchlorid, (ZnCl ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.2 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für die Durchführung von Immunblots und IPs angewendet:

Antikörper gegen APP und APP Spaltprodukte

22C11	APP, N-Terminus, Epitop 66-81, Maus, monoklonal, WB: 1:10000 (Roche)
W0-2	A β , Epitop 1-11, Maus, monoklonal, IP: 5 μ l/ml, WB: 1 μ g/ml
22734	APP, Ektodomäne, Kaninchen, polyklonal, IP: 5 μ l/ml Der Antikörper wurde durch Immunisierung mit rekombinant exprimiertem sAPP α (abgeleitet von APP ₇₇₀) am ZMBH unter Anleitung von Prof. Gerd Multhaup hergestellt (Scheuermann S, et al., 2001).
27576	APP, intrazelluläre Domäne, Kaninchen, polyklonal, IP: 5 μ l/ml Der Antikörper wurde durch Immunisierung mit der zytoplasmatischen Domäne von APP am ZMBH unter Anleitung von Prof. Gerd Multhaup hergestellt.

- 730 Kaninchen, polyklonal, IP: 10µl/ml
Der Antikörper wurde durch Immunisierung mit Aβ Peptid am ZMBH von Prof. Gerd Multhaup hergestellt.
- 879 APP, sAPPβ Neoepitop (entspricht sAPPβ C-Terminus), Kaninchen, polyklonal, IP: 3µl/ml, WB: 1:3000
Der Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. Paolo Pagenetti, (Fa. Novartis AG) zur Verfügung gestellt.

Antikörper gegen BACE

- BSC-1, BSC-2, BSC-3 BACE, N-Terminus, 46-128, Maus, monoklonal, WB: 1:5000
Die Antikörper der BSC Serie wurden freundlicherweise von Dr. Brockhaus, Roche zur Verfügung gestellt (Schmechel A, et al., 2004).
- GM168 BACE, zytoplasmatische Domäne, Kaninchen, polyklonal, WB: 1:2500
Der Antikörper wurde durch Immunisierung mit Peptid GM168 (entspricht BACE 481-501) am ZMBH von Prof. Gerd Multhaup hergestellt.
- GM190 BACE, Propeptid, Kaninchen, polyklonal, WB: 1:2500
Der Antikörper wurde durch Immunisierung mit Peptid GM190 (entspricht BACE 21-46) am ZMBH von Prof. Gerd Multhaup hergestellt.

Sekundäre Antikörper

- | | |
|-----------------------------------|-------------------|
| Anti Mouse HRP Konjugat, 1:10000 | Promega, Mannheim |
| Anti Rabbit HRP Konjugat, 1:10000 | Promega, Mannheim |

3.3 Chromatographiesysteme

Alle verwendeten Chromatographiematerialien wurden bei Amersham Biosciences, Freiburg bezogen:

ÄKTA ^{design} Systeme	ÄKTA ^{FPLC} ÄKTA ^{explorer}
Kalibrierproteine	HMW Gelfiltration Calibration Kit LMW Gelfiltration Calibration Kit
Säulen	XK 16/20 XK 16/60 XK 26/60 XK 50 HR 10/10
Säulenmaterialien	Q-Sepharose, Anionenaustauscher Superdex 200, Gelfiltration

3.4 Materialien für proteinbiochemische Techniken

Amicon [®] Ultra, 30.000 MWCO	Millipore, Schwalbach
ECL [™] Western Blot Detection Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
ECL [™] Hyperfilm [™]	Amersham Biosciences, Freiburg
Chromatographie im kleinen Maßstab und Immunpräzipitation:	
Chelatierende Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Protein A Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Protein G Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Pepstatin-A-Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bakerbond spe [™] Filtration columns	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Coomassie Brilliant-Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Low-Protein-Binding Spritzenvorsatzfilter	Millipore, Schwalbach
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt

Nitrozellulosemembran	Macherey und Nagel, Düren
Proteaseinhibitoren-Cocktail, Complete™	Roche, Mannheim
Proteingrößenstandards:	
Rainbow Full Range	Amersham Biosciences, Freiburg
High Range	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Spritzenvorsatzfilter, 22µm PVDF	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris/Glycin Gele, 10-12 Taschen	Anamed, Darmstadt
Whatman 3MM Paper	Whatman, Brentford UK

3.5 Materialien für Klonierungsexperimente

Agarose für die Elektrophorese	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Elektroporationsküvetten, 0,2cm Schlitz	Bio-Rad, München
<i>Escherichia coli</i> , Stamm DH5α	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig)
DNA Größenstandard, 1kb Plus Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Polymerase, Deep Vent _R ®	New England Biolabs, Frankfurt
DNA Polymerase, Pfu (cloned oder native)	Stratagene, La Jolla, Kanada
dNTPs, Polymerization Mix, je 20mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Amersham Biosciences, Freiburg
Nucleobond AX 500 Plasmid Kit	Macherey und Nagel, Düren
Qia Quick Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden
Qia Quick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quick Ligation Kit	New England Biolabs, Frankfurt
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
Thermocycler, Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Gene Pulser II, Pulse Controller II	Bio-Rad, München

Zur Ausarbeitung der Klonierungsstrategien wurde die Software „Clone Manager“ Version 5.20 (Scientific & Educational Software) verwendet.

3.5.1 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden unter Zuhilfenahme der Software Primer Designer Version 4.10 (Scientific & Educational Software) entworfen und über Sigma Genosys, Steinheim bezogen. Die folgenden Oligonukleotide wurden für die Amplifikation von BACE und die gerichtete Mutagenese eingesetzt (5'→3'):

B1-C-XhoI-rev	CGCGGAGCTCTCACTTCAGCAGGGAGATGT
B1-N-EcoRI-fwd	GCGCGAATTCATGGCCCAAGCCCTGCCCT
B1-D93A-rev	TACTGCTGCCTGTAGCCACCAGGATGTTGAG
B1-D289A-fwd	GACAAGAGCATTGTGGCCAGTGGCACCACC
B1-NL-fwd	GATCAATGGACAGGATCTGAATCTGGACTG
B1-KV-fwd	GGACAGGATCTGAAAGTTGACTGCAAGGAG
B1-NT-T457C-NotI-rev	GGATATCGCGGCCGCCTAGACATAGGCTATACAC ATGAGGGTTGACTCATC
B1-NT-A459C-NotI-rev	GGATATCGCGGCCGCCTAGACATAACATATGGTC ATGAGGGTTGACTCATC
B1-NT-Y460C-NotI-rev	GGATATCGCGGCCGCCTAGACACAGGCTATGGTC ATGAGGGTTGACTCATC
B1-NT-QC-NotI-rev	GGATATCGCGGCCGCCTAGACACAGCAGCAACAC ATGAGGGTTGACTCATCTGTCTGTGGAATGT
B1-NT-NotI-rev	GGATATCGCGGCCGCCTAGACATAGGCTATGGTC ATGAGGGTTGACTCATC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGGA
T3mod	GCTATGACCATGATTACGCCAAGCTC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7mod	CGACGGCCAGTGAATTGTAATACG

