

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma (Deutschland), Roth (Deutschland), ICN (Deutschland), Roche (Deutschland), Calbiochem (Deutschland) oder Merck (Deutschland) bezogen.

3.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden, soweit nicht anders aufgeführt, bei Fermentas (Deutschland), die verwendeten Polymerasen sowie die T4-Ligase bei Invitrogen (Deutschland) gekauft.

3.1.3 cDNA-Klone

Der cDNA-Klon für die humane Fucokinase wurde vom Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung bezogen (Klon Nr. ICRFc100D12145Q3 in pCMV-SPORT6; Ursprungsklon IMAGp998Jo39489Q2). Die cDNA-Klone für die murine Fucokinase und die murine GDP-Fucose-Pyrophosphorylase wurden freundlicherweise von Prof. Risto Renkonen (Universität Helsinki) zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Vektoren

pCR [®] Blunt	Invitrogen
pGEX-4T	Amersham Pharmacia (Deutschland)
pFASTBAC [™]	Invitrogen

3.1.5 Primer

Alle Primer wurden von MWG Biotech (Deutschland) bezogen.

PCR-Primer für die humane Fukokinase

Primer 1 forward 5' - ACA TGG GTC GAG ACT TCC CC - 3' $T_m = 61,4^\circ\text{C}$

Primer 2 reverse 5' - TCA TGG GAA AGG GCA ACA GG - 3' $T_m = 59,4^\circ\text{C}$

PCR-Primer für die humane Fucokinase-Kinase-Domäne

Primer 3 forward 5' - CGG CCC GTG TGG ATT TCT C - 3' $T_m = 61,0^\circ\text{C}$

Primer 2 reverse 5' - TCA TGG GAA AGG GCA ACA GG - 3' $T_m = 59,4^\circ\text{C}$

PCR-Primer für den pCR-Blunt-Vektor

Primer Blunt forward 5' - GCC AGT GTG CTG GAA TTC - 3' $T_m = 56,0^\circ\text{C}$

PCR-Primer für die murine Fucokinase

FUKfw1 forward 5' - GAA TTC GAA TTC GGG CAG TGG GTG GTG ACT GAG TGC - 3'

$T_m = 74,0^\circ\text{C}$

FUKfw2 forward 5' - GAA TTC GAA ATT GCC TAT GAG CTT GGT GGA GCA GTG TTG - 3'

$T_m = 73,3^\circ\text{C}$

FUKrev reverse 5' - CTC GAG CTC GAG CTA GGT GGT GCC CAC TTC - 3'

$T_m = 73,6^\circ\text{C}$

Sequenzier-Primer

pFASTBAC1-For 5' - TGG CTA CGT ATA CTC CGG AA - 3' 5'IRD 800

BACrc 5' - TTT CAG GTT CAG GGG GAG GT - 3' 5'IRD 700

M13Forw (-40) 5' - GTT TTC CCA GTC ACG AC - 3' 5'IRD 700

BacFK-infw 5' - CTG GAT CCT CAT CTT GCA CA - 3' 5'IRD 700

BacFK-infw2 5' - AAT GGT GTA TGT CCC TGA CG - 3' 5'IRD 800

BacFK-inrv 5' - AAT CGG GTC TTG CCG GTA TA - 3' 5'IRD 800

BacFK-inrv2 5' - CTC ATG GTC ATC TCA TCC TG - 3' 5'IRD 800

BacFK-inrv3 5' - ACA TGC CTT GCC TTC TGC AA - 3' 5'IRD 800

Sequenzier-Primer für Blunt-Vektor-Konstrukte

Primer Blunt 5' - GCC AGT GTG CTG GAA TTC - 3' $T_m = 56,0^\circ\text{C}$

Sequenzier-Primer für murine Fucokinase

Bac-infw 5' IRD 700

5' - CTG GAT CCT CAT CTT GCA CA - 3' $T_m = 57,3^\circ\text{C}$

Bac-Infw2 5' IRD 800

5' - AAT GGT GTA TGT CCC TGA CG - 3' $T_m = 57,3^\circ\text{C}$

Bac-inrv 5' IRD 800

5' - AAT GGT GTA TGT CCC TGA CG - 3' $T_m = 57,3^\circ\text{C}$

Bac-inrv2 5' IRD 800

5' - GAG TAC CAG TAG AGT AGG AC - 3' $T_m = 57,3^\circ\text{C}$

Bac inrv3 5' IRD 800

5' - AAT GGT GTA TGT CCC TGA CG - 3' $T_m = 57,3^\circ\text{C}$

Sequenzier-Primer für die Bacmidanalyse

M13Forw (-40) IRD 800

5' - GTT TTC CCA GTC ACG AC - 3' $T_m = 52,8^\circ\text{C}$

3.1.6 Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme wurden von Invitrogen bezogen.

E.coli INVαF': F-*endA1 recA1 hsdR17* (r_k^- , m_k^+) *supE44 thi-1*
gyrA96 relA1 $\phi 80/lacZ\Delta M15\Delta(lacZ\Delta A-argF)U169$

E.coli BL21 Star™ (DE3)pLysS: F-*ompT hsdS_B*($r_B m_B$) *gal dcm* (DE3)
pLysS (Cam_R)

Max Efficiency® DH10 BAC™:Competent Cells F-*mcrA*
 $\Delta.(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$
recA1 endA1 araD139 $\Delta(ara, leu)7697galU galk$
 λ - *rpsL nupG* /pMON14272 / pMON7124

One Shot® TOP 10 kompetente Zellen

F- *mcrA* $\Delta (mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$
deoR recA1 araD139 $\Delta(ara, leu)7697galU galk rpsL endA1$
nupG

3.1.7 Insektenzellen

Sf9

Sf-900

Alle Insektenzellen wurden von Invitrogen bezogen.

3.1.8 Nährmedien für Zucht und Kultivierung der Zellen

Medien und Zusätze wurden von der Firma GibcoBRL (USA) bezogen. Zum Ansetzen von Lösungen und Medien wurde destilliertes Wasser verwendet. Die Stammlösungen und Flüssigmedien für die sterile Anzucht wurden 20 min bei 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden durch Verwendung von 0,2 µm Filtern (Satorius, Deutschland) steril filtriert.

3.1.8.1 Zellkulturmaterialien

Zellkulturmaterialien wurden von Falcon (Deutschland) und Nunc (Deutschland) bezogen. Dies waren entweder sterile Einmalartikel oder wurden im Labor durch Autoklavieren sterilisiert.

3.1.8.2 Bakterien

Bakterien wurden bei 37°C im Schüttelinkubator (225 U/min; Multitron; Infors, Schweiz) oder im Brutschrank (Model B; Memmert, Deutschland) kultiviert.

Bakterien können über einen längeren Zeitraum hinweg (Jahre) bei –80°C eingefroren und gelagert werden. Dafür werden Kulturen bis zur eine Zelldichte der OD₆₀₀ von 0,3-0,6 angezogen und das autoklavierte Glycerin bis zu einer Konzentration von 20% (V/V) dazugegeben. Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei – 80°C gelagert. Sollen eingefrorene Zellen wieder in Kultur genommen werden, werden die Zellen auf Eis aufgetaut und danach in LB-Medium (s. nachfolgende Seite) resuspendiert. Eine weitere Möglichkeit für die längere Aufbewahrung ist die Verwendung des sogenannten „Storage-Medium“. Dafür wird ein Gefäß mit dem Storage-Medium mit den Bakterien

beimpft, bei 37°C über Nacht inkubiert und später bei -80°C gelagert. Die eingefrorenen Zellen können schließlich wieder in LB-Medium resuspendiert werden.

LB (Luria-Bertrani)-Medium (Sambrook, 1989)

Trypton/Pepton aus Casein	10 g
NaCl	10 g
Hefeextrakt	5 g
H ₂ O dest.	ad 1 l

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten (Festmedium) wurde Agar-Agar 1,5%ig dazugegeben.

