

2. Material und Methoden

2.1 Molekulargenetische Methoden

2.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Soweit nicht anders angegeben wurde für eine PCR der folgende Ansatz pipettiert:

0,5	µl	<i>sense</i> -Primer (25 pmol, BioTez)
0,5	µl	<i>antisense</i> -Primer (25 pmol, BioTez)
0,5	µl	dNTPs (250 µM Endkonzentration, Larova)
2,0	µl	10 x Taq-Puffer (MBI Fermentas)
2,0	µl	MgCl ₂ (2,5 mM Endkonzentration, MBI Fermentas)
1,0	µl	DMSO
0,5	µl	Taq-Polymerase (MBI Fermentas)

Zu diesem Ansatz wurden etwa 1-10 ng Plasmid-DNA, 1-2 µl cDNA oder 0,2-1 µl eines Ligationsansatzes als *Template* zugegeben. Es wurde mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde mit 20 µl Paraffin überschichtet.

Die PCR erfolgte soweit nicht anders angegeben nach dem folgenden Schema:

1 x	5 min	95 °C	Denaturierung
35 x	30 s	95 °C	Denaturierung
	30 s	45-60 °C	<i>Annealing</i>
	45 s	72 °C	Polymerisation

Die *Annealing*temperatur betrug im allgemeinen 2-4 °C unterhalb der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur der Primer. Primer für eine Klonierung mit Hilfe von Restriktionsenzymstellen wurden mit einem 5'-Überhang von vier Basen (GCGG) generiert, daraufhin folgte die Schnittstelle des entsprechenden Restriktionsenzym und 18-21 Basen der zu klonierenden Sequenz. Die *Annealing*temperatur betrug in diesem Fall für zwei Cyclen 2-4 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer im Bereich der zu klonierenden Sequenz und für 33 Cyclen 60 °C.

Für die Synthese von *blunt-end*-DNA-Fragmenten zur *blunt-end*-Klonierung oder für eine folgende Ligation der PCR-Produkte wurde Pfu-Polymerase (Stratagene) verwendet. Der Ansatz wurde dann wie oben ohne Magnesium pipettiert. Anstelle von 10 x Taq-Puffer wurde der 10 x Pfu-Puffer (Stratagene) verwendet.

2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 100-5000 bp Länge wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer/0,2 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V. Die Größenbestimmung erfolgte durch den Vergleich mit einem 100 Basenpaar-DNA-Marker (Life Technologies).

Die Auftrennung von verdauter genomischer DNA (bis 30 kbp) wurde in 0,8 %igen Agarosegelen durchgeführt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 30 V für 18 h. Zum Färben wurden die Gele 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) geschüttelt, die Größenbestimmung erfolgte durch den Vergleich mit dem λ-PstI-DNA-Marker (Life Technologies).

DNA-Proben wurden vor dem Auftragen 1:5 mit DNA-Ladepuffer versetzt. Die Visualisierung der DNA erfolgte unter UV-Licht mit einer Geldokumentationsanlage (Herolab).

50 x TAE-Puffer: 2 M Tris, 5,7 % Essigsäure, 50 mM EDTA; pH 8,0
10 x TBE-Puffer: 1,34 M Tris, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA; pH 8,0
DNA-Ladepuffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 50 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau;
pH 8

2.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde die DNA-Lösung 1:100-1:50 mit Wasser versetzt. Es wurde die Absorption bei 260 nm am Photometer bestimmt. Hierbei entsprach 1 OD einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.1.4 Reinigung von Nukleinsäuren

2.1.4.1 Reinigung von DNA mit Glasmilch

Zur Reinigung von DNA mit Glasmilch wurde der *Fast'n Easy DNA Purification Kit* (Anansa) verwendet. Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (2.1.2) wurde das Fragment unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und 1:3 (w/v) mit 6 M NaI versetzt. Zur Reinigung löslicher DNA wurde die DNA-Lösung 1:3 (v/v) mit 6 M NaI versetzt. Die weitere Reinigung erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend.

2.1.4.2 Ethanol-Fällung von DNA

Gelöste DNA wurde 1:10 mit 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen Ethanol (abs.) versetzt. Es wurde 1 h bei -80 °C inkubiert und dann 30 min bei 14000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde einmal mit eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Es wurde erneut 10 min bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde vollständig abgenommen. Das Pellet wurde getrocknet (ca. 5 min bei 50 °C) und in Wasser aufgenommen.

2.1.4.3 Reinigung von Plasmid-DNA nach der Boil-Präp-Methode

Zur Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterienzellen nach der *Boil-Präp*-Methode wurden 1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur 2 min bei 14000 x g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 30 µl *Boil-Präp*-Puffer resuspendiert und nacheinander 5 min bei RT, 1 min bei 95 °C und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 14 000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA, das Pellet wurde verworfen.

Boil-Präp-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 2 mg/ml Lysozym, 0,01 % BSA, 0,01 % RNase A, 15 % Saccharose; pH 8
sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert

2.1.4.4 Reinigung von Plasmid-DNA (Mini-, Maxi-Präparation)

Zur Reinigung von Vektor-DNA wurden der Invisorb Spin Plasmid Mini Kit (Invitek) bzw. der Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet.

Für eine Mini-Präparation wurden 3 ml einer Übernachtskultur bei 14000 x g abzentrifugiert. Die DNA-Reinigung erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 50-100 µl 60 °C warmes Wasser verwendet.

Für eine Maxi-Präparation wurden 2 x 500 ml Übernachtskultur für 20 min bei 6000 x g abzentrifugiert. Die DNA-Reinigung aus jeweils 500 ml Bakterienkultur erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Maxi-Präparations-Säule wurde zweimal für jeweils 500 ml Bakterienkultur mit demselben Plasmid benutzt. Die DNA wurde wie angegeben mit Isopropanol gefällt und in 100-200 µl Wasser aufgenommen.

2.1.4.5 RNA-Präparation

Cytoplasmatische RNA aus kultivierten humanen Zellen wurde mit dem RNA-Präparationskit der Firma Qiagen (Mini) isoliert. Hierfür wurden 3-5 x 10⁵ Zellen (2.3.1.4) verwendet. Die Präparation erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend. Die Elution erfolgte mit 50 µl DEPC-Wasser.

2.1.4.6 cDNA-Präparation

Zur Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA wurden 3 µg der gereinigten RNA (2.1.4.5) eingesetzt. Die RNA wurde mit 200 ng oligo(dT)₁₇-Primer (BioTez) und DEPC-Wasser (Gesamtreaktionsansatz inklusive unterer Reagentien: 30 µl) versetzt und 10 min bei 65 °C inkubiert.