3.5.2 Plasmide

Alle Plasmide wurden im *E. coli* Stamm DH5 α vermehrt und unter Verwendung des Nucleobond AX500 Plasmidpräparationskits isoliert.

pBluescript S/K +	Stratagene, La Jolla, Kanada
pCEP4	Invitrogen, Karlsruhe
pCDNA3.1 zeo +	Invitrogen, Karlsruhe

3.6 Puffer, Lösungen, Medien

Falls nicht anders angegeben wurde zur Herstellung Milli-Q[®] Wasser verwendet (Millipore, Schwalbach).

3.6.1 Puffer

<i>DNA-Probenpuffer (6x)</i>	Glycerol	30% (v/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
<i>Homogenisationspuffer</i>	Tris/HCl pH7,5	10mM
	NaCl	150mM
	NP40	2%
	Vor Gebrauch wurde Complete [™] zugesetzt.	
<i>IP-Puffer A</i>	Tris/HCl pH7,5	10mM
	NaCl	150mM
	EDTA	2mM
	NP40	0,2%
<i>IP-Puffer B</i>	Tris/HCl pH7,5	10mM
	NaCl	500mM
	EDTA	2mM
	NP40	0,2%
<i>IP-Puffer C</i>	Tris/HCl pH7,5	10mM

<i>PBS</i>	NaCl	137mM
	KCl	2,7mM
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	10mM
	KH ₂ PO ₄	2mM
<i>Proteinprobenpuffer (4x), reduzierend</i>	1M Tris/HCl, pH6,8	8ml (200mM)
	β-Mercaptoethanol, reinst (14,3M)	4ml (1,43M)
	Glycerin	16ml (40% (v/v))
	SDS, 20%	12ml (6% (w/v))
	Bromphenolblau	8mg
<i>Proteinprobenpuffer (4x), nicht reduzierend</i>	1M Tris/HCl, pH6,8	8ml (200mM)
	Glycerin	16ml (40% (v/v))
	SDS, 20%	12ml (4% (w/v))
	H ₂ O	4ml
	Bromphenolblau	8mg
<i>SDS-Laufpuffer</i>	Glycin	190mM
	Tris	25mM
	SDS, 20%	0,1% (v/v)
<i>TBE-Puffer (5x)</i>	Tris	450mM
	Borsäure	450mM
	EDTA, PH8,0	10mM
<i>Transferpuffer</i>	Tris	190mM
	Glycin	25mM
	Methanol	10% (v/v)

<i>Tris-Puffer für Chromatographische Anwendungen</i>	A1:	50mM Tris/HCl pH 7,5, 100mM NaCl
	A2:	10mM Tris/HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,5% NP40 (v/v)
	A3:	10mM Tris/HCl pH 7,5, 150mM NaCl
	B1:	50mM Tris/HCl pH 7,5, 2000mM NaCl
	B2:	10mM Tris/HCl pH 7,5, 1000mM NaCl, 0,5% NP40 (v/v)
	E1:	5mM Tris/HCl, pH7,5, 10mM NaCl, 50mM EDTA
	W1:	50mM Tris/HCl pH 7,5, 800mM NaCl
	W2:	50mM Tris/HCl pH 7,5, 400mM NaCl
	W3:	50mM Tris/HCl pH 7,5, 100mM NaCl

Für die Verwendung bei der FPLC wurden die Puffer steril filtriert und unter Vakuum entgast.

<i>Zellysepuffer</i>	Tris/HCl, pH7,5	10mM
	NaCl	150mM
	EDTA, PH8,0	2mM
	Triton X 100	2% (v/v)
	NP40	2% (v/v)

Die Lösung wurde steril filtriert und vor Gebrauch Complete™ zugesetzt.

3.6.2 Lösungen

APS, 10% (w/v) 100mg Ammoniumperoxodisulfat wurden ad 1ml H₂O gelöst und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

Complete™, Stocklösung (25x) Eine Tablette wurde zum Gebrauch in 2ml H₂O gelöst. Die Lösung kann bei -20°C gelagert werden.

<i>Coomassie Färbelösung</i>	Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25% (w/v)
	Methanol	45% (v/v)
	H ₂ O	45% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue R-250 wurde in einer 1:1 (v/v) Mischung aus H ₂ O und Methanol gelöst, mit 10% Eisessig versetzt und durch einen Papierfaltenfilter filtriert.	
<i>Coomassie Entfärbelösung</i>	Methanol	45% (v/v)
	H ₂ O	45% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)
<i>0,5M EDTA, pH8,0</i>	Der pH wurde mit verdünnter NaOH eingestellt.	
<i>Ethidiumbromid, 1% (w/v)</i>	Das Ethidiumbromid wurde in Wasser gelöst und abgedunkelt bei 4 °C gelagert.	
<i>Glycerol, 20% (w/v)</i>	20g Glycerol wurden ad 100ml H ₂ O unter Rühren gelöst und steril filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C oder -20 °C gelagert.	
<i>NP 40, 20% (v/v)</i>	20ml NP40 wurden ad 100ml H ₂ O unter Rühren gelöst und steril filtriert.	
<i>SDS, 20% (w/v)</i>	100g SDS wurden ad 500ml H ₂ O gelöst und steril filtriert.	
<i>Triton X 100, 20% (v/v)</i>	20ml Triton X 100 wurden ad 100ml H ₂ O unter Rühren gelöst und anschließend steril filtriert.	

3.6.3 Nährmedien für Bakterienkultur

Bacto™Agar, Bacto™Tryptone und Bacto™YeastExtract wurden bei Becton, Dickinson & Company (Sparks, USA), Ampicillin bei Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

LB

Bacto™YeastExtract	0,5% (w/v)
Bacto™Tryptone	1% (w/v)
NaCl	1% (w/v)

Die Komponenten werden in Milli-Q® gelöst und autoklaviert. Für die Selektion wurde dem Medium vor Gebrauch Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugegeben.