Nach dem Autoklavieren werden bei Selektivmedien noch die entsprechende Antibiotika (Invitrogen) zugesetzt:

50 µg/ml Ampicillin

25 µg/ml Chloramphenicol

50 µg/ml Kanamycin

10 µg/ml Tetracyclin

7 µg/ml Gentamycin

Für die Blau-Weiß-Selektion werden zusätzlich noch folgende Substanzen zugegeben:

40 µg/ml Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid (IPTG)

100 µg/ml Bluo-Gal (Invitrogen)

SOC-Medium

Trypton/Pepton aus Casein	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	0,5 g
MgCl ₂	4,0 g
Glucose	3,6 g
KCl	186 mg
H ₂ O dest.	ad 1 l

LB-„Storage-Medium“

10 ml 10 x „Storage-Salze“

1 ml (NH₄)₂SO₄ (90 mg/ml)

100 µl MgSO₄·7H₂O (90 mg/ml)

in 100 ml LB-Medium lösen.

10 x "Storage Salze"

1,8 g KH₂PO₄

6,3 g K₂HPO₄

0,45 g Natriumcitrat

44 g Glycerin

H₂O dest. ad 100 ml

3.1.8.3 Insektenzellen

Es wurde die Ovarzelllinie des Insekts *Spodoptera frugiperda* (Sf9-Zellen) benutzt. Insektenzellen wurden bei 27°C als Suspensionskultur im Schüttelinkubator (115 U/min; Multitron; Infors, Schweiz) oder adhärent als Monolayer im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) kultiviert. Die Zellen können in flüssigem Stickstoff eingefroren und so für mehrere Jahre gelagert werden. Dafür werden Zellen als Suspension oder Monolayer angezogen, 5 min bei 500 x g (Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert und in einer Dichte von mindestens 2×10^8 Zellen/ml in 90% (V/V) fötalem Kälberserum (FCS) und 10% (V/V) Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt.

Die Zellsuspension wird mit einer Temperaturverminderung von 1°C pro Minute langsam auf -80°C abgekühlt und die Zellen anschließend zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in die Kultur genommen werden, indem sie auf Eis aufgetaut und in Insektenzellen-Medium resuspendiert werden. Aufgetaute Zellen werden zunächst adhärent kultiviert. Die nichtadhärenten Zellen wurden durch Mediumwechsel zuerst nach 4-6 h und noch mal nach weiteren 24 h entfernt.

Sf9-Zellen: Grace's Inst Medium, mit L-Aminosäuren (Invitrogen)

100 ml/l Fötales Kälberserum (PAA, Österreich)

10 ml/l 200 mmol/l Glutamin (Invitrogen)

10 ml/l 10% Synperonic F68 (Serva, Heidelberg, Deutschland)

5 ml/l Gentamycin, 10 mg/ml (Invitrogen)

Sf-900-Zellen: Sf-900 II Medium (Invitrogen)

10 ml/l 200 mmol/l Glutamin (Invitrogen)

3.1.9 Testsystem zum Klonieren

Zero Blunt[®]-PCR-Kloning-Kit (Invitrogen)

BAC-TO-BAC[®]-Expressionsystem (Invitrogen)

3.1.10 Geräte

Brutschrank (Bakterien) BK 6160 Heraeus (Hanau, Deutschland)

Brutschrank (Zellkultur) 6000 Heraeus (Hanau, Deutschland)

Brutschrank Model B (Mettler, Deutschland)

Cleanbench FASTER 1 BioFlow-Technik (Meckenheim, Deutschland)

Gel-Dokumentations-Apparatur Gel-Print 2000i MWG-Biotech (München, Deutschland)

Gelelektrophoresekammer Mini Subcell GT BioRad (München, Deutschland)

Flachbettgelelektrophoresekammer B1A, B2 BioRad (München, Deutschland)

Heizblock Thermomixer 5336 Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Hochdruck-Zellaufschlussgerät Modell One-shot[®] Constant Systems LTD
(Königswinter, Deutschland)

Hybrid-Thermo-Cycler Touch-Down MWG-Biotech (München, Deutschland)

Kühlzentrifuge Centricon H-401 Kontron Instr. (Grossbritannien)

Mikroskop TMS Nikon (Düsseldorf, Deutschland)

Power-Supply Power-Pac 1000 BioRad (München, Deutschland)

SDS-PAGE-System Mini-PROTEAN 3 Cell System BioRad (München, Deutschland)

Sequencer LI-COR 4200 MWG-Biotech (München, Deutschland)

Sicherheitswerkbank Uniflow UVUB 1200 Kendro (Langenselbold, Deutschland)

Spektralphotometer Ultrospec 3000 Pharmacia (Freiburg, Deutschland)

Schüttler Multitron Infors (Schweiz)

Thermoblock Thermomixer Compact Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Tischzentrifuge Biofuge Pico Heraeus (Hanau, Deutschland)

Tischzentrifuge Biofuge 13 Heraeus (Hanau, Deutschland)

Ultrazentrifuge Centricon T-2070 Kontron Instruments (München, Deutschland)

Vortex Vortex-Genie 2 Bender & Hobein, (Schweiz)

Zentrifuge Megafuge 1.0 Heraeus (Hanau, Deutschland)

3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Die verwendeten Medien und Lösungen für das Arbeiten mit DNA wurden bei 121 °C für 25 min und 200 kPa autoklaviert oder bei 180 °C mindestens 6 h sterilisiert bzw. bei Hitzeelastilität steril filtriert (Satorius-Membranfilter, Porengröße 0,2 µm).

3.2.1.1 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Bakterien

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA durch die permeabilisierte Zellmembran bezeichnet. Damit wird die genetische Veränderung von Bakterien erzielt. Dabei wird zu 100 µl kompetenten Zellen der Ligationansatz von ca. 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und vorsichtig gemischt. Bei dem pFastBacTM-Konstrukt wurden 200 pg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gestellt. Nach der nachfolgenden 45 s-dauernden Inkubation bei 42 °C im Wasserbad wird die Aufnahme der DNA durch die Bakterienzellen erleichtert. Die Zellen werden anschließend nochmals 2 min auf Eis gestellt und danach in 250 µl vorgewärmten SOC-Medium bei 37 °C für 1 h und 225 U/min inkubiert, damit sich die Bakterienzellen regenerieren können. Für eine Regeneration von MAX-Efficiency[®]DH10BacTM *E. coli* Zellen (Invitrogen) ist eine Inkubation in 900 µl vorgewärmtem SOC-Medium über 4 h bei 37 °C im Schüttelinkubator (225 U/min) erforderlich. Aliquots von 1 µl, 10 µl und 100 µl werden auf vorgewärmten Agarplatten mit Selektivmedium (LB-Ampicillin-, LB-Kanamycin-Agarplatten) verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die Ausplattierung von transformierten MAX-Efficiency[®]DH10BacTM-Zellen wurden vorgewärmte LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetracyclin, 100 µg/ml Bluo-Gal und 40 µg/ml IPTG verwendet. Die Kolonien sind nach der Inkubation über 48 h bei 37 °C selektiv gewachsen (blau-weiß Selektion).

3.2.1.2 Präparation von Plasmid-DNA (Birnboim und Doly, 1979)

Die Isolierung von DNA aus den verwendeten Plasmiden beruht auf dem Prinzip der alkalische Lyse in Gegenwart von SDS. Dabei werden die Bakterien unter basischen Bedingungen lysiert und die bakterielle DNA denaturiert. Anschließend hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA unter neutralen Bedingungen wieder, während die größere

chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den Proteinen präzipitiert. Diese Methode kam für die Analyse von Transformanten sowie für den weiteren Einsatz unterschiedlicher molekularbiologischer Methoden zur Anwendung.