Zu diesem Ansatz wurden 6 µl 5 x RT-Puffer (Life Technologies), 1,5 µl 10 mM dNTPs (Larova), 3 µl 100 mM DTT und 1,5 µl (300 U) Reverse Transkriptase (Superskript, Life Technologies) gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zum Verdau der RNA wurden dann 30 µl DEPC-Wasser, 6 µl Strangpuffer II und 50 U RNase H (TaKaRa) zum Ansatz gegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde für 10 min bei 80 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.1.4.7 Präparation genomischer DNA

Zur Präparation genomischer DNA aus kultivierten humanen Zellen wurde das Zellpellet aus 5×10^7 Zellen (2.3.1.4) in 1 ml TE-Puffer aufgenommen, mit 10 ml Extraktionspuffer versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Zu der Suspension wurde Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) gegeben, und es wurde 4 h bei 50 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf RT abgekühlt, in ein Zentrifugationsröhrchen überführt, mit einem Volumen Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol 25:24:1 versetzt und vorsichtig gemischt, bis sich eine Emulsion gebildet hatte. Es wurde für weitere 10 min vorsichtig geschüttelt. Dann wurde für 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Die obere (wässrige) Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und erneut mit Phenol:Chlorophorm:Isoamylalkohol 25:24:1 versetzt. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Gereinigte genomische DNA wurde dann mit Ethanol gefällt (2.1.3.2) und in 1 ml TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0

Extraktionspuffer: 10 mM Tris/HCl, 0,1 M EDTA; pH 8,0, 20 µg/ml RNaseA, 0,5 % SDS

2.1.5 Modifikation von Nukleinsäuren

2.1.5.1 Phosphorylierung von DNA

Für die Phosphorylierung eines PCR-Produktes (2.1.1) wurde das mit Glasmilch gereinigte (2.1.4.1) DNA-Fragment in einem Gesamtansatz von 10 µl mit 1 µl T4-Polynukleotidkinase, 1 µl 10 x Puffer (New England Biolabs) und ATP (1 mM Endkonzentration) versetzt und für 45 min bei 37 °C inkubiert.

2.1.5.2 Restriktionsverdauung von DNA

Für die Verdauung von Insert-DNA für eine nachfolgende Klonierung mit Hilfe von Restriktionsenzymen wurden 0,5-1 µg mit Glasmilch gereinigtes (2.1.4.1) oder Ethanol gefälltes (2.1.4.2) PCR-Produkt (2.1.1) eingesetzt. Alternativ wurde das PCR-Produkt zuvor in einen TOPO-Vektor (2.1.5.3) kloniert, und es wurden für eine Verdauung etwa 2-5 µg mittels Mini-Präparation (2.1.4.4) gereinigter TOPO-Vektor-DNA eingesetzt. Für die Verdauung von Vektor-DNA für eine nachfolgende Klonierung mit Hilfe von Restriktionsenzymen wurden etwa 200 ng mittels Mini-Präparation gereinigter Vektor-DNA eingesetzt.

In einem Gesamtansatz von 20 µl wurden 1 µl (10-20 U) pro Restriktionsenzym und insgesamt 2 µl der jeweiligen 10 x Puffer (MBI Fermentas, Life Technologies oder New England Biolabs) eingesetzt. Der Ansatz wurde 2-6 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Reaktionstemperatur inkubiert.

Um eine Klonierung mittels Schnittkontrolle zu überprüfen, wurde Plasmid-DNA aus Bakterien-Übernachtskulturen mittels *Boil-Präp* (2.1.4.3) isoliert. 10 µl des *Boil-Präp*-Überstandes wurden für eine Verdauung in einem Gesamtansatz von 20 µl eingesetzt und mit 0,5 µl (5 U) pro Restriktionsenzym und insgesamt 2 µl der jeweiligen 10 x Puffer für 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit einer Agarosegelelektrophorese (2.1.2) überprüft.

Für die Verdauung genomischer DNA wurden 30 µg gereinigter genomischer DNA (2.1.4.7) mit insgesamt 20 µl (200-400 U) Restriktionsenzymlösung für 16 h bei 37 °C inkubiert. Um die vollständige Verdauung zu überprüfen, wurde 1/10 des Ansatzes einer Agarosegelelektrophorese unterzogen (2.1.2). Bei unvollständiger Verdauung wurden dem Ansatz weitere 10 µl Enzymlösung zugesetzt, und es wurde erneut 4 h bei 37 °C inkubiert.

2.1.5.3 TOPO-Klonierung

Zur TOPO-Klonierung wurde der TOPOTA-cloning Kit (Invitex) verwendet. Es wurde zunächst eine PCR mit Taq-Polymerase (2.1.1) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde dann 10 min bei 72 °C inkubiert. Es wurden entweder 2 µl des frischen PCR-Ansatzes mit 2,5 µl Wasser und 0,5 µl pCR2.1-TOPO-Vektor versetzt oder der PCR-Ansatz wurde auf ein Agarosegel aufgetragen (2.1.2), und das zu klonierende Fragment wurde mit Glasmilch gereinigt (2.1.4.1). Zu 4,5 µl des gereinigten PCR-Produktes wurden dann 0,5 µl TOPO-Vektor gegeben. Die weitere Ligation und Transformation erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend.

2.1.5.4 Ligation

Für eine Ligation von Vektor- und Insert-DNA wurden etwa 200 ng Insert- und etwa 20 ng Vektor-DNA eingesetzt, die zuvor mit Glasmilch (2.1.4.1) gereinigt worden waren. Für eine Ligation wurde 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl 10 x Puffer (TaKaRa) in einem Gesamtansatz von 10 µl eingesetzt. Der Ansatz wurde 4-16 h bei 16 °C inkubiert. Alternativ wurde zur Ligation der *Rapid Ligation*-Kit der Firma Roche verwendet. Die Ligation erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend.

Für die Ligation zweier PCR-Produkte (2.1.1) wurden 0,5-1 µg über Glasmilch gereinigtes PCR-Produkt und 0,2-0,5 µg phosphoryliertes (2.1.5.1) und Ethanol gefälltes (2.1.4.2) PCR-Produkt eingesetzt. Es wurde mit 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl 10 x Puffer (TaKaRa) in einem Gesamtansatz von 10 µl für 2 h bei 16 °C inkubiert.

2.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

2.1.6.1 Herstellung von Kulturmedium und -platten

Für die Anzucht von Bakterien wurde Kulturmedium mit der folgenden Zusammensetzung verwendet: 0,5 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Pepton.

Für die Anzucht von Bakterienkolonien wurden Agarkulturplatten mit der folgenden Zusammensetzung verwendet: 0,5 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Pepton, 1,5 % Agar.

Zur Selektion wurden dem Medium/den Platten 100 µg/ml (Endkonzentration) Ampicillin und/oder 25 µg/ml (Endkonzentration) Kanamycin zugesetzt.

2.1.6.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen

Zur Transformation von Plasmiden oder Ligationsansätzen wurden transformationskompetente *E. coli*-Zellen (NM522/Amersham Pharmacia, M15/Qiagen, JM109/Promega) verwendet. Für die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 ml Medium (2.1.5.1) mit etwa 1 ml einer Bakterien-Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 aufgezogen. Die Zellen wurden 5 min bei 3000 x g abzentrifugiert, und das Zellpellet wurde vorsichtig in 20 ml 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h auf Eis inkubiert, erneut 5 min bei 3000 x g zentrifugiert und das Zellpellet wurde in 4 ml 50 mM CaCl₂ vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde 1-24 h auf Eis aufbewahrt und konnte innerhalb dieser Zeit für eine Transformation mittels Hitzeschock verwendet werden.