LB-Agar

Bacto™YeastExtract	0,5% (w/v)
Bacto™Tryptone	1% (w/v)
NaCl	1% (w/v)
Bacto™Agar	1,5% (w/v)

Die Komponenten werden in Milli-Q® gelöst und autoklaviert. Für die Selektion wurde dem Agar nach dem Abkühlen Ampicillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml zugegeben.

2x YT

Bacto™YeastExtract	1% (w/v)
Bacto™Tryptone	1,6% (w/v)
NaCl	0,5% (w/v)

Die Komponenten werden in Milli-Q® gelöst und autoklaviert.

3.7 Klonierungs- und Nukleinsäuretechniken

Alle Klonierungsmethoden wurden in Anlehnung an Protokolle nach Sambrook und Russel und der Angaben der Hersteller der jeweiligen Materialien durchgeführt (Sambrook et al.).

3.7.1 DNA Konzentrationsbestimmung

Die Extinktion einer wässrigen DNA Lösung wurde nach entsprechender Verdünnung bei den Wellenlängen 260nm und 280nm gemessen. Hieraus ergibt sich eine Konzentration, die sich folgendermaßen berechnet:

$$\text{Konz. } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} / 1000$$

Zur Bestimmung der Reinheit der präparierten DNA wurde der Quotient der Extinktionen bestimmt:

$$\text{Reinheit} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

Nach einer optimalen Aufreinigung wurde ein Wert von 1,8 – 2,0 erzielt.

3.7.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für Restriktionsansätze wurden pro 1µg DNA ~5U Enzym entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Spaltung erfolgte zu analytischen Zwecken für 1h und zu präparativen Zwecken über Nacht. Nach erfolgter Spaltung wurde nach Angaben des Herstellers hitzeinaktiviert.

Bei der Verwendung zweier oder mehrerer Enzyme mit inkompatiblen Pufferbedingungen wurde die Spaltung sequentiell durchgeführt. Hierfür wurde zuerst mit einem Enzym behandelt, das Enzym hitzeinaktiviert, die DNA über eine QiaQuick Säule isoliert (siehe 3.7.5) und anschließend mit dem nächsten Enzym gespalten. Ein typischer Ansatz wurde folgendermaßen behandelt:

1,5µg DNA
4µl 10x NEB Reaktionspuffer
4µl 100x NEB BSA Lösung (1:10 vorverdünnt)
1µl Enzym 1
1µl Enzym 2
ad 40µl Milli-Q®

3.7.3 Agarosegelelektrophorese

Die Gele wurden mit 1% (w/v) Agarose in TBE-Puffer hergestellt. Um die DNA sichtbar zu machen wurde dem aufgekochten Puffer nach dem Abkühlen Ethidiumbromid zu einer finalen Konzentration von 1µg/ml zugesetzt. Die DNA-Lösung wurde mit einer entsprechenden Menge 6x DNA Probenpuffer versetzt, in die Taschen des Gels geladen und bei 130V aufgetrennt.

3.7.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde unter Zuhilfenahme des „Gel Extraction Kits“ von Qiagen durchgeführt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde die Bande mit der zu isolierenden DNA aus dem Gel herausgetrennt und das Gelstück gewogen. Nach Zugabe von 100µl QC Puffer je 100mg Gelmasse wurde für 10min bei 50°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die DNA Lösung wurde in eine QiaQuick Säule überführt und bei 13.000rpm für 1 Minute bei RT abzentrifugiert, der Durchlauf verworfen und die Säule mit 700µl PE-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation wie oben und dem Verwerfen des Durchlaufs, wurde abermals zentrifugiert, um letzte Reste des Waschpuffers von der Säule zu entfernen. Die QiaQuick Säule wurde mit offenem Deckel für 10min bei RT inkubiert, um sie zu trocknen. Zur Elution wurde 33µl Milli-Q® auf die Säule gegeben und 15min bei RT inkubiert um die DNA möglichst vollständig wieder in Lösung zu bringen. Das Eluat mit der DNA wurde während der Zentrifugation wie oben in einem frischen Gefäß aufgefangen.

3.7.5 Umpuffern von DNA Lösungen

Das Umpuffern von DNA Lösungen nach PCR oder Restriktionsspaltung erfolgte unter Anwendung des „PCR Purification Kits“ von Qiagen. Prinzipiell wurde wie unter Punkt 3.7.4. verfahren. Der Unterschied bestand darin, dass die DNA-Lösung mit einer 5-fachen Menge PB-Puffer versetzt und direkt auf die Säule gegeben wurde. Die anschließenden Schritte erfolgten analog.

3.7.6 Ligation

Ligationen wurden mit Hilfe des „Quick Ligation Kits“ von NEB durchgeführt. Es wurden etwa 50 – 100ng Vektor und die ca. 10-fache Menge Insert für den Ligationsansatz eingesetzt, wobei die Molaritäten der beiden Fragmente unberücksichtigt blieben. Dieser Ansatz stellte jedoch eine praktikable Lösung für alle gängigen Ligationen mit Insertfragmenten von 200 – 2000bp dar. Jeweils 1,5µg des Vektorplasmids und des Plasmids, welches das zu klonierende Insert enthält, wurden mittels Restriktionsendonukleasen gespalten. Die gewünschten Fragmente wurden mit Hilfe des Gelextraktionssystems wie unter 3.7.4 beschrieben aus dem Gel isoliert und auf ein Volumen von 10µl eingengt. Für das Klonieren von PCR Amplifikaten wurde der vollständige PCR Ansatz zunächst im Agarosegel analysiert, die gewünschte Bande ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Gelextraktionssystems isoliert. Nach Restriktionsspaltung, anschließender Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion, konnte das Amplifikat mit einem entsprechend geschnittenem Vektor ligiert werden.

Die Ligationsansätze wurden nach folgendem Schema zusammengestellt:

1,5µl Vektor-DNA
10µl Insert-DNA / Amplifikat
12,5µl 2x Quick Ligation Puffer
25µl Gesamtvolumen

Nach Inkubation für 15min bei RT wurde die Reaktion auf Eis gestoppt. Da das im Ligasepuffer enthaltene PEG die Effizienz der anschließenden Elektrotransformation in *E.coli* deutlich verschlechtert, wurde die DNA über eine QiaQuick Säule isoliert. Nach Einengen auf ~5µl -10µl konnte die Elektrotransformation durchgeführt werden.