Im Falle der Nutzung der zu isolierenden Plasmide als Template für die Polymerase-Kettenreaktion oder in Sequenzierungsreaktionen wurde das „Plasmid Purification Kit“ der Firma Qiagen (Deutschland) und das Nucleospin[®]-Plasmid-Kit, (Macherey-Nagel, Deutschland), verwendet. Bei der Präparation von Bacmid-DNA wurde auf die Vorschrift zur Low-Copy-Präparation (nach Angaben des Nucleospin[®]-Plasmid-Herstellers) zurückgegriffen. Zuerst wurde eine *E. coli* Übernachtskultur vorbereitet. Dafür werden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 225 U/min kultiviert. Für eine Mini-Plasmidpräparation (30-50 µg DNA) werden von einer *E. coli*-Übernachtskultur in selektivem LB-Medium 2 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei 20000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das erhaltene Bakteriensediment in 200 µl Puffer I (25 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l Glucose, 10 mmol/l EDTA, pH 8,0), und 100 mg/l RNase A versetzt und unter leichtem „Vortexen“ gut resuspendiert. Anschließend werden 200 µl Puffer II (0,2 mol/l NaOH, 1% SDS) zugegeben, durch vorsichtiges Schwenken wird der Ansatz gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der stark alkalische Puffer II lysiert die Zellen und setzt dadurch die Plasmid-DNA frei. Nach Zugabe von 200 µl des Neutralisations-Puffers III (3 mol/l Kaliumacetat, 2 mol/l Essigsäure) wird der Ansatz 10 min auf Eis gestellt. Durch die hohe Salzkonzentration dieser Lösung werden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt, während die Plasmid-DNA gelöst bleibt. Die Fällung wird durch die Bildung von weißen Schlieren sichtbar. Durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 11000 x g und 4°C werden die zellulären Proteine und die chromosomale DNA sedimentiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wird nochmals für 5 min zentrifugiert. Anschließend wird die Plasmid-DNA im Überstand mit 450 µl 2-Propanol gefällt und nach 30-minütiger Inkubation bei -20°C durch Zentrifugation für 15 min bei 11000 x g sedimentiert. Um restliche Salze zu entfernen, wird das DNA-Sediment mit 500 µl kaltem 70% (V/V) Ethanol gewaschen. Daraufhin wurde es 10 min bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert. Die DNA wurde im Speed-Vac getrocknet, in 30 µl sterilen Wasser oder TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5; 1 mmol/l EDTA) aufgenommen. Es folgte eine photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung. Zur Kontrolle der Präparation wurden ca. 500 ng DNA im Agarosegel analysiert.

Um größere Mengen (100 bzw. 500 µg) High-Copy-Plasmid-DNA zu isolieren, werden 25 ml bzw. 100 ml *E. coli*-Übernachtskulturen angesetzt und das Plasmid wie oben beschrieben isoliert. Bevor die Plasmid-DNA mit 2-Propanol gefällt wird, erfolgt bei diesen „Midi“- bzw. „Maxi“-Plasmidpräparationen eine weitere Reinigung der DNA über ein Anionenaustauscherharz. An dieses bindet sich die Plasmid-DNA bei geringen Salzkonzentrationen und

niedrigem pH-Wert. Verunreinigungen, wie z.B. Proteine, werden bei mittleren Salzkonzentrationen entfernt. Mit einem Hochsalzpuffer wird die Plasmid-DNA eluiert, durch 2-Propanol gefällt und mit kaltem 70% (V/V) Ethanol gewaschen, um restliche Salze zu entfernen. Das Präzipitat wird anschließend getrocknet, in 60 µl bzw. 150 µl Wasser oder TE-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5; 1 mmol/l EDTA) aufgenommen und quantifiziert bzw. analysiert.

3.2.1.3 Reinigung von DNA

Häufig sind DNA-Lösungen mit Proteinen, unerwünschten Oligonucleotidprimern, Salzen, Enzymen, nicht inkorporierten Nucleotiden, Agarose, Ethidiumbromid, Ölen oder Detergentien verunreinigt. Zur Reinigung von DNA-Lösungen wird eine DNA-Probe über eine NucleoSpin[®]-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) gegeben. Diese Reinigung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

3.2.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Diese Methode diene sowohl zur analytischen als auch zur präparativen Auftrennung von DNA nach ihrer Fragmentgröße. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Moleküle ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molmasse. Bei ringförmiger DNA können auch *coiled* und *supercoiled*-Strukturen auftreten, welche aufgrund ihrer höheren Kompaktheit schneller wandern und in den Gelen deshalb bei scheinbar kleineren Molmassen nachgewiesen werden. Mit Agarosegelen können DNA-Moleküle im Bereich von 250-25000 bp identifiziert werden.

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsendonukleasespaltung, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Qualitätskontrolle verwendet. Je nach Größe der Fragmente oder Plasmide wurde ein Agaroseanteil von 0,8 bis 1,0% (V/V) in TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wird durch Kochen im TAE-Puffer gelöst und in die entsprechenden Gelschlitten gegossen. Nach Abkühlen und Erstarren des Agarosegels wird der Gelschlitten in horizontalen Elektrophoresekammern mit dem Laufpuffer platziert. Nach Zugabe von 1/5 Volumen Bromphenolblau-Probenpuffer oder „Loading-Dye-Solution“ (6x) zur Probe, konnten diese in die Taschen pipettiert werden. Das Auftragsvolumen beträgt 5-25 µl pro Geltasche. Als DNA-Größenstandard werden 5 µl GeneRuler™ 1 kb-DNA-Ladder-Marker (Fermetas) mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde anschließend bei 80 V (ca. 0,5 V/cm²) solange durchgeführt, bis der Farbmärker die

gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hatte. Die anschließende Färbung des Gels in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) dauerte 15 min.

TAE Puffer

Tris-HCl		40 mmol/l	pH 7,9
Natriumacetat		5 mmol/l	
EDTA		1 mmol/l	
H ₂ O dest.	ad	1 l	

Probenpuffer

Bromphenolblau		0,25%	(G/V)
Glycerin		40%	(V/V)
H ₂ O dest.	ad	100 ml	

3.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wird spektralphotometrisch durch Extinktionsmessungen bei 260 nm ermittelt. Ein Extinktionswert von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml Lösung. Wird gleichzeitig die Extinktion bei 280 nm gemessen, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, so kann aus dem Verhältnis der OD (hier: OD - optische Dichte) bei 260 nm zu 280 nm ($OD_{260/280}$) die Reinheit der DNA-Probe bestimmt werden. Reine DNA weist einen Quotienten der $OD_{260/280}$ zwischen 1,80 und 2,0 auf. Eine weitere Möglichkeit DNA-Mengen annähernd „zu quantifizieren“ besteht in der Abschätzung der Bandenintensität auf Agarosegelen (im Vergleich zu bekannten DNA-Mengen des Markers).

3.2.1.6 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Spaltung bezeichnet die *in vitro* Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen (siehe Tabelle 1). Sie spalten an spezifischen Stellen innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz von 4-8 Basenpaaren (bp) in doppelsträngiger DNA. So entstehen entweder überhängende 3' bzw. 5' Enden (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends). Die Spaltung von doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonuklease wurde für die Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt (Szynter *et al.*, 1987). Für

die jeweiligen Ansätze wurden von der verwendeten Restriktionsendonukleasen etwa eine Einheit (U) Enzym je μg DNA eingesetzt. Die entsprechenden Puffer und optimalen Temperaturen richten sich nach den Herstellerangaben (Fermentas). Anschließend werden die erhaltenen Fragmente mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Tabelle 1: Restriktionsendonukleasen und Erkennungssequenzen.

Die Spaltstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Enzym	Erkennungssequenz
<i>Bam</i> HI	5'...G↓GATCC...3' 3'...CCTAG↑G...5'
<i>Eco</i> RI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'
<i>Hind</i> III	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↑A...5'
<i>Kpn</i> I	5'...G↓GTACC...3' 3'...CCATG↑G...5'
<i>Not</i> I	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'
<i>Sac</i> I	5'...G↓TCGAC...3' 3'...CAGCT↑G...5'
<i>Sal</i> I	5'...G↓TCGAC...3' 3'...CAGCT↑G...5'
<i>Xba</i> I	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↑T...5'
<i>Xho</i> I	5'...C↓TCGAG...3' 3'...GAGCT↑C...5'

3.2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven, exponentiellen Amplifikation von DNA (Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985) um z. B. die Anwesenheit eines bestimmten DNA-Fragments nachzuweisen und dieses zu amplifizieren. Zur Synthese werden eine Ausgang-DNA-Sequenz, die als Template bezeichnet wird, und zwei unterschiedliche Oligonucleotidprimer sowie Nucleotide und Puffer benötigt. Ein sogenannte Vorwärts- und ein Rückwärts-Primer flankieren die zu amplifizierende Region in gegenläufiger Orientierung. Es wurden zwei verschiedene bis zu 95°C thermostabile DNA-Polymerasen, die Taq-Polymerase und die „proofreading“-Polymerase verwendet.