2.1.6.3 Transformation mittels Hitzeschock

Für die Transformation wurden 50-300 µl Zellsuspension kompetenter Zellen (2.1.6.2) mit 10 µl eines Ligationsansatzes (2.1.5.4) bzw. 10-100 ng mittels Mini-Präparation (2.1.4.4) gereinigter Vektor-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann für 30-45 s bei 42 °C inkubiert und nachfolgend 2 min auf Eis gekühlt. Zu der Zellsuspension wurden 500 µl Kulturmedium (2.1.6.1) gegeben, und es wurde für 30-60 min bei 37 °C im Brutschrank horizontal geschüttelt. Dieser Ansatzes wurde dann auf eine Agarkulturplatte (2.1.6.1) mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platte wurde 12-16 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.1.7 Analyse von Nukleinsäuren

2.1.7.1 DNA-Sequenzierung

Zur DNA-Sequenzierung wurde der SequiTherm EXCEL™ II-Kit (Biozym) verwendet. Für eine Sequenzierreaktion wurden 100 ng pro zu sequenzierender Kilobase mittels Mini-Präparation (2.1.4.4) gereinigter Plasmid-DNA (maximal 7,8 µl) und 1-2 pmol des fluoreszent markierten Sequenzierprimers (MWG-Biotech) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend.

Die Trennung der DNA-Fragmente wurde in einem denaturierenden 4,3 %igen Polyacrylamidgel durchgeführt. Zur Präparation des Gels wurden 21 g Harnstoff in 32 ml Wasser gelöst. Zu der Lösung wurden 5 ml 10 x TBE-Puffer, 4,3 ml *Long Ranger gel solution* (Bio Whittaker) und 500 µl DMSO gegeben. Die Lösung wurde entgast, und es wurden 350 µl 10 %iges APS und 50 µl TEMED (Roth) zugegeben. Das Gel wurde in eine 66 cm lange, 0,25 mm dicke Gelapparatur gegossen, die Taschen wurden mit einem Haifischkamm präpariert.

Für die Sequenzierung wurde der DNA-Sequenzierer LICOR 4000 L (MWG-Biotech) verwendet. Das Gel lief bei maximal 2,2 kV und 50 mA in 1 x TBE vor, bis es eine Temperatur von 45 °C erreicht hatte. Dann wurden 1-2 µl der Sequenzierproben pro Gelspur aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie der Vorlauf. Die Sequenzen wurden mit dem Programm *Image Analysis* (MWG-Biotech) ausgewertet.

10 x TBE-Puffer: 1,34 M Tris, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA; pH 8

Sequenzierprimer:

TOPO-Vektor (pCR2.1-TOPO-Vektor, Invitex):

forward: 5`TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3`

reverse: 5`CAG GAA ACA GCT ATG ACC 3`

pQE-Vektoren (-30, -60, Qiagen):

forward: 5`TTG CTT TGT GAG CGG ATA AC 3`

reverse: 5`GGC AAC CGA GCG TTC TGA AC 3`

Flag-Vektor (pFlag-CMV-4TM Expression Vector, Sigma):

forward: 5`ACG GTG GGA GGT CTA TAT AAG 3`

reverse: 5`TGG GGA GGG GTC ACA GGG ATG 3`

2.1.7.2 Southern Blot

Für einen Southern Blot wurde genomische DNA gereinigt (2.1.4.7), verdaut (2.1.5.2) und mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.1.2) aufgetrennt. Zur Depurinierung der DNA wurde das Gel zunächst für 15 min in 250 mM HCl und für 15 min in Wasser geschüttelt und anschließend zur Denaturierung für 30 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und zur Neutralisation für 30 min in 0,5 M Tris/HCl; pH 7,5/1,5 M NaCl geschüttelt.

Für den Transfer der DNA auf Nylon-Membran (Amersham Pharmacia) wurden 2 l 20 x SSC in einer Plastikwanne (Pufferreservoir) vorgelegt. Die Membran und zwei Filterpapiere wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten und in 2 x SSC gebadet. Auf das Pufferreservoir wurde eine Glasplatte als Brücke gelegt, auf die ein langes in 2 x SSC gebadetes Filterpapier plaziert wurde, das an beiden Enden in das Pufferreservoir tauchte. Auf dieses Filterpapier wurden nacheinander luftblasenfrei das Gel mit der Auftragsseite nach unten, die Membran und die beiden Filterpapiere gelegt. Zwischen dem Gel und dem langen Filterpapier wurde außerdem am Rand Parafilm angebracht, um einen Kurzschluß zwischen den oberen und den unteren Filtern zu vermeiden. Auf die oberen Filterpapiere wurde dann eine 10 cm dicke Lage Zellstoff in Gelgröße und eine Glasplatte plaziert. Der Blotaufbau wurde mit etwa 3 kg beschwert.

Der Transfer wurde für 16-18 Stunden durchgeführt. Beim Abbau wurde das Gel und die Membran gleichzeitig abgenommen, die Taschen des Gels wurden auf der Membran mit Kugelschreiber markiert.

20 x SSC: 3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat; pH 7,0

2.1.7.3 Nachweis von immobilisierten Nukleinsäuren durch radioaktiv markierte Sonden

Zur Präparation einer radioaktiv markierten Sonde wurde der *Readiprime II Labelling-Kit* (Amersham Pharmacia) verwendet. Hierfür wurden den Angaben des Herstellers entsprechend 100 ng mit Glasmilch gereinigtes (2.1.4.1) PCR-Produkt (2.1.1) eingesetzt. Die Reaktion wurde für 20 min bei 37 °C durchgeführt, es folgte ein Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C.

Zur Hybridisierung wurden der Southern (2.1.7.2) bzw. der Northern Blot (OriGene) 1 h lang in Prähybridisierungspuffer bei 60 °C geschwenkt. Der Prähybridisierungspuffer wurde dann durch Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Die radioaktiv markierte Sonde wurde direkt nach dem Denaturierungsschritt dazugegeben, und es wurde 26 h bei 60 °C inkubiert.

Die Sonde wurde entfernt, und es wurde nacheinander 10 min mit 2 x SSC, 1 % SDS bei 43 °C, 10 min mit 1 x SSC, 0,5 % SDS bei 43 °C und 2 x 10 min mit 1 x SSC, 0,1 % SDS bei 43 °C gewaschen. Der Blot wurde in Frischhaltefolie verpackt und autoradiographiert. Hierfür wurde ein Biomax MR-1-Film (Kodak) und der Exposure Casette-Intensifying Screen (Kodak) verwendet. Es wurde 2-10 Tage bei -80 °C inkubiert. Die Filme wurden in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

Prähybridisierungspuffer:	6 x SSPE, 5 x Denhardt's, 0,5 % SDS, 100 µg/ml Heringssperma-DNA
Hybridisierungspuffer:	6 x SSPE, 5 x Denhardt's, 0,5 % SDS
100 x Denhardt's	2 % Ficoll (Typ 400), 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 % BSA
20 x SSPE	3 M NaCl, 200 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM EDTA; pH 7,4
20 x SSC:	3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat; pH 7,0

2.1.8 Klonierung der humanen NAD⁺-Kinase-cDNA

2.1.8.1 Klonierung der humanen NAD⁺-Kinase-cDNA in den TOPO-Vektor

Zur Amplifikation der NAD⁺-Kinase-cDNA wurden 2 µl der cDNA (2.1.4.6) aus Wi 38-Zellen als *Template* für eine PCR (2.1.1) verwendet. Folgende Primer aus der nichtkodierenden Sequenz der NAD⁺-Kinase wurden verwendet:

NK *sense*: 5' AAC GGC ATC AGT GTT TTT CTG 3'
NK *antisense*: 5' GAT TCG GGC CTG GAT AGG 3'

Es wurde mit Taq-Polymerase bei einer *Annealing*-Temperatur von 56 °C amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über Glasmilch (2.1.4.1) gereinigt und in einen TOPO-Vektor kloniert (2.1.5.3). Positive Klone wurden mittels Schnittkontrollen (2.1.5.2) ermittelt, durch Mini-Präparation (2.1.4.4) wurde das Plasmid isoliert und anschließend sequenziert (2.1.7.1).