3.7.7 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* und Elektrotransformation

Es wurde eine 25ml LB Kultur mit einer Kolonie *E. coli* DH5α inokuliert und ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 20ml der frischen Übernachtskultur wurden verwendet, um 1l LB anzupfen. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ ~ 0,5 – 0,6 unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Hierbei war es erforderlich, alle 30min eine Probe zu entnehmen, um den ungefähren Zeitpunkt des Erntens vorherzusagen

zu können. Die Bakteriensuspension wurde für 30min auf Eis inkubiert und anschließend mit 4000 x g bei 4°C für 15min zentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, da ein Erwärmen der Bakterien die Transformationseffizienz stark beeinträchtigt. Der Überstand wurde vollständig verworfen, um sämtliche Salzurückstände zu entfernen. Das Bakteriensediment wurde gewaschen, indem es mit 1l eiskaltem, sterilem Milli-Q® gründlich resuspendiert wurde. Nach Zentrifugation wie oben wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment mit 0,5l eiskaltem, sterilem Milli-Q® gewaschen. Nach Zentrifugation wie oben und Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment mit 20ml eiskaltem, sterilem 10%igem Glycerol gewaschen. Es wurde erneut wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in ~ 3ml 10% Glycerol aufgenommen. Die Zellzahl wurde nach 1:100 Verdünnung eines 10µl Aliquots bei der Messung der OD₆₀₀ bestimmt, wobei eine OD₆₀₀ = 1 einer Zellzahl von $2,5 \cdot 10^8$ Zellen/ml entspricht. Die Bakteriensuspension wurde mit 10% Glycerol auf $2 - 3 \cdot 10^{10}$ Zellen/ml eingestellt, in eine gleiche Anzahl von 100µl und 200µl Aliquots aufgeteilt und sofort in flüssigem N₂ schockgefroren. Bei einer Lagertemperatur von -80°C sind die Bakterien etwa 6 Monate haltbar.

Für die Transformation wurden 50µl Bakteriensuspension bei RT aufgetaut und auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden mit ~10ng Plasmid, bzw. einem auf ~5µl eingeeengten Ligationsansatz vermischt und in eine vorgekühlte 0,2cm Elektrotransformationsküvette gegeben. Für die Elektrotransformation wurden folgende Parameter am Gerät eingestellt: 200Ω, 25µF, 2,0KV

Nach dem Puls wurde 1ml 2x YT dazugegeben, 3x invertiert und die Suspension in ein Eppendorfreagiergefäß überführt. Nach Inkubation für 1h unter Schütteln bei 37° wurden 50 – 300µl auf LB-Amp Agarplatten ausplattiert. Nach Inkubation bei 37°C für 12h – 16h oder über Nacht wurden Kolonien sichtbar.

3.7.8 Plasmidpräparation

Sowohl die Präparation im großen als auch im kleinen Maßstab wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse durchgeführt (Sambrook et al.). Kleinkulturen wurden in einem Volumen von 3ml und Großkulturen in einem Volumen von 250ml LB+Amp angezüchtet.

Für die Präparation im großen Maßstab wurde das Plasmidreinigungsset Nucleobond AX 500 eingesetzt. Die Rezepte der verwendeten Puffer können dem beiliegenden Handbuch entnommen werden.

Für das Inokkulieren der Großkultur wurden ~500µl einer Vorkultur verwendet. Normalerweise wurden die Bakterien ÜN bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bei dem Animpfen mit einer einzigen Kolonie wurde die Kultur jedoch etwa 24h bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde bei 4000 x g sedimentiert und das Bakteriensediment in 12ml S1 resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 12ml S2. Nach mehrmaligem Invertieren wurde 5min bei RT inkubiert und die Lyse anschließend durch Zugabe von 12ml S3 gestoppt. Nach abermaligem Invertieren wurde 5min auf Eis inkubiert und das weiße, flockige Präzipitat bei 10.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 5ml N2 äquilibrierte Säule gegeben, welche im Anschluss mit 25ml N3 gewaschen wurde. Die Elution erfolgte mit 12ml N5 und das Ausfällen der DNA durch Zugabe von 8,4ml (0,7 Vol) Isopropanol. Die Plasmid-DNA wurde bei 10.000 x g sedimentiert und nach Verwerfen des Überstands an der Luft getrocknet. Die DNA wurde dann in 200µl Milli-Q[®] aufgenommen, wobei abhängig vom Plasmid Konzentrationen zwischen 1 – 5µg/µl erzielt wurden.

Für die Präparation im kleinen Maßstab wurde die ÜN bei 37°C gewachsene Bakteriensuspension bei 4000 x g sedimentiert und in 100µl S1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl S2 Puffer und mehrmaligem Invertieren wurden die Bakterien für 5min bei RT lysiert und der Aufschluss durch Zugabe von 100µl S3 und mehrmaligem Invertieren abgestoppt. Nach Inkubation für 5min auf Eis wurde das weiße Präzipitat bei 14.000rpm sedimentiert und der Überstand in ein frisches 1,5ml Gefäß überführt. Es wurde erneut zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 350µl Isopropanol (0,7 Vol) ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 14.000rpm für 30min wurde der Überstand abgenommen und die DNA an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 30µl Milli-Q[®] konnten 5µl (~1µg) der gewonnen Plasmidlösung zur Restriktionsanalyse verwendet werden.

3.7.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase Ketten Reaktion wurden spezifische DNA Sequenzen amplifiziert und dem Amplifikat durch 5' Primer Extensionen spezifische Restriktionsschnittstellen angefügt, um das anschließende Klonieren zu ermöglichen. Bei dem Erstellen der Primer wurde darauf geachtet, dass eine ausreichende Anzahl Basen (5 – 8) in 5' Richtung der Restriktionsschnittstelle vorhanden sind, da auf diese Weise die anschließende Restriktionsspaltung effizienter ablaufen konnte. Die Zeiten und Temperaturen für das „Annealing“ konnten nur empirisch gefunden werden. Als Zeitintervall für die Elongation wurde eine Rate von etwa 500bp/min zu Grunde gelegt, wobei die Geschwindigkeit der Polymerase durch Sekundärstrukturen der Matrize verlangsamt wird, da das Enzym oft von der Matrize abfällt.