Die Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermophilus aquaticus* repliziert die DNA bis zu einem Temperaturoptimum von 72°C, mit einer Fehlerrate von ca. 2×10^{-4} . Die „proofreading“-Polymerase aus *Thermococcus sp.* hat ein Temperaturoptimum bei 68°C und besitzt eine 3´-5´-Endonuclease-Aktivität. Dies erlaubt Korrekturlesen und damit eine 12-mal höhere Synthesegenauigkeit als die Taq-Polymerase. Die DNA-Polymerase synthetisiert vom jeweiligen Primer aus in 5'→3'-Richtung den komplementären Strang. Die PCR besteht aus mehreren Zyklen einer dreistufigen Reaktionsfolge: Denaturierung der neu synthetisierten Doppelstrang-DNA durch Erhitzen, Hybridisierung mit Primern (die jeweils komplementär zu einem der beiden Einzelstränge sind) und die Synthese der DNA. Nach 25 Zyklen gelangt man zu einer $10^6 - 10^7$ -fachen Amplifikation der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz. Die Standard-PCR wurde mit dem Platinum® Pfx-DNA-Polymerase-Kit (Invitrogen) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Standard PCR-Ansatz

Komponenten	Volumen
10x PCR Puffer: 100 mmol/l Tris-HCl, pH 8,3 500 mmol/l KCl	5,0 µl
MgCl ₂ (50 mmol/l)	1,0 µl
dNTP's (4 mmol/l)	2,5 µl
Sense Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Antisense Primer (10 pmol/µl)	1,5 µl
Platinum® Pfx-DNA Polymerase (2,5 U/µl) oder Taq-DNA Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl 1,0 µl
DNA-Matrize (Template, 100-200 ng)	1,0 µl
Steriles H ₂ O dest.	ad 50 µl

PCR mit Pfx-DNA-Polymerase

Vor dem 1. Zyklus	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	45 s
Hybridisierung der Primer	60°C	45 s
DNA-Synthese	68°C	4,5 min 30 Zyklen
Nach dem letzten Zyklus	68°C	10 min
Reaktionsende	4°C	∞

PCR mit *Taq*-DNA- Polymerase

Vor dem 1. Zyklus	95 °C	3 min
Denaturierung	95 °C	45 s
Hybridisierung der Primer	62 °C	45 s
DNA-Synthese	72 °C	1,5 min 30 Zyklen
Nach dem letzten Zyklus	72 °C	10 min
Reaktionsende	4 °C	∞

Die Reaktion fand in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid, MWG-Biotech) statt. Ein Aliquot von 5 µl wurde mit „Loading-Dye-Solution“ (6x) versetzt und zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.2.1.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die nach einer PCR oder durch Restriktionsspaltung erhaltenen DNA-Fragmente wurden nach der Elektrophorese aus Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen mit einem Skalpell unter UV-Licht (366 nm) herausgeschnitten, in ein Eppendorfgesäß überführt, mit Extraktionspuffer versetzt, die DNA herausgelöst und anschließend über QIAgen-Säulen des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) oder NucleoSpin® Extract-Kit (Macherey-Nagel) gereinigt und wieder isoliert. Der im Kit enthaltene Puffer QG ermöglicht das Schmelzen der Agarose bei relativ niedrigen Temperaturen. Gleichzeitig führen die im Puffer enthaltenen Salze zu einer leichten Modifikation der Nukleinsäure-Struktur, so dass anschließend eine optimale Bindung an die Silicagel-Membran der Säulen möglich ist. Die Elution erfolgt anschließend mit 30 µl sterilem dest. Wasser oder mit dem EB-Puffer (10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5; 1 mmol/l EDTA). Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde entsprechend den Herstelleranweisungen durchgeführt.

3.2.1.9 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Für die Analyse von Fragmentgrößen, sowie für die quantitative/qualitative Beurteilung wurde in jedem Gel ein Größenstandard aufgetragen. Der Marker ermöglicht eine Analyse von DNA-Fragmenten zwischen 10 kb und 250 bp, die Intensität der Färbung näherungsweise eine mengenmäßige Zuordnung. Eine Bande entspricht der DNA-Menge von 0,5 µg.

Mit dem GeneRuler™ 1 kb Plus-DNA-Ladder-Marker ist eine Analyse von Fragmenten zwischen 12 kb und 100 bp möglich. Für die Analyse von Bacmid DNA wurde ein λ -Marker benutzt (nicht gezeigt).

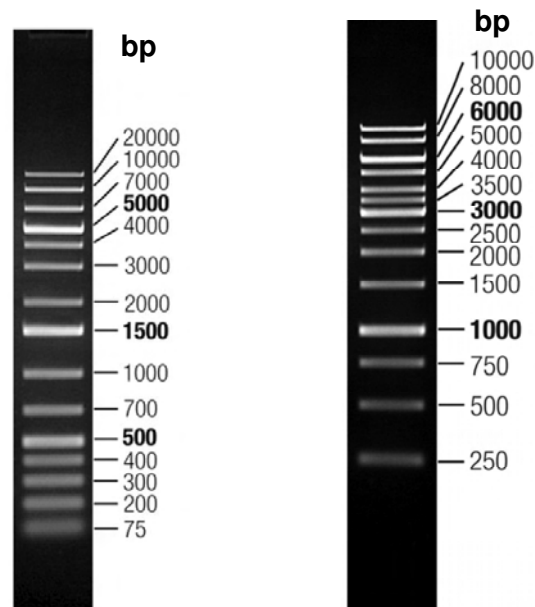


Abb. 6: Verwendete DNA-Marker für die Agarose-Gelelektrophorese.

Links: 1 kb Plus DNA-Ladder (Fermentas). Rechts: 1 kb DNA-Ladder (Fermentas).

3.2.1.10 Dephosphorylierung von DNA

Linearisierte Vektoren, deren Enden symmetrisch sind, zeigen eine hohe Wiederverknüpfungstendenz (Religationsrate). Um die Selbstligationsrate des Vektors zu verringern, wird eine Inkubation des linearisierten Plasmids mit bakterieller alkalischer Phosphatase aus *E. coli* durchgeführt. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung der 5'-terminalständigen Phosphatgruppe der DNA, wodurch die Religationsrate des Vektors stark verringert wird. Die Dephosphorylierung der DNA wird entsprechend den Herstellersangaben (GibcoBRL, USA) durchgeführt. Die in 100 μ l 10 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0 gelöste DNA (1 pmol) wird nach der Zugabe von 1 μ l Phosphatase (1 U/ μ l) 1 h bei 65°C inkubiert. Anschließend wird die DNA mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Deutschland) gereinigt und in 20 μ l Wasser aufgenommen.

3.2.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Unter Ligation (Weiss *et al.*, 1968) versteht man die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mittels einer Ligase. Bei einer Standardligation wird durch Esterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-gruppen der linearisierten Vektor mit der isolierten DNA verknüpft. Die durch die Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten Produkte wurden wegen der glatten Enden (*blunt ends*) mit speziell dafür entwickelten Zero Blunt®-PCR-Cloning-Kit ligiert. Für die Ligation werden Vektor und DNA Ligase (4 U/μl) pro 10 μl Ansatz bei 16°C über Nacht inkubiert und anschließend vollständig zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

3.2.1.12 DNA-Sequenzanalyse

Zur Kontrolle von Klonierungsschritten und zur Sequenzanalyse im allgemeinen werden Sequenzierungen durchgeführt. Zur Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) angewandt. Bei Verwendung eines einzelnen Primers wird dieser durch die Aktivität einer DNA-Polymerase unter Verbrauch von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) komplementär zum Template verlängert. Ein Teil der verwendeten dNTPs besitzt an der 3'-Position keine Hydroxylgruppe (ddNTPs), wodurch es bei deren Einbau zum Abbruch der Amplifikation kommt. Aufgrund der vielfachen Wiederholung einzelner PCR-Zyklen, resultieren verschiedene Längen an DNA-Strängen. Diese können dann in einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung ihrer endständigen Basen charakterisiert werden.