2.1.8.2 Klonierung der humanen NAD⁺-Kinase-cDNA in den pQE-30 Vektor

Zur Überexpression der NAD⁺-Kinase in Bakterienzellen wurde die cDNA in einen prokaryotischen Expressionsvektor (pQE-30, Qiagen) umklontiert, der das überexprimierte Protein mit einem N-terminalen 6 x Histidin-Tag ausstattet. Hierfür wurde 1 µl der gereinigten TOPO-Vektor-DNA (2.1.8.1) als *Template* für eine PCR (2.1.1) verwendet. Die Primer schlossen die kodierende Sequenz der cDNA der NAD⁺-Kinase ein. Beide Primer hatten einen Überhang von vier Nukleotiden und der *sense* Primer enthielt eine BamHI-Schnittstelle.

NK pQE-30 *sense*: 5' GCG GGG ATC CAT GGA AAT GGA ACA AGA AAA 3'
NK pQE-30 *antisense*: 5' GCG GGG TAC CCT AGC CCT CCT CCT CCT 3'

Für die PCR wurde Pfu-Polymerase verwendet, um ein *blunt-end*-PCR-Produkt zu generieren. Es wurde ein doppelter PCR-Ansatz pipettiert. Die Amplifikation erfolgte in zwei Cyclen mit einer *Annealing*-Temperatur von 50 °C und weiteren 33 Cyclen mit einer *Annealing*-Temperatur von 60 °C. Die PCR-Ansätze wurden vollständig auf ein 1 %iges Agarosegel (2.1.2) aufgetragen. Die Banden des PCR-Produkts wurde aus dem Gel ausgeschnitten, mit Glasmilch (2.1.4.1) gereinigt, in 7 µl Wasser eluiert und anschließend phosphoryliert (2.1.5.1). Die DNA wurde mit Ethanol gefällt (2.1.4.2) und das Pellet wurde in 16 µl Wasser aufgenommen. Zur Verdauung (2.1.5.2) wurde das phosphorylierte Insert mit 2 µl BamHI-Puffer und 2 µl BamHI versetzt und 4 h bei 37 °C inkubiert.

Der Vektor wurde mit 2 µl SmaI-Puffer und 1 µl SmaI versetzt und 3 h bei 25 °C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde nachfolgend 5 min bei 65 °C inkubiert. Dann wurde der Vektor mit 1 µl Bam HI versetzt und erneut 3 h bei 37 °C inkubiert. Vektor- und Insert-DNA wurden mit Glasmilch gereinigt. Für die Ligation wurde der *Rapid Ligation Kit* verwendet (2.1.5.4). Der Ligationsansatz wurde in *E. coli*-JM109 transformiert (2.1.6.3). Der positive Klon und treue Fintenschläger wurde durch Schnittkontrollen (2.1.5.2) ermittelt, mittels Mini-Präparation (2.1.4.4) wurde das Plasmid isoliert und anschließend sequenziert (2.1.7.1).

Die Klonierung der cDNA der N-terminal verkürzten NAD⁺-Kinase (NK-64, NK-115 und NK-168) und der cDNA der konservierten Domäne (NK169-408) in den pQE-30 Vektor erfolgte nach dem gleichen Schema. Die folgenden Primer wurden zur Amplifikation der entsprechenden DNA-Fragmente verwendet:

NK-64 *sense*: 5'GCG GGG ATC CCT TCA TGG GCC ATG CCC GGT 3'
 NK-115 *sense*: 5'GCG GGG ATC CGC CAG CCT ACT GCA GCC GTT 3'
 NK-168 *sense*: 5'GCG GGG ATC CGA TGA CAT TTC CAA TCA GAT 3'

Als *antisense*-Primer wurde jeweils der NKpQE-30-*antisense*-Primer (s.o.) verwendet.

NK169-408 *antisense*: 5'GCG GGG TAC CCT AGA TGG AGG GGA GCG
 GGT 3'

Als *sense*-Primer wurde der NK-168-*sense*-Primer verwendet.

2.1.8.3 Klonierung der humanen NAD⁺-Kinase-cDNA in den in den FLAG-Vektor

Zur Überexpression der NAD⁺-Kinase in humanen Zellen wurde die cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pFLAG-CMV-4TM Expression Vector, Sigma) umkloniert, der das überexprimierte Protein mit einem N-terminalen FLAG-Tag ausstattet. Zur Klonierung wurde nach dem in 2.1.8.2 beschriebenen Schema vorgegangen, es wurden folgende Primer verwendet:

NK FLAG *sense*: 5'GCG GGA ATT CAA TGG AAA TGG AAC AAG AA 3'
 NK FLAG *antisense*: 5'GCG GGG ATC CCT AGC CCT CCT CCT CCT 3'

Für die PCR (2.1.1) wurde Taq-Polymerase verwendet. Das über Glasmilch gereinigte PCR-Produkt (2.1.4.1) und der Vektor wurden direkt mit BamHI und EcoRI für 2 h bei 37 °C verdaut (2.1.5.2).

2.1.9 Gerichtete Mutagenese und Klonierung der humanen NMNAT-cDNA

2.1.9.1 Gerichtete Mutagenese der humanen NMNAT-cDNA

Für den Austausch des Serins 136 der humanen NMNAT wurde die NMNAT-cDNA in zwei Teilen amplifiziert. Es wurde einerseits ein Teilstück der cDNA amplifiziert, das für die Aminosäuren 1-133 kodiert. Andererseits wurde das Teilstück der cDNA, das für die Aminosäuren 134-279 kodiert mit Hilfe eines Primers amplifiziert, der zu einem Austausch von ein bis zwei Basen in dem Triplet führt, das für die Aminosäure 136 kodiert. Die beiden PCR-Ansätze (2.1.1) wurden mit Pfu-Polymerase angesetzt und erfolgten mit einer *Annealing*-Temperatur von 47 °C. Es wurde jeweils ein doppelter PCR-Ansatz pipettiert, als *Template* diente die in den pQE-30 Vektor (Qiagen) klonierte NMNAT-cDNA. Die äußeren Primer wurden jeweils mit Schnittstellen versehen, so daß die spätere Umklonierung in einen Expressionsvektor möglich war.