Ein typischer Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Matrize	1µl (~100ng)
Primer 1	2µl einer 10pmol/µl Lösung
Primer 2	2µl einer 10pmol/µl Lösung
dNTPs	5µl einer 2mM Lösung
Reaktionspuffer	5µl
Polymerase	1µl (~5U)
Milli-Q®	<u>34µl</u>
	50µl

Für die Amplifikation von BACE wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt 1: Initiales Denaturieren	95 °C	2min
Schritt 2: Denaturieren	95 °C	30sec
Schritt 3: „Annealing“	55 °C	30sec
Schritt 4: Elongation	72 °C	4min
Schritt 5: Gehe zu Schritt 2 und wiederhole		29x

3.7.10 Gerichtete Mutagenese

Durch Generierung eines Primers, welcher die gewünschte Änderung in der Basenabfolge enthält, wurde es in zwei aufeinanderfolgenden PCR Schritten ermöglicht, ein Amplifikat mit einem oder mehreren Basenpaaraustauschen zu erzeugen. Zuerst wurde in der ersten PCR durch den Mutagenese-Primer und einen entsprechenden Gegenstrang-Primer ein Segment amplifiziert, welches von der Mutagenesestelle bis zu einer gewünschten Restriktionsschnittstelle reichte und in einer zweiten PCR als „Megaprimer“ diente. Zusammen mit einem weiteren Primer wurde auf der gleichen Matrize in Gegenrichtung bis zu einer zweiten Restriktionsschnittstelle amplifiziert. Für pBluescript Konstrukte z.B. wurde mit einem Mutageneseprimer in Vorwärtsrichtung und T7 der Megaprimer amplifiziert und zusammen mit T3 das die Mutation tragende Amplifikat generiert. Auf diese Art konnte das vollständige, mutierte Insert mitsamt der flankierenden MCS amplifiziert und zurück in den Ausgangsvektor kloniert werden. Ein typischer Reaktionsansatz zur Generierung eines Megaprimers wurde folgendermaßen zusammengestellt:

Matrize (pBluescript BACE)	1µl (~100ng)
Primer 1 (Mutationsprimer forward)	2µl einer 10pmol/µl Lösung
Primer 2 (T7 Standard Primer)	2µl einer 10pmol/µl Lösung
dNTPs	5µl einer 2mM Lösung
Reaktionspuffer	5µl
Polymerase	1µl (~5U)
Milli-Q®	<u>34µl</u>
	50µ

Zur Amplifikation wurden folgende Parameter als Ausgangswerte eingestellt und ggf. variiert, falls die Amplifikate zu schwach oder zu unspezifisch waren:

Schritt 1: Initiales Denaturieren	95 °C	2min
Schritt 2: Denaturieren	95 °C	30sec
Schritt 3: „Annealing“	55 °C	30sec
Schritt 4: Elongation	72 °C	3min
Schritt 5: Gehe zu Schritt 2 und wiederhole		29x

Nach Analyse der Reaktion im Agarosegel und Isolierung des Amplifikats wurde dieses als Megaprimer zur Durchführung der zweiten PCR verwendet:

Matrize (pBluescript BACE)	1µl (~100ng)
Primer 1 (Megaprimer)	30µl
Primer 2 (T3 Standard Primer)	2µl einer 10pmol/µl Lösung
dNTPs	5µl einer 2mM Lösung
Reaktionspuffer	5µl
Polymerase	1µl (~5U)
Milli-Q®	<u>6µl</u> 50µ

Gegebenenfalls wurde die Menge an Matrize erhöht und/oder die Menge an Megaprimer reduziert, um die Ausbeute der zweiten Reaktion zu erhöhen.

Die Ausgangsparameter für die Generierung des mutierten Amplifikats waren wie folgt:

Schritt 1: Initiales Denaturieren	95 °C	2min
Schritt 2: Denaturieren	95 °C	30sec
Schritt 3: „Annealing“	58 °C	1min
Schritt 4: Elongation	72 °C	4min
Schritt 5: Gehe zu Schritt 2 und wiederhole		29x

Nach Analyse im Agarosegel und Gelextraktion konnte das Amplifikat mittels entsprechender Restriktionsendonukleasen geschnitten und kloniert werden. Gegebenenfalls musste die „Annealing“ Temperatur angepasst werden, falls kein Amplifikat erzeugt werden konnte.

Für die Mutagenese von BACE wurde zunächst ein Vollängen-Amplifikat aus einem Plasmid erstellt, welches die für BACE kodierende Region beinhaltet. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Christian Haass (Adolf-Butenandt-Institut, München) zur Verfügung gestellt. Für die Amplifikation des Vollängen-BACE wurden die Primer B1-C-XhoI-rev und B1-N-EcoRI-fwd verwendet. Nach Spaltung mit EcoRI und XhoI konnte das pBlue BACEwt Konstrukt erstellt werden. Durch gerichtete Mutagenese von pBlue BACEwt wurden mit den Primern B1-NL-fwd, B1-KV-fwd, B1-D93A-rev und B1-D289A-fwd die Konstrukte pBlue BACE K275N/M276L, pBlue BACE M276V,

pBlue BACE D93A und pBlue BACE D289A hergestellt (Die Konstrukte BACE K275N/M276L, BACE M276V werden im Folgenden als BACE NL und BACE KV bezeichnet). Hierfür wurden zuerst die Megaprimer amplifiziert, welche anschließend in Gegenrichtung mit der gleichen Matrize eingesetzt wurden. Die so entstandenen, mutierten Amplifikate wurden nach Restriktionsspaltung zurück in den Parentalvektor kloniert. Für das BACE D93/289A Konstrukt wurde das EcoRI/BsrGI Fragment von pBlue BACE D93A in pBlue BACE D289A kloniert. Die Klonierung der Ektodomäne und der entsprechenden Cysteinmutanten wurde durch Amplifikation mit den Primern B1-NT-NotI-rev, B1-NT-T457C-NotI-rev, B1-NT-A459C-NotI-rev, B1-NT-Y460C-NotI-rev und B1-NT-QC-NotI-rev erreicht. Da sie 3'-terminal gelegen sind, war nur die Durchführung einer PCR mit T3 als 5'-gelegenen Gegenstrangprimer erforderlich (siehe Tabelle 3.1). Die hierbei entstehenden Konstrukte, denen die zytoplasmatische und die Transmembrandomäne fehlen, enden mit Aminosäure 461. Diese Konstrukte werden im Folgenden als BACE-NT, BACE-NT T457C, BACE-NT I458C, BACE-NT Y460C sowie BACE-NT QC bezeichnet. Abbildung 7.1 zeigt das Schema der Klonierungsstrategie.