Bei der Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Sequenzierprimern werden 4 pmol Sequenzierprimer mit 1,2 μg DNA auf vier Nukleotidmische („Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit“, Amersham) verteilt und die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 6 μl einem Cycle-Sequencing mit 25 Zyklen (20 s 95°C/ 20 s 60°C/ 10 s 72°C) unterzogen. Anschließend wird 1 ml des zuvor mit 4 μl Gelladepuffer gestoppten Reaktionsmixes auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (LI-COR 4200; MWG-Biotech, Deutschland) analysiert.

Bei der Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden werden etwa 1 μg DNA mit 10 pmol Primer und 4 μl „BigDye“™ Terminator Cycle Sequencing Kit“ Applied Biosystems, UK) in einem Gesamtvolumen von 10 μl gemischt. Nach der Sequenzier-PCR (30 s 96°C; 25 Zyklen 30 s 96°C/ 15 s 55°C/ 4 min 60°C) wird der Ansatz über Centriflex™-Gelfiltrations-Säulchen (Edge BioSystems, USA) gereinigt, wobei die Verunreinigungen, wie

Salze, Enzyme, nicht inkorporierte Primer und Nuklotide an die Säulenmatrix binden. Die eluierten DNA-Fragmente werden durch Trocknung eingeeengt. Danach werden sie in 20 µl Template-Suppression-Reagenz (Applied BioSystems, UK) resuspendiert und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Applied BioSystem, UK) analysiert.

3.2.1.13 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Zellen sind Zellen, welche die Fähigkeit haben, freie, zirkuläre DNA aufzunehmen. Durch Behandlung mit CaCl₂ wird die Zellmembran für DNA-Moleküle durchlässig.

Für die Transformation der Plasmid-DNA in TOP10- oder INVαF'-Zellen wurden entweder kommerziell erhältliche kompetente Zellen (Invitrogen) oder selbst hergestellte kompetente *E. coli*-Zellen verwendet.

Für die Transposition in die Bacmid-DNA wurden DH10Bac™ Zellen herangezogen. Zur Herstellung von DH10Bac™ Zellen wurde den Roti®-Transform-Kit von Roth (Deutschland) verwendet. Die kompetenten DH10Bac-Zellen wurden entsprechend den Herstellerangaben gewonnen.

3.2.2 Expression von rekombinantem Protein in *E. coli*-Zellen

Die Überexpression von rekombinantem Protein in *E. coli*-Zellen erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers des Expressionsvektors pGEX (Amersham). Die Überexpressionen sind mit dem Bakterienstamm BL21 durchgeführt worden.

3.2.2.1 Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen

Zunächst wurden die Vektoren wie unter 3.2.1.1 beschrieben in BL21-Zellen transformiert. Einzelne Kolonien wurden in einer Übernachtskultur in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) bis zur stationäre Wachstumsphase bei 37°C im Schüttelinkubator bei 225 U/min kultiviert. Diese 2 ml-Übernachtskultur diente als Vorkultur und wurde zu 18 ml LB-Medium zugefügt. Sie wurde unter identischen Bedingungen wie schon beschrieben bis zur OD₆₀₀

von 0,5 vermehrt. Durch Zugabe von Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid (IPTG) wurde die Proteinexpression induziert. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen für maximale Expression von rekombinantem Protein wurden Pilotexpressionen durchgeführt. Es wurden 2 ml-Aliquots zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und die Bakterienzellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 x g und 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die gefrorenen Zellsedimente wurden in 200 μ l PBS mit 1 mmol/l DTT; 1 mmol/l PMSF; 0,1 mmol/l EDTA resuspendiert. Die Suspensionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und sofort wieder auf 37°C erwärmt. Dieser Frier-Tau-Zyklus wurde sechsmal wiederholt, bis die Zellen komplett lysiert waren. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten wurden im Anschluss bei 20000 x g und 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für weitere Analysen verwendet. Das Sediment wird in 200 μ l PBS resuspendiert und den gleichen Analysen unterzogen.

Die maximale Expression von rekombinantem Protein wird nicht nur in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (0-6 h) mit IPTG ermittelt. Die Bakterien wurden zusätzlich bei 30°C bzw. 37°C kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von 0,1 mmol/l, 0,25 mmol/l, 0,5 mmol/l und 1 mmol/l IPTG induziert. Proben sind jede Stunde entnommen worden und wurden bei Raumtemperatur und 8000 U/min 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden lysiert, Überstand und das Sediment wurden entnommen und mit dem Probenpuffer reduziert. Es zeigte sich, dass eine maximale Proteinausbeute durch Kultivierung der Bakterien bei 37°C und einer Induktion mit 0,5 mmol/l IPTG für 3 - 6 Stunden erzielt werden konnte.

3.2.2.2 Zellaufschluss und Herstellung zellfreier Extrakte aus *E. coli*-Zellen

Die *E. coli*-Zellkulturen wurden schonend bei 8000 U/min und 4°C zentrifugiert. Zellsedimente wurden bei -20°C gelagert oder nach Resuspension in Lysepuffer (10 mmol/l Natriumphosphatpuffer, pH 7,5; 1 mmol/l EDTA; 1 mmol/l PMSF) in einem Hochdruck-Zellaufschlussgerät (French-Press) bei einem Druck von 1 kbar lysiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C wurde der cytosolische Überstand für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

3.2.3 Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen

Zur Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen mit dem BAC-TO-BAC®-Baculovirus-Expressionssystem wird das Gen durch einen Virus in Insektenzellen eingeschleust und dort exprimiert. Die Überexpression des rekombinanten Proteins erfolgt entsprechend der Herstellerempfehlung.

3.2.3.1 Herstellung von rekombinanter Bacmid-DNA

Zunächst wird die zu untersuchende DNA-Sequenz mit den unter 3.2.1 beschriebenen Methoden in das pFastBac™-Donorplasmid kloniert. Für die anschließende Transposition in die Bacmid-DNA werden DH10Bac™-*E. coli*-Zellen mit dem pFastBac™-Donorplasmid transformiert. 100 µl kompetente DH10Bac™-Zellen werden mit 5-10 µg Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis gestellt. Nach einem 45 s-dauernden Hitzeschock bei 42°C werden die Bakterien nochmals für 2 min auf Eis gestellt und anschließend werden 400 µl SOC-Medium zugegeben. Die Bakterien werden zur Regeneration für 4 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, anschließend jeweils 100 µl Probe auf LB-Kanamycin/Gentamycin/Tetracyclin-Platten ausplattiert und für mindestens 24 h bei 37°C inkubiert. Neben den Antibiotika für die Selektion enthalten die LB-Platten Bluo-Gal und IPTG, damit durch die blau-weiß-Selektion die Klone, bei denen homologe Rekombinationen zwischen Donorplasmid und Bacmid-DNA stattgefunden haben, identifiziert werden können. Schließlich werden positive, weiße Klone zur phänotypischen Überprüfung erneut auf LB-Kanamycin/Gentamycin/Tetracyclin-Platten ausgestrichen.

3.2.3.2 Analyse der Bacmid-DNA

Die rekombinante Bacmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin® Purification-Kit (Macherey-Nagel, Deutschland), wie unter 3.2.1.2 beschrieben, aus den DH10BAC™-Zellen isoliert. 5 µl der isolierten Bacmid-DNA wurden anschließend auf einem 0,5%igen (G/V) Agarosegel bei 20 V (14-16 h) elektrophoretisch aufgetrennt, analysiert und näherungsweise quantifiziert, wobei eine *Hind*III-verdaute λ-DNA als Größenstandard diente.