Primer zur Amplifikation des Teilstücks 1-133:

NMNAT *sense*: 5`GCG GGG ATC CAT GGA AAA TTC CGA GAA G 3`
 NMNAT 1-133 *antisense*: 5`TTG TGT TTC AGT CCA CTT CCT 3`

Primer zur Amplifikation des Teilstücks 134-279:

NMNAT S136A *sense*: 5`GAT TCT GCT CAA AAG AAA TCC CTA GAG CC 3`
 NMNAT *antisense*: 5`GCG GAA GCT TCT ATG TCT TAG CTT CTG C 3`

Die PCR-Ansätze wurden auf ein 1 %iges Agarosegel (2.1.2) aufgetragen. Die Banden der PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Glasmilch gereinigt (2.1.4.1). Das längere PCR-Produkt (134-279) wurde phosphoryliert (2.1.5.1) und anschließend mit Ethanol gefällt (2.1.4.2). Die beiden PCR-Produkte wurden dann ligiert (2.1.5.4). Die Ligationsansätze wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Für den Austausch des Serins 135 wurde ebenso vorgegangen. Als *Template* für die PCR wurde das in den TOPO-Vektor klonierte NMNAT(S136A)-Konstrukt verwendet (2.1.9.2). Folgender Primer wurde für den Austausch des Serins 135 verwendet:

NMNAT S135/136A *sense*: 5`CAA GAT GCT GCT CAA AAG AAA TCC CTA GA 3`

2.1.9.2 Klonierung der mutierten humanen NMNAT-cDNA in den TOPO-Vektor

Zur Klonierung der mutierten NMNAT-cDNA wurden 0,5 µl des Ligationsansatzes aus 2.1.9.1 als *Template* für eine Vollängen-PCR (2.1.1) verwendet, bei der die beiden Primer NMNAT *sense* und NMNAT *antisense* (2.1.9.1) eingesetzt wurden. Die PCR wurde mit Taq-Polymerase mit einer *Annealing*-Temperatur von 55 °C durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über Glasmilch (2.1.4.1) gereinigt und in einen TOPO-Vektor kloniert (2.1.5.3). Positive Klone wurden mittels Schnittkontrollen (2.1.5.2) ermittelt, mittels Mini-Präparation (2.1.4.4) wurde das Plasmid isoliert und anschließend sequenziert (2.1.7.1).

2.1.9.3 Klonierung der mutierten humanen NMNAT-cDNA in den pQE-30 Vektor

Zur Überexpression der mutierten NMNAT in Bakterienzellen wurde die cDNA in einen prokaryotischen Expressionsvektor (pQE-30, Qiagen) umkloniert, der das überexprimierte Protein mit einem N-terminalen 6 x Histidin-Tag ausstattete. Hierfür wurden gereinigte TOPO-Vektor-DNA aus 2.1.9.2 und gereinigter pQE-30 Vektor für 6 h bei 37 °C mit BamHI und HindIII verdaut (2.1.5.2).

Die Verdauungs-Ansätze wurden auf ein 1 %iges Agarosegel (2.1.2) aufgetragen. Das aus dem TOPO-Vektor ausgeschnittene NMNAT-cDNA-Fragment und die pQE-30 Vektor-DNA wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Glasmilch gereinigt (2.1.4.1). Für die Ligation wurde der *Rapid Ligation Kit* verwendet (2.1.5.4). Der Ligationsansatz wurde in JM109-Zellen transformiert (2.1.6.3). Positive Klone wurden mittels Schnittkontrollen (2.1.5.2) ermittelt, mittels Mini-Präparation (2.1.4.4) wurde das Plasmid isoliert und anschließend sequenziert (2.1.7.1).

2.1.9.4 Klonierung der humanen NMNAT-cDNA in den in den FLAG-Vektor

Zur Überexpression der Wildtyp-NMNAT und der mutierten NMNAT in humanen Zellen wurde die entsprechende cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pFLAG-CMV-4TM Expression Vector, Sigma) umkloniert, der das überexprimierte Protein mit einem N-terminalen FLAG-Tag ausstattete.

Hierfür wurde eine PCR (2.1.1) mit Taq-Polymerase mit einer *Annealing*-Temperatur von 55 °C durchgeführt, bei der die entsprechenden pQE-30-Vektorkonstrukte (2.1.9.3) als *Template* dienten und die folgenden Primer verwendet wurden:

NMNAT FLAG *sense*: 5`GCG GAA GCT TAT GGA AAA TTC CGA GAA G 3`
NMNAT FLAG *antisense*: 5`GCG GGG ATC CCT ATG TCT TAG CTT CTG C 3`

Die PCR-Produkte wurden 2.1.9.2 entsprechend in einen TOPO-Vektor kloniert und 2.1.9.3 entsprechend in den FLAG-Vektor umkloniert.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Überexpression von Proteinen in Bakterienzellen

Zur Überexpression von Proteinen in Bakterienzellen wurden die entsprechenden klonierten Konstrukte in *E. coli* transformiert (2.1.6.3). Einzelne Bakterienkolonien wurden in Übernachtskulturen angezogen.

In einen 1 l-Schikanekolben wurden 350 ml Kulturmedium (2.1.6.1) gefüllt. Das Medium wurde mit 5-10 ml der Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien wurden dann im Brutschrank bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6 erreicht war. Die Expression wurde mit der Zugabe von IPTG (1-2 mM Endkonzentration) induziert. Die Bakterien wurden nach IPTG-Zugabe weitere 3-6 h im Brutschrank bei 37 °C geschüttelt. Dann wurde bei 6000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet wurde einmal mit 20 ml Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde für mindestens 30 min bei -20 °C eingefroren.

2.2.2 Proteinextraktion

2.2.2.1 Gewebeaufschluß und Präparation cytosolischer Fraktionen aus Geweben

Zur Reinigung von Proteinen wurden verschiedene Gewebe aus Rind bzw. Mensch verwendet. Humane Plazenta wurde direkt nach der Geburt auf Eis ins Labor transportiert. Rinderhirn, Rinderleber, Rinderherz, Rindermilz und Rinderblut wurden direkt nach der Schlachtung auf Eis ins Labor transportiert, das Rinderblut wurde zudem am Schlachthof mit Heparin (Sigma, 80 mg/l Endkonzentration) versetzt.

Die festen Gewebe wurden im 4 °C-Kühlraum von der Kapsel und dem Bindegewebe befreit und mit einem Messer in etwa 1 x 1 cm große Stücke zerteilt. Die Stücke wurden im Waring Blendor unter schrittweiser Zugabe des fünffachen Volumens Homogenisierungspuffer homogenisiert. Das Homogenat wurde für eine Stunde bei 4 °C gerührt.

Zur Präparation einer cytosolischen Fraktion wurde das Homogenat für 20 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wurde für 1 h bei 30000 x g und 4 °C zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wies eine Proteinkonzentration von etwa 30-60 mg/ml auf. Die Fraktionen wurden bei -80 °C gelagert. Das Rinderblut wurde bei 1500 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Das Pellet wurde 1:10 mit Lysepuffer versetzt und für 10 min bei 4 °C gerührt. Die Suspension wurde bei 12000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wies eine Proteinkonzentration von etwa 10-20 mg/ml auf. Die Fraktionen wurden bei -80 °C gelagert.

Homogenisierungspuffer:	20 mM Na ₂ CO ₃ , 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DDT, 1 mM PMSF/HCl; pH 7,5
Waschpuffer:	20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl; pH 7,6
Lysepuffer:	20 mM Tris/HCl; pH 7,6

2.2.2.2 Aufschluß von Bakterienzellen

Für den Aufschluß von Bakterienzellen wurde das Pellet aus jeweils 350 ml Bakterienkultur (2.2.1) in 5 ml Puffer (variabel) resuspendiert. Diese Suspension wurde mit 25 U DNase (Roche) versetzt und in einer French Press dreimal bei einem Druck von 10000 PSI aufgeschlossen. Die Suspension wurde dann bei 20000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen. Mit dieser Methode konnten 25-50 mg lösliches Protein extrahiert werden.