Konstrukt	PCR1		PCR2		Schnittstellen
pBlue BACE NL	B1-NL-fwd	T7	Megaprimer	T3	EcoRI/XhoI
pBlue BACE KV	B1-KV-fwd	T7	Megaprimer	T3	EcoRI/XhoI
pBlue BACE D93A	B1-D93Arev	T3	Megaprimer	T7	EcoRI/BsrGI
pBlue BACE D289A	B1-D289Afw	T7	Megaprimer	T3	BsrGI/XhoI
pBlue BACE-NT T457C	B1-NT T457C NotI rev	T3	/	/	PfIMI/NotI
pBlue BACE-NT A459C	B1-NT A459C NotI rev	T3	/	/	PfIMI/NotI
pBlue BACE-NT Y460C	B1-NT Y460C NotI rev	T3	/	/	PfIMI/NotI
pBlue BACE-NT QC	B1-NT QC NotI rev	T3	/	/	PfIMI/NotI
pBlue BACE-NT	B1-NT NotI rev	T3	/	/	PfIMI/NotI

Tabelle 3.1

Übersicht der Mutagenese Ansätze. Matrize war jeweils das pBlue BACEwt Konstrukt. In PCR 1 wurde der „Megaprimer“ für PCR 2 generiert. Nach Amplifikation mit derselben Matrize und entsprechenden Gegenstrangprimern wurde das Amplifikat mit den angegebenen Enzymen gespalten und zurück in den Parentalvektor (pBlue BACEwt) kloniert. Bei den Cysteinmutanten war nur jeweils eine PCR erforderlich, da diese Primer eine Schnittstelle beinhalten.

3.8 Säugerzellkultur

3.8.1 Säugerzelllinien für Proteinexpression

Humane Neuroblastoma Zelllinie: SH-SY5Y

Humane Embryonale Nierenzelllinie: HEK 293

Die verwendeten Zelllinien wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und unter Berücksichtigung der empfohlenen Kultivierungsvorschriften propagiert.

3.8.2 Material für Säugerzellkultur

Alle Materialien für die Säugerzellkultur wurden, soweit nicht anders angegeben, von PAA Laboratories, Cölbe bezogen.

Standardkulturmedien

<i>SH-SY5Y</i>	HAM F12 und DMEM 1:1	je 250ml
	10% FCS	57ml
	1% NEAA	6ml
	1% L-Glutamin	3ml
	1% Natriumpyruvat	3ml
<i>HEK293</i>	DMEM	500ml
	10% FCS	56ml
	1% L-Glutamin	3ml
	1% Natriumpyruvat	3ml

Trypsinlösung

Zum Ablösen der Zellen wurde eine Trypsin (0,5g/l) / EDTA (0,2g/l) Lösung in PBS verwendet.

Serumfreies Medium

Für die serumfreie Aufzucht der HEK293 Zellen zur Proteinexpression wurde HEK Express Medium verwendet. Bei diesem speziellen Vollmedium ist die Zugabe von FCS nicht erforderlich, wenngleich oft eine schrittweise Herabsetzung des

Serumgehaltes erforderlich ist. Durch den Verzicht auf Rinderserum wurde die anschließende Proteinaufreinigung stark vereinfacht.

Selektionsmedien

Für die Selektion der Zellen wurden den Kulturmedien die Selektionsmarker Hygromycin B, bei pCEP4 Konstrukten in einer finalen Konzentration von 300µg/ml (3ml [50mg/ml] / 500ml Medium), oder Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe), bei pCDNA3.1zeo+ Konstrukten in einer finalen Konzentration von 200µg/ml (1ml [100mg/ml] / 500ml Medium), zugesetzt. Für kotransfizierte Zellen wurden entsprechend beide Selektionsmarker verwendet.

Einfriermedium

Für die kryogene Lagerung der Zellen wurden 1,8ml Kryogefäße von Nunc™ verwendet. Für eine optimale Zellüberlebensrate wurde ein Stratacooler® (Stratagene, La Jolla, Kanada) eingesetzt, um die Temperatur schrittweise zu erniedrigen. Zum Einfrieren der Zellen wurde dem Standardmedium 10% DMSO und 10% FCS zugesetzt.

Transfektion

Für die Transfektion wurden folgende Medien und Reagenzien verwendet:

Transfektionsmedium OptiMEM™ (Invitrogen, Karlsruhe)

Transfektionsreagenzien Lipofectamin, Plus Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe)

3.8.3 Kultivierung

Wenn nicht anders angegeben, wurden die unter 3.8.2 aufgeführten Standardkulturmedien verwendet.

SH-SY5Y und HEK293

Von einer 100% konfluenten 10cm Schale wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 5ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 2,5ml Trypsin-Lösung und Inkubation für mehrere Minuten wurden die Zellen durch leichtes, wiederholtes

Schlagen an den Rand der Schale von der Unterlage gelöst. Durch Zugabe von 7,5ml Kulturmedium wurde die Trypsinbehandlung abgestoppt und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Es wurden 2ml der Zellen in 8ml frischem Medium ausgesät und das Medium nach 2 – 3 Tagen gewechselt. Nach etwa 5 Tagen war die Schale wieder konfluent gewachsen.

HEK293 für BACE Expression

Transfizierte HEK293 Zellen wurden von dem FCS-haltigen Standardmedium auf serumfreie Kultivierungsbedingungen umgestellt, indem eine konfluente 10cm Schale mit zeocinhaltigem HEK Expressmedium versetzt wurde. Nach etwa 4 – 5 Tagen konnten die Zellen durch vorsichtiges Abspülen von der Schale gelöst werden. Die Zellsuspension wurde in eine 75cm² Flasche überführt. Da die Zellen unter den serumfreien Kultivierungsbedingungen nicht mehr adhärent wachsen, war eine Trypsinierung für die weitere Propagierung nicht erforderlich. Stattdessen wurde nach 4 Tagen die Zellsuspension bei 500 x g abzentrifugiert und das Zellsediment in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden schrittweise in immer größeren Gefäßen kultiviert, wobei dieser Vorgang mehrere Wochen dauerte. Das Medium wurde alle 5 – 6 Tage gewechselt, wobei die Zellen wie oben abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert wurden. Um ausreichend konditioniertes Medium für die Aufreinigung von BACE zur Verfügung zu haben wurden 300cm² Flaschen mit je 300ml kultiviert.

3.8.4 Transfektion

Es wurden 10cm Schalen mit Zellen ausgesät, so dass am folgenden Tag eine Konfluenz von ~50% erreicht war. Für die Transfektion wurden 20µl Plus Reagenz und 4µg DNA zusammen mit 750µl OptiMEM™ Medium in einem Polystyrolgefäß vermischt und 15min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 30µl Lipofectamin und 750µl OptiMEM™ wurde erneut für 15min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden 2x mit 5ml OptiMEM™ gewaschen und die Transfektionslösung tropfenweise hinzugesetzt. Nach Inkubation für 3h unter den üblichen Kultivierungsbedingungen wurden 1ml FCS und 3,5ml OptiMEM™ zugesetzt. Am folgenden Tag wurde das Medium durch Standardmedium ersetzt und ab dem zweiten Tag nach der Transfektion wurde das Standardmedium gegen Selektionsmedium ausgetauscht. Es wurde nun täglich das

Medium gewechselt und gegebenenfalls mit sterilem PBS gewaschen um abgestorbene Zellen zu entfernen. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren wurden sie trypsinisiert und auf 2 neue 10cm Schalen verteilt. Die Transfektion war erfolgreich abgeschlossen wenn alle Zellen einer nicht transfizierten Kontrollschale, welche gleichermaßen mit Selektionsmedium behandelt wurde, abgestorben waren.