3.2.3.3 Herstellung von rekombinantem Virus

Für die Transfektion, d.h. die Aufnahme der rekombinanten Bacmid-DNA, werden pro Vertiefung („Well“) einer Zellkultur-6-Well-Platte (Falcon, USA) 9×10^5 Sf9-Insektenzellen in 2 ml Grace's-Medium ausgesät und für mindestens 1 h bei 27°C inkubiert, damit die Zellen adhäreren können. Währenddessen werden mindestens 5 µl Bacmid-DNA in 100 µl Sf-900 II-Medium und 6 µl Cellfectin (Invitrogen) in weiteren 100 µl Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gelöst. Nachdem die Cellfectin-Lösung gut durchgemischt wurde, werden beide Lösungen zusammengegeben, vorsichtig geschüttelt und der Transfektionsmix für 45 min bei RT inkubiert, damit sich DNA-Lipid-Komplexe bilden. Die adhärerten Sf9-Zellen werden pro Well mit 2 ml Sf-900 II-Medium gewaschen. Anschließend werden zu jedem Transfektionsmix 800 µl Sf-900 II-Medium gegeben, der Ansatz gut gemischt und die Sf9-Zellen vorsichtig mit dieser Lösung überschichtet. Dabei ist darauf zu achten, dass die Insektenzellen nicht austrocknen. Die Sf9-Zellen werden mit dem Transfektionsmix für mindestens 5 h bei 27°C inkubiert. Danach wird der Transfektionsmix entfernt, die Zellen mit 2 ml Grace's-Medium überschichtet und weiter bei 27°C inkubiert. Nach 72 h wird der Medienüberstand, in dem sich die gebildeten Viren befinden, abgenommen (Transfektionsüberstand) und für weitere Experimente bei 4°C gelagert.

3.2.3.4 Amplifikation von Baculoviren

Für die Expressionsversuche müssen die Viren zunächst vermehrt werden, um größere Virusmengen zu bekommen. Dafür werden 30 ml Sf9-Insektenzellsuspension mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 500 µl Transfektionsüberstand infiziert und für 5 Tage bei 27°C geschüttelt. Durch 5-minütige Zentrifugation bei $1000 \times g$ und RT werden die Insektenzellen sedimentiert. Der virushaltige Medienüberstand wird abgenommen (=Urstock) und bei 4°C gelagert.

Für eine weitere Amplifikation des Virus werden 200 ml Sf9-Zellsuspension (Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit 3 ml Urstock infiziert, und bei 27°C und 115 U/min kultiviert. Nach 5 Tagen wird der virushaltige Medienüberstand durch 5-minütige Zentrifugation bei $1000 \times g$ und bei RT geerntet (=Erststock) und bei 4°C gelagert.

Für eine erneute Amplifikation des Virus werden Sf9-Zellsuspensionen (Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit Erststock-Virus bei einer MOI (Multiplicity of Infection) von 0,1 infiziert und bei 27°C geschüttelt (115 U/min). Nach 5 Tagen wird der virushaltige Medienüberstand durch

5-minütige Zentrifugation bei RT und 900 x g geerntet (=Gebrauchsstock) und bei 4°C gelagert. Sämtliche Infektionen werden mit Gebrauchsstock-Viren durchgeführt.

3.2.3.5 Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen

Die Expressionen werden unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt. Insektenzellen werden bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit jeweils entsprechenden Volumina Gebrauchsstock infiziert und unter Schütteln (115 U/min) bei 27°C inkubiert. Nach 48 h werden die Insektenzellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 900 x g (Megafuge 1.0) und RT sedimentiert. Das Zellsediment wird in 1 ml Lysepuffer (pro 10 ml Insektenzellsuspensionskultur) resuspendiert und mit einer French-Press aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten werden im Anschluss bei 20000 x g bei 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wird abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

3.3 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Glutathion-S-Transferase (GST)-Affinitätschromatographie

Das GST-Fusions-Protein ermöglicht die Reinigung und Trennung von GST-gebundenen rekombinanten Proteinen aus dem Proteingemisch. Der GST-Tag befindet sich N-terminal. Die GST-Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-4B durchgeführt. Die Bindungskapazität ist abhängig vom jeweiligen Protein und den Expressionsbedingungen. In eine Säule wird 1 ml der Glutathion-Sepharose-4B gegeben, zunächst mit 6 mol/l Guanidinium-Hydrochlorid in Wasser regeneriert und danach mit 10 ml PBS-Puffer äquilibriert. Die proteinhaltige Fraktion wird langsam auf die Säule aufgetragen. Nach 1 h bei 4°C wurde die Säule mit 10 ml PBS gewaschen, um ungebundenen Proteine zu entfernen. Danach folgte die Elution mit dem Elutionspuffer und Fraktionen (je 5 Tropfen) wurden gesammelt.

Die optimalen Elutionsbedingungen sind von der Inkubationszeit und Konzentration des Glutathions abhängig. Es wurde eine optimale Inkubationszeit von 45 min auf dem

Drehgestell bei 4°C ermittelt. Die höchste Ausbeute wurde durch die Elution mit 10 mmol/l Glutathion in 50 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0 erreicht.

3.3.2 Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätschromatographie

Die rekombinant mit N-terminalem His-Tag exprimierte Proteine können über Ni-NTA-Agarose-Chromatographie aufgereinigt werden. Der proteinhaltige Überstand nach dem Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation wird auf 500 µl Ni-NTA-Agarose (Qiagen) in Poly-Prep-Chromatographiesäulen (BioRad, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor 2 mal mit 1 ml Waschpuffer (50 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 8,0; 300 ml NaCl; 20 mmol/l Imidazol) äquilibriert. Nachdem die Säule mit der Probe 30 min bei 4°C ständig gedreht wurde, wurden nicht bindende Proteine mit 2 x 1 ml Waschpuffer eluiert. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit Elutionspuffer (50 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 8,0; 300 ml NaCl; 100 mmol/l Imidazol) eluiert und Fraktionen zu je 3 Tropfen (ca. 150 µl) gesammelt.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Der Farbstoff Coomassie-Brilliantblau reagiert mit den Proteinen unter Komplexbildung. Es wurden 20 µl der zu messenden Proteinprobe mit 1 ml Bradford-Reagenz (10% (V/V) Phosphorsäure, 5% (V/V) Ethanol, 0,1% (G/V) Coomassie G-250) versetzt und nach gutem Durchmischen für 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 578 nm bestimmt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin.

3.3.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) mit dem Mini-PROTEAN[®]2 und Mini-PROTEAN[®]3-Cell-System der Firma BioRad durchgeführt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an hydrophobe Regionen der Proteine an, wodurch diese denaturieren und außerdem eine stark negative Ladung erhalten. Bei Anlegen einer Spannung ist die

Beweglichkeit der Proteine im SDS-PAGE dann proportional zum Logarithmus ihrer Molmasse.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird ein System aus einem Trenn- und einem Sammelgel verwendet. Das Sammelgel weist einen sauren pH-Wert auf, so dass das im Laufpuffer enthaltene Glycin im Sammelgel nur zu einem geringen Teil als Anion vorliegt. Dadurch kommt es beim Anlegen einer Spannung zu einem Mangel an Anionen im Sammelgel, so dass sich ein starkes lokales elektrisches Feld zwischen den sich schnell bewegenden Chlorid-Ionen und den langsameren Glycin-Anionen aufbaut. Dies führt zu einer stärkeren Beschleunigung der Wanderung der anionischen Proteine in dem großporigen Sammelgel und damit zu einer Fokussierung der Proteine. Mit dem Übergang ins Trenngel gehen die Glycin-Zwitterionen aufgrund des höheren pH-Wertes wieder voll in den anionischen Zustand über, wodurch der Ionenmangel aufgehoben wird und wieder eine konstante Feldstärke im gesamten Gel herrscht. Aufgrund der kleineren Porengröße des Trenngels werden die Proteine entsprechend ihrem Verhältnis Molmasse zu Ladung verlangsamt.

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE werden die proteinhaltigen Proben mit Probenpuffer gemischt und 5 min bei RT inkubiert oder 3 min bei 95°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgt dann 10 min bei einer konstanten Spannung von 120 V, anschließend bei 180 V. Als Größenstandard dient der Molmassenmarker „Precision Plus Protein™ Standards All Blue“ (Bio-Rad).