2.2.2.3 Aufschluß von humanen kultivierten Zellen

Für den Zellaufschluß zur Extraktion nativer, löslicher Proteine aus humanen kultivierten Zellen wurde das Pellet aus 1×10^7 Zellen (2.3.1.4) in 200 µl Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 1 min in flüssigem Stickstoff inkubiert und auf Eis wieder aufgetaut, diese Prozedur wurde noch zweimal wiederholt. Danach wurde die Suspension bei 14000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen. Mit dieser Methode konnten 0,5-2 mg lösliches Protein extrahiert werden.

Lysepuffer: 10 mM HEPES/KOH; pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF

2.2.2.4 Extraktion von Kernproteinen aus humanen kultivierten Zellen

Zur Präparation von Kernextrakten aus humanen kultivierten Zellen wurde das Pellet aus 1×10^7 Zellen (2.3.1.4) in 400 µl Lysepuffer resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Es wurden dann 25 µl einer 10 %igen NP40-Lösung zugegeben und 10 s gevortext. Anschließend wurde 4 min bei 4000 x g zentrifugiert. Der Überstand (cytosolische Fraktion) wurde abgenommen und das Kernpellet in 50 µl Kernextraktionspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min lang bei 4 °C geschüttelt und nachfolgend 10 min bei 14000 x g zentrifugiert, das DNA-Pellet wurde verworfen. Mit dieser Methode konnten etwa 0,25-0,5 mg lösliche Kernproteine isoliert werden.

Lysepuffer: 10 mM HEPES/KOH, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF; pH 7,9
Kernextraktionspuffer: 20 mM HEPES/KOH, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF; pH 7,9

2.2.3 Proteinreinigung

2.2.3.1 Hitzedenaturierung

Für eine Hitzedenaturierung wurden 200 ml einer cytosolischen Fraktion aus Rindergewebe (2.2.2.1) in einem 1 l-Erlenmeyerkolben für 5 min in einem 60 °C warmen Wasserbad geschwenkt. Bakterienzelleextrakte (2.2.2.2) wurden für 6 min in einem 60 °C warmen Wasserbad geschwenkt. Die Extrakte wurden für 20 min auf Eis gestellt und nachfolgend bei 20000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, das Pellet wurde verworfen.

2.2.3.2 Ammoniumsulfatfällung

Für eine Ammoniumsulfatfällung wurde einem Proteinextrakt bei 4 °C unter ständigem Rühren festes Ammoniumsulfat in kleinen Portionen zugegeben (Einstellung der Sättigungskonzentrationen nach Lehrbüchern der Proteinreinigung). Es wurde für 20 min bei 4 °C gerührt. Die Suspension wurde bei 20000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde entweder für eine weitere Ammoniumsulfatfällung verwendet oder verworfen. Das Pellet wurde zur weiteren Verwendung in 1-5 Volumina Resuspensionspuffer aufgenommen, unlösliche Proteine wurden bei 20000 x g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert und verworfen.

Resuspensionspuffer: 10 mM Tris/HCl; pH 7,8+Ammoniumsulfat, variable Menge

2.2.3.3 Anionenaustauscher-Chromatographie

Für eine Anionenaustauscher-Chromatographie wurde der Macro-Prep-DEAE-Support (Bio-Rad) verwendet. Das Säulenmaterial wurden drei Mal in jeweils fünf Volumina Äquilibriumspuffer gewaschen. Das äquilibrierte Säulenmaterial wurde 30 min mit Proteinextrakt in einem Verhältnis von 20-30 mg Protein/ml Säulenmaterial unter ständiger Rotation inkubiert. Mit dieser Suspension wurde eine Säule gegossen, die mit zwei Säulenvolumina Äquilibriumspuffer und zwei Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen wurde. Die Elution erfolgte im Gradienten insgesamt mit dem Fünffachen (endogenes Protein) oder Zehnfachen (rekombinantes Protein) des Säulenvolumens an Wasch- und Elutionspuffer.

Äquilibriumspuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8
Waschpuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8, 100 mM NaCl
Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8, 1 M NaCl

2.2.3.4 Cibacron Blue-Affinitäts-Chromatographie

Zur Herstellung des Säulenmaterials wurde eine wässrige Lösung Cibacron F₃G-A (Serva, 1 g/60 ml) tropfenweise unter Rühren zu einer 60 °C warmen Suspension aus 175 ml Sepharose CL-4B (Sigma) und 175 ml Wasser gegeben und 30 min gerührt. Zu dieser Suspension wurden 22,5 g NaCl zugegeben, und es wurde erneut 1 h gerührt. Die Suspension wurde auf 80 °C erwärmt, und es wurden 2 g Na₂CO₃ dazugegeben. Das Gel wurde auf RT abgekühlt und auf einem Büchnertrichter mit Wasser gewaschen bis das Eluat farblos war.

Für eine Affinitäts-Chromatographie wurde das Säulenmaterial dreimal in jeweils fünf Volumina Äquilibriumspuffer gewaschen. Das äquilibrierte Säulenmaterial wurde 30-60 min mit Proteinextrakt in einem Verhältnis von 2-5 mg Protein/ml Säulenmaterial unter ständiger Rotation inkubiert. Mit dieser Suspension wurde eine Säule gegossen, mit zwei Säulenvolumina Äquilibriumspuffer gewaschen und nachfolgend isokratisch eluiert.

Äquilibriumspuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8
Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8, 1 M NaCl

2.2.3.5 Nickel-NTA-Chromatographie

Für eine Nickel-NTA-Chromatographie wurde das Säulenmaterial (Qiagen) dreimal in fünf Volumina Äquilibriumspuffer gewaschen. Das äquilibrierte Säulenmaterial wurde 30-120 min mit Proteinextrakt in einem Verhältnis von 20-30 mg Protein/ml Säulenmaterial unter ständiger Rotation inkubiert. Mit dieser Suspension wurde eine Säule gegossen, die mit zwei Säulenvolumina Äquilibriumspuffer und zwei Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen wurde. Die Elution erfolgte im Gradienten insgesamt mit dem 10-20fachen des Säulenvolumens an Wasch- und Elutionspuffer.

Äquilibriumspuffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$; pH 8,0
Waschpuffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$; pH 8,0, 0-20 mM Imidazol
Elutionspuffer: 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$; pH 8,0, 20-250 mM Imidazol

2.2.3.6 Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC)

Für Chromatographien mittels FPLC wurde das System Bio-Logic HR (Bio-Rad) verwendet. Alle verwendeten Puffer wurden durch einen Filter mit einer Ausschlußgrenze von 0,45 μm sterilfiltriert und entgast. Die Elution der Proteine wurde bei 280 nm detektiert.

Für eine Anionenaustauscher-Chromatographie (Bio-Scale Q2 Column, 2 ml) wurde die Säule mit fünf Volumina Äquilibriumspuffer gewaschen. Es wurden 1-5 mg Protein/ml Säulenmaterial aufgetragen. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumina Äquilibriumspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte im Gradienten insgesamt mit dem Zehnfachen des Säulenvolumens an Äquilibriumspuffer- und Elutionspuffer.

Äquilibriumspuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8
Elutionspuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8, 1 M NaCl

Für eine Hydroxylapatit-Chromatographie (Bio-Scale CHT5-I Column, 5 ml) wurde die Säule mit fünf Volumina Äquilibriumspuffer gewaschen. Es wurden 1-5 mg Protein/ml Säulenmaterial aufgetragen. Die Säule wurde mit zwei Säulenvolumina Äquilibriumspuffer gewaschen. Die Elution erfolgte im Gradienten insgesamt mit dem Fünffachen des Säulenvolumens an Äquilibriumspuffer- und Elutionspuffer.

Äquilibriumspuffer: 50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; pH 8,0, 300 mM NaCl
Elutionspuffer: 250 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; pH 8,0, 300 mM NaCl

Für eine Größenausschluß-Chromatographie (Superdex 200 HR10/30, Amersham Pharmacia) wurde die Säule mit fünf Volumina Laufpuffer äquilibriert. Es wurden 0,1-10 mg Protein aufgetragen, die Elution erfolgte isokratisch. Für eine Molekulargewichtsbestimmung wurden folgende Proteine (Sigma) zur Eichung der Säule verwendet: Thyroglobulin (669 kDa, 100 μg), Ferritin (440 kDa, 20 μg), Glutamat-Dehydrogenase (336 kDa, 100 μg), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa, 500 μg), BSA (67 kDa, 200 μg), Cytochrom C (12,3 kDa, 20 μg).

Laufpuffer: Tris/HCl; pH 7,8, 500 mM NaCl

2.2.3.7 Größenausschluß-Chromatographie

Für eine Größenausschluß-Chromatographie wurden etwa 50 g Sephadex G-200 (Amersham Pharmacia) in 1 l Laufpuffer suspendiert und über Nacht bei RT gequollen. Der Überstand wurde abgesaugt, das Säulenmaterial wurde zweimal mit Laufpuffer gewaschen und anschließend entgast.

Mit dem gequollenen Säulenmaterial (etwa 500 ml) wurde eine Säule (170 x 1,5 cm) gegossen. Die Säule wurde mit folgenden Proteinen (Sigma) geeicht: Thyroglobulin (669 kDa, 1 mg), Ferritin (440 kDa, 200 µg), Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa, 2 mg), Cytochrom C (12,3 kDa, 200 µg). Auf die geeichte Säule wurden maximal 10 ml (150-200 mg) Proteinextrakt aufgetragen. Das Eluat wurde fraktioniert, die Fraktionen wurden mit einem Aktivitätsassay oder mit einer Proteinbestimmung (2.2.4.6) überprüft.

Laufpuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8

2.2.3.8 Native Gelelektrophorese

Für die native Gelelektrophorese wurden 18 x 14 cm große Glasplatten und 0,3 cm starke Kämme verwendet. Die Gelapparatur wurde mit 1,5 %iger Agarose abgedichtet. Es wurden 6 %ige Trenn- und 4%ige Sammelgele gegossen. Pro Spur wurden 0,1-1 mg Protein aufgetragen. Die Proben wurden vorher 1:3 mit Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C im Laufpuffer 6-8 Stunden lang bei 15 mA.

Zur Färbung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie Blue (2.2.4.4) gefärbt. Für einen Nachweis der enzymatischen Aktivität wurde der Aktivitätsassay (2.2.5.3) verwendet.

Gelstammlösung:	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (Roth)
Gel- und Laufpuffer:	10 mM Tricin/Tris; pH 9
Probenpuffer:	0,025 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin, 50 % Gelpuffer

2.2.3.9 Immobilisierung von Proteinen auf Cyanogenbromid aktivierter Agarose und Reinigung von polyklonalen Antikörpern aus Serum

Zur Reinigung von Antikörpern aus Seren wurde gereinigtes Antigen auf einer Cyanogenbromid aktivierten Agarose (Sigma) immobilisiert. Hierfür wurden 200 mg des Säulenmaterials in Quellpuffer suspendiert. Diese Suspension wurde für 10 min bei 4 °C rotiert, für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das gequollene Säulenmaterial wurde noch zweimal mit fünf Volumina Quellpuffer gewaschen.

Auf das so gewaschene Säulenmaterial (etwa 1 ml) wurden 5-10 mg des gereinigten in einem beliebigen Puffer (pH 8,0-9,5) ohne freie Aminogruppen gelösten Antigens gegeben. Die Suspension wurde 2 h bei 4 °C unter ständigem Rotieren inkubiert und anschließend für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Säulenmaterial wurde noch zweimal mit Waschpuffer gewaschen.

Zur Absättigung freier Bromcyangruppen wurde das Säulenmaterial für 1 h bei RT mit dem fünffachen Volumen Waschpuffer unter ständigem Rotieren inkubiert. Das Säulenmaterial wurde noch einmal mit Waschpuffer gewaschen und konnte dann für eine Antikörperreinigung verwendet werden.

Zur Reinigung von Antikörpern aus Seren wurde das so präparierte Säulenmaterial zweimal mit dem fünffachen Volumen TBST gewaschen. Gewaschenes Säulenmaterial (1 ml) wurde mit 15-20 ml Antiserum für 2 h bei 4 °C unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Suspension wurde anschließend für 5 min bei 3000 x g zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Das Säulenmaterial wurde dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und dann in ein 1 ml-Spin-Säulchen (Bio-Rad) überführt. Zur Elution des Antikörpers wurden schrittweise 3-4 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Der pH-Wert des Eluats wurde mit pH-Papier überprüft. Sobald das Eluat einen sauren pH-Wert aufwies, wurden zwei 1 ml-Fractionen gesammelt. Diese Fractionen wurden mit 50-100 µl 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8 neutralisiert und mit 10 % Glycerin versetzt. Die Lösungen wurden in einer Verdünnung von 1:2000-1:500 für einen Western-Blot oder eine Immunfluoreszenz verwendet und wurden bei -20 °C gelagert.

Quellpuffer: 100 mM NaHCO₃; pH 8,0, 500 mM NaCl
Waschpuffer: 100 mM Tris/HCl; pH 8,0, 500 mM NaCl
TBST: 10 mM Tris/HCl; pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20
Elutionspuffer: 200 mM Glycin/HCl; pH 2,8, 300 mM NaCl

2.2.3.10 Immunpräzipitation

Zur spezifischen Fällung von Proteinen wurden 0,1-1 mg einer Proteinsuspension mit etwa 2 µg eines entsprechenden gereinigten Antikörpers (aus Kaninchen oder Maus) versetzt. Diese Lösung wurde für 1 h bei 4 °C routiert. Protein-A-Agarose (10 mg, Sigma) wurde in etwa 1 ml TBST für 10 min bei 4 °C geschüttelt. Die Suspension wurde 1 min bei 14000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Agarose wurde noch zweimal mit TBST gewaschen und anschließend zu der Protein-Antikörper-Lösung gegeben. Diese Suspension wurde erneut 1-2 h bei 4 °C routiert. Die Suspension wurde dann 5 min bei 4 °C und 14000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und das Protein-A-Agarose-Pellet wurde dreimal mit TBST gewaschen. Das Pellet wurde in 30 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und konnte dann einer SDS-PAGE (2.2.4.1) unterzogen werden.