3.8.5 Kryogene Lagerung

Zum Einfrieren wurde eine 100% konfluente Schale trypsinisiert und die Zellen bei 500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 3,5ml Einfriermedium aufgenommen und zu jeweils 1,8ml in 2 Kryogefäße aliquotiert. Durch den Stratacooler[®] wurde die Temperatur kontinuierlich auf -80°C abgesenkt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C oder im flüssigen Stickstoff.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurde ein eingefrorenes Aliquot bei 37°C aufgetaut und mit 10ml Kulturmedium versetzt. Nach Zentrifugation bei 500 x g wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 10ml Kulturmedium resuspendiert und ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen und ein besseres Anwachsen der überlebenden Zellen zu gewährleisten.

3.9 Aufschlussmethoden zur Gewinnung von Proteinextrakten

3.9.1 Herstellung von Lysaten aus Säugerzellen

Von einer konfluenten 10cm Schale wurde der Überstand abgenommen, der Zellrasen mit 5ml PBS gewaschen und die Zellen danach in 1ml PBS mit einem Zellschaber vorsichtig von der Unterlage abgelöst. Nach Zentrifugation bei 500 x g auf 4°C für 5min wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment in 500µl Zellysepuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 45min unter stetigem Invertieren bei 4°C. Nicht lösliche Bestandteile wurden bei 14.000rpm in einer Tischzentrifuge für 10min bei 4°C abzentrifugiert. Das Lysat wurde direkt verwendet oder bei -20°C gelagert. Zur Analyse wurden 18µl auf ein SDS-PA Gel appliziert.

3.9.2 Homogenisation von Hirngewebe

Humanes Hirngewebe wurde von der deutschen Hirnbank „Brain-Net“ bezogen. Ein Hirnstück wurde gewogen und mit 10ml Homogenisierungspuffer, welcher Complete[®] enthielt, versetzt. Mittels „Dounce Homogenisation“ wurde der Gewebs- und Zellverbund aufgelöst, wobei das Pistill etwa 20x in dem Mörser auf und ab bewegt bis wurde, bis der gewünschte Homogenisierungsgrad erreicht war. Danach wurde auf ein dem Gewicht 10-fach entsprechenden Volumen mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt (z.B. ad 37ml bei 3,7g) und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE und Immunblot hinsichtlich des BACE-Gehaltes analysiert. Für die anschließende Ionenaustauschchromatographie wurde durch Auffüllen ad 150ml mit Puffer A3 das Lysat auf ein etwa 4 – 5-faches Volumen gebracht, um die NP40 Konzentration zu verringern und entsprechend der Laufpufferbedingungen anzupassen.

3.10 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt.

Es wurden 10%ige sowie 10-20%ige Tris/Glycin Fertiggelsysteme von Anamed verwendet. Für die Analyse von FPLC Fraktionen wurden 10%ige SDS Gele mit 22 Taschen selbst angefertigt:

Trenngel 10ml Protogellösung,
 5,6ml 2M Tris/HCl, pH8,8
 14,1ml Milli-Q[®]
 150µl 20% SDS
 100µl APS-Lösung
 10µl TEMED

Sammelgel 1,67ml Protogellösung
1,25ml Tris/HCl pH6,8
7ml Milli-Q®
50µl 20% SDS
50µl APS Lösung
5µl TEMED

Die Proben wurden durch Zugabe von 4x Proteinprobenpuffer, reduzierend, bzw. nicht reduzierend vorbereitet. Auf das Aufkochen der Probe wurde bei BACE-haltigen Proben verzichtet, da dies die Laufeigenschaften negativ beeinflusste. Bei allen anderen Proben wurde für 5min bei 95 °C hitzedenaturiert. Der Lauf erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 140V bis die Lauffront die untere Grenze des Gels erreichte.

3.11 Immunblot

Nach Abschluss der SDS-PAGE wurde das Gel in Transferpuffer getränkt. Außerdem wurden 2x 2 Whatmanpapiere, die Nitrozellulosemembran und 2 Schaumstoffmatten in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde auf 2 Whatmanpapiere gelegt und eventuell vorhandene Luftblasen wurden vorsichtig ausgestrichen. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran auf das Gel gelegt. Die 2 verbleibenden Whatmanpapiere wurden auf die Nitrozellulose gelegt and anschließend die Luftblasen sorgfältig durch Rollen mit einem Glasstab entfernt. Der Aufbau wurde zwischen den 2 Schaumstoffmatten platziert und mit Hilfe des Haltegestells in die Blotapparatur gehängt, wobei die Membran in Richtung der Anode zeigte. Der Transfer erfolgte jeweils auf 4 °C bei 380mA für 3h oder bei 180mA ÜN. Nach dem Transfer wurde die Membran entnommen und in PBS mit 10% (w/v) Magermilchpulver für mindestens 1h oder ÜN bei 4 °C blockiert. Die Inkubation erfolgte, wie alle folgenden Inkubationen unter stetigem Schaukeln. Die Membran wurde 3x 5min mit PBS gewaschen, mit dem ersten Antikörper für 1h bei RT inkubiert, anschließend wieder 3x 5min gewaschen und mit dem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper für 1h bei RT inkubiert (Verdünnung der Antikörper, siehe Kapitel 3.2). Nach abermaligem, dreimaligem Waschen der Membran für 3x 5min konnten die Proteinbanden unter Verwendung des ECL Systems nach Angaben des Herstellers auf ECL Hyperfilmen abgebildet werden.

3.12 Immunpräzipitation

Zu 1ml konditioniertem Medium, bzw. 100µl Zelllysat, welches mit 900µl PBS versetzt war, wurden 30µl Protein G Sepharose (bei IP mit monoklonalen Antikörpern), bzw. Protein A Sepharose (bei IP mit polyklonalem Serum) gegeben. Der Antikörper welcher zur Präzipitation des gewünschten Proteins diente, wurde entsprechend der unter 3.2 angegebenen Mengen hinzugegeben. Die Probe wurde für 4h bei RT, bzw. ÜN bei 4°C unter stetigem invertieren inkubiert. Danach wurde bei 10.000rpm für 2min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Nun wurde das Sepharose Sediment jeweils mit 1ml 3x IP-Puffer A, 2x IP-Puffer B und 1x IP-Puffer C gewaschen. Hierfür wurde jeweils die Sepharose wie oben abzentrifugiert und der Waschpuffer vorsichtig abgenommen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Sepharose mit 30µl reduzierendem Proteinprobenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde wie oben zentrifugiert und der Überstand mittels SDS-PAGE und Immunblot analysiert.