Lösung A: 30% (V/V) Acrylamid
0,8% (V/V) N,N'-Methylenbisacrylamid

Lösung B: 0,4% (G/V) SDS
1,5 mol/l Tris-HCl, pH 8,8

Lösung C: 0,4% (G/V) SDS
0,5 mol/l Tris-HCl, pH 6,8

Elektrophorese-Laufpuffer: 25 mmol/l Tris-HCl, pH 8,8
192 mmol/l Glycin
0,1% (G/V) SDS

5 x Probenpuffer: 0,3 mol/l Tris-HCl, pH 6,8
50% (V/V) Glycerin
15% (G/V) SDS
0,015% (G/V) Bromphenolblau
50 mmol/l DTT (nur bei reduzierendem Probenpuffer)

Ansatz für 7,5%ige Trenngele: 2,25 ml Lösung A
2,25 ml Lösung B
4,50 ml Aqua bidest.
50 µl 10% (G/V) Ammoniumperoxodisulfat
12 µl Tetramethylethyldiamin

Ansatz für 4%ige Sammelgele: 0,40 ml Lösung A
0,75 ml Lösung C
1,85 ml Aqua bidest.
12 µl 10% (G/V) Ammoniumperoxodisulfat
3 µl Tetramethylethyldiamin

3.3.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Bei einem Proteingehalt von mindestens 0,5 µg können Proteine in Gelen mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 angefärbt werden. Nach der Elektrophorese wird das Trenngel für mindestens 1 h bei RT in der Färbelösung leicht geschüttelt. Verwendet wurde Bio-Safe™ Coomassie Stain BioRad (0,04% (G/V) Brilliant Blue G250 in 5% (V/V) H₃PO₄). Das gefärbte Gel wird anschließend in H₂O (bidest.) bei RT geschüttelt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt sind.

3.3.6 Silberfärbung von Proteingelen

Proteine, deren Menge zwischen 50 ng und 0,5 µg liegt, können in Proteingelen mit der Silberfärbung nachgewiesen werden. Nach der Elektrophorese wird das Trenngel für 20 min bei RT in Fixierlösung (40% (V/V) Ethanol, 10% (G/V) Essigsäure, 0,05% (V/V) Formaldehyd) geschüttelt. Anschließend wird dreimal für 5 min mit 50% (V/V) Ethanol gewaschen.

Dann wird das Gel für 1 min in 0,02% (G/V) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ unter leichtem Schwenken belassen, dreimal 20 s lang in H_2O (bidest.) gewaschen, 15 min in 0,16% (G/V) Silbernitrat mit 0,08% (V/V) Formaldehyd inkubiert und erneut dreimal 20 s mit H_2O (bidest.) gewaschen. Die Färbung erfolgt nach Sichtkontrolle in 5% (G/V) Natriumcarbonat mit 0,0005% (G/V) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und 0,05% (V/V) Formaldehyd für 1-5 min. Das Gel wird zügig in Fixierlösung überführt, wodurch die Färbereaktion gestoppt wird. Nach 20-minütiger Inkubation bei RT in der Fixierlösung wird das Gel bis zum Trocknen in Wasser gelagert.

3.3.7 Western-Blot

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wird in Anlehnung an Towbin (Towbin *et al.*, 1979) im Tank-Blot-Verfahren mit Blotapparaturen der Firma BioRad (Deutschland) durchgeführt. Direkt nach der Elektrophorese wird der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut, so dass die Nitrocellulosemembran (Protran[®]-Nitrocellulose-Transfer-Membran; Schleicher & Schuell, Deutschland) zur Anode zeigt. Der Transfer wird bei 4°C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 1 h in Transferpuffer (25 mmol/l Tris, 160 mmol/l Glycin, 10% (V/V) Ethanol) durchgeführt. Zur Überprüfung des Proteintransfers werden die auf die Membran übertragenen Proteine mit Ponceau-Färbelösung (0,2% (G/V) Ponceau-Rot S, 3% (G/V) Trichloroessigsäure, 3% (G/V) Sulfosalicylsäure) angefärbt. Dazu wird die Membran etwa 1 min in die Färbelösung getaucht und dann mit 1% (V/V) Essigsäure solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Anschließend wird die Membran durch zweimaliges Waschen in PBS (11 mmol/l Na_2HPO_4 , 0,7 mmol/l Na_2HPO_4 , 140 mmol/l NaCl) mit 0,1% (V/V) Tween-20 (PBS-Tween) vollständig entfärbt.

3.3.8 Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen

Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrocellulose-Membran erfolgte immunologisch mit Antikörpern. Dafür wird die Membran zunächst für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit Blockierungspuffer (enthält 5% (G/V) Milchpulver in PBS-Tween) bei Detektion mit den Penta-His-Antikörpern (Qiagen) 3% BSA in TBS (10 mmol/l Tris-HCl pH 7,5; 150 mmol/l NaCl) unter Schwenken inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 5 min in PBS-Tween bzw. TBS-Tween (TBS mit 0,05% (V/V) Tween-20) gewaschen und für 2 h bei RT oder über

Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Als primäre Antikörper wurden Penta-His-Antikörper, der Anti-GST-Antikörper (Amersham Biosciences) 1:200 in TBS-Tween/PBS-Tween bzw. das Fucokinase-Peptid-Antiserum im Blockierungspuffer verdünnt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS-Tween/TBS-Tween für 5 min wurde die Membran für maximal 1 h mit dem sekundären Antikörper bei RT inkubiert.

Die verwendeten sekundären Antikörper Rat-Anti-Mouse (Jackson Immuno Research, USA; 1:5000 in PBS-Tween), Donkey-Anti-Goat- (Dianova, Deutschland; 1:5000 in PBS-Tween) und Goat-Anti-Rabbit (Amersham Biosciences; 1:5000 in PBS-Tween) sind an Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelt, so dass die Blotmembranen mit dem Enhanced-Chemoluminescence-Luminol (ECL)-System entwickelt werden konnten. Zuvor wird die Membran noch zweimal mit PBS-Tween/TBS-Tween und PBS/TBS gewaschen, anschließend mit Whatman-Papier getrocknet und in eine Folie gelegt. Durch Inkubation der Blotmembran für ca. 3 min mit einer frisch hergestellten Mischung aus 10 µl 6,8 mmol/l p-Cumarsäure in DMSO, 1 ml 1,25 mmol/l Luminol in 0,1 mol/l Tris-HCl, pH 8,5 und 3 µl 3% (V/V) H₂O₂ entsteht - katalysiert durch die Peroxidase - eine Chemolumineszenz, deren Signale mit einer LAS-1000-Kamera (Fuji, Japan) für 30 s bis zu einigen min aufgenommen wurden.

3.3.9 Abspaltung der Glutathion-S-Transferase (GST) von Fusionsproteinen mit Thrombin-Protease

Der Expressionsvektor pGEX hat vor der Multiple-Cloning-Site eine eingebaute Erkennungssequenz für die Endopeptidase-Thrombin. Diese Erkennungssequenz ermöglicht die enzymatische Abspaltung der GST von dem rekombinanten Protein nach dessen Expression. Dabei kann die Spaltung sowohl direkt an der Säule („On Column Cleavage“), als auch in gereinigten Fraktionen nach der Elution („Off Column Cleavage“) durchgeführt werden.

„On Column Cleavage“

Das an der Glutathion-Sepharose-4B-Säule gebundene GST-Fusionsprotein wird auf der Säule mit Hilfe von 100 U Thrombin-Protease (gelöst in 1 ml PBS) über Nacht bei RT abgespalten. Eluiert wird das GST-freie Protein mit 10 ml PBS, während das abgespaltene GST nach der Thrombin-Verdauung an der Säule gebunden bleibt. Die Protein enthaltene Fraktionen werden in der SDS-PAGE analysiert.

„Off Column Cleavage“

Nach der Reinigung über die GST-Säule wurden in Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt jeweils 2 U und 4 U Thrombin-Protease zugegeben und über Nacht entweder bei RT, bei 22°C oder bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Spaltung wurde in SDS-Page analysiert.