3.13 Wessel-Flügge-Fällung von Proteinen

Zu einer Proteinlösung wurden 0,8 Vol Methanol und 0,2 Vol Chloroform gegeben, gemischt und bei 13.000rpm zentrifugiert. Die sich bildende obere Phase wurde verworfen. Es wurden 0,6 Vol Methanol hinzugefügt, und abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpräzipitat in einer beheizten Vakuumzentrifuge getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Protein in Proteinprobenpuffer aufgenommen.

3.14 Chromatographische Methoden

3.14.1 Reinigung der rekombinanten BACE Ektodomäne

Zur Aufreinigung der rekombinanten BACE Ektodomäne BACE-NT T457C wurde die Ionenaustauschchromatographie (IEC) und Größenausschlusschromatographie (SEC) eingesetzt. Diese Art der Aufreinigung war hinreichend, da unter den serumfreien Wachstumsbedingungen keinerlei verunreinigende tierische Komponenten enthalten waren, wie sie fñrgewöhnlich in FCS-haltigem Medium zu finden sind. Durch Abzentrifugieren bei 500 x g für 5min wurde das für 5 – 7 Tage

konditionierte Zellkulturmedium von den in Suspension wachsenden Zellen befreit, welche dann weiterkultiviert werden konnten. Der Überstand wurde mit 1M Tris pH ~11 auf einen pH Wert von 7,5 eingestellt um eine optimale Bindung zu gewährleisten. Die rekombinante Ektodomäne weist einen theoretischen P_i von 5,23 mit Signal- und Propeptid auf. Ohne die beiden Sequenzen sinkt der theoretische P_i auf 4,88 ab. Da bei den Pufferbedingungen mit pH7,5 das Protein in beiden Fällen als Anion vorliegt wurde ein Anionentauscher (Q-Sepharose) eingesetzt.

Etwa 500ml des konditionierten Mediums wurden bei einer Flussrate von 4ml/min auf eine mit Puffer A1 äquilibrierte Q-Sepharose XK16/20 Säule appliziert. Nach Waschen mit Puffer A1 über 15 Säulenvolumen wurde in einem Gradienten über 3 Säulenvolumen bis zu 60% Puffer B2 eluiert und eine Fraktion zwischen 280mM und 590mM NaCl aufgefangen. Die Anreicherung wurde mittels SDS-PAGE und Immunblot überprüft. Die Eluate dreier solcher Läufe (jeweils 18ml) wurden vereinigt und über einen Millipore Amicon[®] Ultra (30.000 MWCO) Zentrifugalfilter auf ein Volumen von ~3ml reduziert. Das angereicherte Q-Sepharose-Eluat wurde auf eine Superdex 200 XK16/60 Säule appliziert und bei einer Flussrate von 1ml/min nach der Größe getrennt. Es wurden 1ml Fraktionen ab dem Ausschlussvolumen von 42ml aufgefangen und die Fraktionen nach SDS-PAGE und Immunblot auf ihren BACE-Gehalt hin überprüft.

3.14.2 Ionenaustauschchromatographie von BACE aus Hirnhomogenat

Die Reinigung von BACE aus Hirnhomogenat wurde freundlicherweise von Prof. Gerd Multhaup durchgeführt.

Hierbei wurden die Bindungseigenschaften von Monomer und Dimer an einen Anionenaustauscher charakterisiert. 150ml des auf 0,5% NP40 eingestellten Hirnhomogenats wurden mittels eines Spritzenvorsatzfilters steril filtriert und bei einer Flussrate von 5ml/min auf eine HR10/10 Q-Sepharose-Säule appliziert. Nach dem Waschen der Säule mit 6 Säulenvolumen A2-Puffer wurde ein Gradient bis 100% B2-Puffer über 10 Säulenvolumen angelegt und das Eluat zu 0,5ml Fraktionen aufgefangen. BACE wurde nach SDS-PAGE und Immunblot in Fraktionen mit einem Kochsalzgehalt von 550-800mM nachgewiesen.

3.14.3 Immobilisierte Metallionen Chelat Adsorptionschromatographie

In der immobilisierten Metallionen Chelat Adsorptionschromatographie (IMAC) wurden aus der Gelfiltration gewonnene Fraktionen mit Monomeren und Dimeren von BACE-NT T457C hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften an immobilisierte Kupfer- und Zinkionen untersucht. Zur Vorbereitung wurden 300µl chelatierende Sepharose in eine Bakerbond Säule gefüllt und 3x mit Puffer W3 gewaschen. Zum Beladen der Säule wurde 1ml 100mM Kupfersulfat, bzw. 100mM Zinkchlorid Lösung auf die Säule gegeben. Anschließend wurde erneut 3x mit Puffer W3 gewaschen. 100µl einer Gelfiltrationsfraktion wurden in 900µl W3 verdünnt und auf die Säule gegeben, wobei der Durchlauf aufgefangen wurde. Nach Waschen mit 1ml Puffer W1, 1ml Puffer W2 und 1ml Puffer W3 wurde mit 1ml E1 Puffer eluiert. Die Fraktionen wurden nach SDS-PAGE und Immunblot auf die Anwesenheit von BACE analysiert.

3.14.4 Affinitätschromatographie mit immobilisiertem Pepstatin-A

Zur Vorbereitung wurden BACE-haltige Q-Sepharose Fraktionen von Hirnhomogenaten 1:5 in PBS verdünnt und mit 20% NP40 zu einer finalen Konzentration von 0,1% versetzt. Eine Bakerbond Säule wurde mit 600µl Pepstatin-A-Agarose befüllt und mit 0,5x PBS äquilibriert. Die BACE-haltige Probe wurde über die Säule gegeben und der Durchlauf aufgefangen. Die Säule wurde mehrfach mit 600µl 0,5x PBS gewaschen und BACE durch Zugabe von 600µl freiem Pepstatin-A (0,5mg/ml in 50% Methanol/PBS) eluiert. Um die Fraktionen mittels SDS-PAGE und Immunblot analysieren zu können, wurden die Proteine mittels Wessel-Flügge-Fällung präzipitiert.