3.4 Herstellung von Peptid-Antikörpern gegen Fucokinase

Die Immunisierung von Tieren dient der Gewinnung von Antikörpern. Die Immunisierung kann entweder mit einem vollständigen Protein oder mit einer bestimmten Peptid-Sequenz des Proteins, von der angenommen wird, dass sie hoch immunogen und spezifisch ist, erfolgen. Dabei muss das Antigen in einem hohen Reinheitsgrad vorliegen, um mögliche Kreuzreaktionen zu minimieren.

Die mit Hilfe eines Automaten hergestellten Peptid-Antigene wurden durch HPLC gereinigt und erreichten einen hohen Reinheitsgrad. Das künstliche Fucokinase-Peptid wurde an ein Trägerprotein gekoppelt. Es wurde hierfür das Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH), ein hochmolekulares Protein (8-32 Millionen Da) aus der Hämolymphe der Schlüssellochschnecke (*Megathura crenulata*) genutzt.

3.4.1 Immunisierung und Serumgewinnung

Um größere Mengen an Antiseren zu gewinnen, wurden für die Immunisierung Kaninchen in Alter von 3 Monaten verwendet. Pro Antigen wurden 3 männliche Kaninchen der Rasse „Deutscher Riese“ immunisiert. Vor der Immunisierung wurde eine Blutentnahme (00) durch die Venenpunktion der Ohrvene oder der Ohrarterie (Vena auricularis lateralis bzw. medialis; Arteria auricularis) durchgeführt. Als Antigen diente 150 µg KLH-gekoppeltes Peptid pro Tier. Bei der Primärimmunisierung wurde zusätzlich 0,025 ml komplettes Freud'sches Adjuvans (FCA) eingesetzt. Am 20. Tag wurden die Tiere subcutan mit 0,25 ml von inkomplettem Freud'schen Adjuvans (FIA) „geboostert“. Die weiteren „Booster“ folgten an den Tagen 30, 40, 60, 75 und 90. Die subkutane Applikation des Antigens bei den Kaninchen erfolgte seitlich am Thorax.

Es folgten die Blutentnahmen an den Tagen 61 und 90. Die Terminalpunktion durch Herzpunktion wurde unter Injektionsnarkose mit Ketamin (60 mg/kg) und Xylazin (5 mg/kg) i.m. an dem Tag 120 durchgeführt. Das aufgefangene Blut wurde bei Raumtemperatur ca.

3 h stehen gelassen und anschließend bei 1000 x g 20 min lang zentrifugiert, damit das Serum gewonnen wird. Bis zur Auswertung wurden die Seren bei 4°C aufbewahrt oder längerfristig bei -80°C gelagert.

3.4.2 Analyse der Fucokinase-Peptid-Antikörpern durch die Dot-Blot-Methode

Auf Nitrocellulosemembran werden unterschiedliche Mengen (50 ng, 100 ng und 500 ng) an dem Peptid punktförmig aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde die Membran in 5% (G/V) Milchpulver in PBS-Tween über Nacht bei 4°C geschüttelt. Es folgte eine Inkubation über 1 h bei RT mit dem Antiserum (1:500 mit PBS-Tween verdünnt). Der Sekundär-Antikörper: Goat-Anti-Rabbit wurde nach dem Waschen mit PBS-Tween (3 mal) im Verhältnis 1:10000 eingesetzt und 1 h unter gleichen Bedingungen inkubiert, anschließend wurde die Membran mit der ECL-System entwickelt. Um die Bindung des Peptid-Antikörpers an die Nitrocellulose-Membran zu überprüfen, wurde das Antiserum/PBS (1:200) zuerst mit dem Peptid in einer Konzentration von 20 µg/ml und 40 µg/ml inkubiert. Damit sollten die Peptid-Antikörper vollständig besetzt werden, so dass die auf die Nitrocellulose aufgetragenen Peptide nicht mehr detektiert werden sollten. Die weitere Analyse wurde wie oben beschrieben, durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Probe nur mit dem Peptid ohne Zugabe von Kaninchen-Antiserum bzw. die alleinige Antiserum-Probe. Die weitere Immun-detektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3.4.3 Herstellung von Fucokinase-haltigen Ratten- und Mäusegehirn-Fractionen

Die frisch entnommenen Ratten- und Mäusegehirne wurden sofort für die Organpräparation benutzt oder umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zum Verbrauch gelagert. Das Organ wurde gewogen und im Mengenverhältnis 1:5 mit 40 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l PMSF versetzt. Anschließend wurden die Gehirne unter Eiskühlung durch 25 Hübe (für das Rattengehirn) bzw. 15 Hüben (für das Mäusegehirn) mit einem S-Pistell homogenisiert. Das Homogenat wurde 45 min bei 40000 x g und 4°C zentrifugiert.

Der erhaltenen cytosolischen Überstände wurde anschließend auf einen MonoQ HR5/5-Anionenaustauscher (1 ml; Amersham) gegeben. Die Säule wurde mit 5 ml 40 mmol/l Tris-HCl pH 7,2, 1 mmol/l EDTA gewaschen, die Proteine anschließend mit 10 ml eines linearen

Gradienten von 0 – 600 mmol/l NaCl in 40 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2, 1 mmol/l EDTA eluiert. In den Fraktionen wurde die Fucokinaseaktivität über ein radiometrisches Testsystem bestimmt und die Fraktionen mit der höchsten Aktivität für die weiteren Versuche eingesetzt. Der Fucokinase-Testansatz enthielt 65 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5, 20 mmol/l MgCl₂, 20 mmol/l ATP, 100 µmol Fucose, 100 µCi 3H-Fucose und unterschiedliche Proteinmengen in 200 µl Gesamtvolumen. Der Ansatz wurde 3 h bei 37°C inkubiert und die radioaktiven Produkte und Edukte anschließend durch absteigende Papierchromatographie getrennt und in einem Szintillationszähler quantifiziert.

3.4.4 Analyse der Fucokinase-Peptid-Antikörper mittels Western-Blot-Methode

Die Fraktionen mit Fucokinase sowie die Proteine des Überstands aus den Gehirnhomogenaten der Maus und der Ratte wurden in der SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und auf Nitrocellulose-Membran übertragen, der Erfolg durch Ponceau-Färbung kontrolliert. Die Blots dienen für die Analyse der Kaninchenserum (Anti-Fucokinase-Peptid-Antikörper). Nach der Übertragung von Proteinen auf eine Nitrocellulose-Membran wurden die Proteine mit 5% (G/V) Milchpulver in PBS-Tween über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Blots wurden mit dem Primärserum des Kaninchens Tag 00, Tag 60 und Tag 91 in den Verdünnungen 1:200 bzw. 1:500 für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurde der Sekundärantikörper (Goat-Anti-Rabbit) in den Verdünnungen 1:5000 bzw. 1:10000 zugegeben und ebenfalls für 1 h inkubiert. Das Ergebnis wurde durch ECL dokumentiert.

3.4.5 Analyse der Fucokinase-Peptid-Antikörper mittels Immunopräzipitation

10 mg Protein-A-Sepharose wurden mit 10 mmol/l NaH₂PO₄, pH 7,8, 500 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1% (G/V) BSA, 1% (V/V) Triton für 30 min bei 25°C inkubiert. Nach der Vorbereitung der Protein-A-Sepharose wurden 20 µl Serum mit Peptid-Antikörpern auf die Säule gegeben. Als Negativkontrolle wurde eine Säule mit 20 µl PBS versetzt. Nach der Inkubation von 1 h wurden die Säulen 3 mal mit PBS ausgewaschen und mit 250 µl Gehirnhomogenat für 2 h auf dem Drehgestell inkubiert. Der Durchlauf wurde gesammelt und die Fucokinaseaktivität bestimmt. Anschließend wurden die Säulen 3 mal mit 1 ml PBS gewaschen, kurz abzentrifugiert und der Überstand mit 25 µl Probenpuffer für 3 min gekocht. Die Probe wurde noch einmal zentrifugiert und in ein neues Gefäße überführt. Anschließend

wurden die Proben auf SDS-PAGE aufgetragen und nach der elektrophoretischen Trennung eine Silberfärbung durchgeführt.