TBST: 10 mM Tris/HCl; pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20

2.2.4 Protein- und Peptidanalyse

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde eine Minigelapparatur (10 x 7 x 0,1 cm, Amersham Pharmacia) verwendet. Es wurden 8-15 %ige Trenngele mit jeweils 5 %igen Sammelgelen gegossen. Pro Spur wurden 1-100 µg Protein aufgetragen. Die Proben wurden zuvor 1:3 mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte im Laufpuffer etwa 1 h lang bei 25 mA. Zur Färbung der Proteine wurden die Gele mit Coomassie Blue (2.2.4.4) gefärbt. Zur Molekulargewichtsbestimmung der Proteine wurde ein *Low molecular weight marker* (Sigma) verwendet.

Gelstammlösung:	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (Roth)
Sammelpuffer:	1 M Tris/HCl; pH 6,8
Trennpuffer:	1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
SDS-Probenpuffer:	62,5 mM Tris/HCl; pH 6,8, 3 % SDS, 40 % Glycerin, 0,025 mg/ml Bromphenolblau, 10 mM β -Mercaptoethanol
Laufpuffer:	0,3 % Tris, 1,44 % Glycin, 0,1 % SDS

2.2.4.2 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Für die Sequenzierung von Proteinen durch Edman-Abbau wurden die Proteine einer SDS-Gelelektrophorese (2.2.4.1) unterzogen und nachfolgend auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Hierfür wurden vier Filterpapierstücke und eine PVDF-Membran auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Das Gel und das Filterpapier wurden in Transferpuffer gebadet, die Membran in Methanol geschwenkt. Auf die Anodenseite der Blotapparatur wurden zwei Filterpapierstücke, das Gel, die Membran und wieder zwei Filterpapierstücke luftblasenfrei aufeinander gelegt. Die Apparatur wurde mit der Kathodenseite verschlossen. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 50 mA. Der Blot wurde mit Coomassie Blue (2.2.4.4) gefärbt.

Transferpuffer: 0,3 % Tris, 1,44 % Glycin, 20 % Methanol

2.2.4.3 Western Blot und Nachweis von immobilisierten Proteinen durch spezifische Antikörper

Zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine nach einer SDS-Gelelektrophorese (2.2.4.1) auf Nitrocellulose-Membran (Macherey & Nagel) transferiert (wie unter 2.2.4.2, die Nitrocellulose-Membran wurde statt in Methanol in Transferpuffer geschwenkt). Der Transfer erfolgte 2 h bei 150 mA. Die Proteine wurden mit Ponceau S gefärbt (2.2.4.5). Die Banden des Proteinmarkers wurden mit Kugelschreiber markiert.

Die Blotmembran wurde 90 min mit Magermilchlösung blockiert. Die Blockierungslösung wurde abgossen und der Blot wurde 90 min lang mit dem ersten Antikörper in einer entsprechenden Verdünnung (1:100-1:2000) in Magermilchlösung inkubiert. Die Lösung wurde abgossen und die Membran wurde 3 x 15 min mit TBS gewaschen. Der Blot wurde 90 min mit dem sekundären Antikörper 1:1000 in Magermilchlösung inkubiert. Die Lösung wurde abgossen und der Blot wurde 3 x 15 min mit TBS gewaschen. Der Blot wurde mit alkalische Phosphatase-Puffer versetzt, zu 5 ml Puffer wurden 33 μ l NBT- und 66 μ l BCIP-Lösung gegeben. Es wurde 1-10 min lang im Dunkeln gefärbt. Die Färbelösung wurde dann abgossen und der Blot wurde mit Wasser gewaschen.

TBS:	10 mM Tris/HCl; pH 7,5, 150 mM NaCl
Magermilchlösung:	5 % fettfreies Magermilchpulver in TBS
sekundäre Antikörper:	Anti-Kaninchen/Anti-Chicken IgG (Sigma)/ Anti-Maus IgG (Santa Cruz) jeweils alkalische Phosphatase Konjugate
alkalische Phosphatase-Puffer:	100 mM Tris/HCl; pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$
NBT-Lösung:	50 mg/ml Nitrobluetetrazoliumchlorid in 70 % DMF
BCIP-Lösung:	50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-phosphat-p-Toluidinsalz in DMF

2.2.4.4 *Blot-overlay*

Für einen *Blot-overlay* wurden 0,5 µg des Proteins mit einer Pipettenspitze auf Nitrozellulosemembran getüpfelt. Die Membran wurde für 30 min mit 0,5 % BSA (Sigma) in TBST blockiert und nachfolgend noch drei Mal mit TBST gewaschen. Für eine Interaktions-Analyse wurde die Membran mit dem in TBST gelösten Molekül für 30 min inkubiert. Die Membran wurde dann mit TBST mit bis zu 1 M NaCl gewaschen, getrocknet und autoradiographiert. Hierfür wurde ein Biomax MR-1-Film (Kodak) und der Exposure Casette-Intensifying Screen (Kodak) verwendet. Es wurde etwa 8 h bei -80 °C inkubiert. Die Filme wurden in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

TBST: 10 mM Tris/HCl; pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20

2.2.4.5 *Herstellung von Poly-ADP-Ribose*

Zur Herstellung von Poly-ADP-Ribose-Ketten wurden 15 µg PARP mit 10 µg Heringsperma-DNA (Sigma), 7 mM Mg²⁺, 10 µM NAD⁺ und 5 µCi ³²P-NAD⁺ für 30 min bei 30 °C inkubiert. Nachfolgend wurde dem Ansatz 2 µg DNase (Roche) zugegeben. Zu Reinigung der Poly-ADP-Ribose wurde der Ansatz auf ein 1 ml-G50-Gelfiltrationssäulchen (Amersham Pharmacia), das zuvor mit gesättigter BSA-Lösung gewaschen wurde, gegeben, es wurde mit TBST eluiert.

2.2.4.6 *Coomassie Blue-Färbung*

Zur Färbung der Proteine wurden Polyacrylamidgele für 20 min und PVDF-Membranen für 2-3 min in Coomassie Blue-Färbelösung geschwenkt. Die Lösung wurde dann abgegossen und das Gel oder die PVDF-Membran wurde zwei bis dreimal jeweils für 10 min in Entfärbelösung geschwenkt.

Coomassie Blue-Färbelösung: 0,16 % Coomassie Brilliant Blue G 250, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure
Entfärbelösung: 40 % Methanol, 10 % Essigsäure

2.2.4.7 *Ponceau S-Färbung*

Zur Färbung der Proteine wurden Nitrozellulose-Membranen für 5 min in 1 x Ponceau S-Färbelösung geschwenkt. Die Lösung wurde dann abgegossen und die Membran wurde 2-3 Mal jeweils für 5 min in Wasser geschwenkt.

100 x Poinceau S-Lösung: 2 % Ponceau S, 30 % Trichloressigsäure, 30 % Sulfosalicylsäure in Wasser

2.2.4.8 *Proteinbestimmung*

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der Bio-Rad Protein Assay verwendet. Die Eichlösungen (0,1-1 mg/ml) wurden mit BSA (Roth) angesetzt. Der Test erfolgte den Angaben des Herstellers entsprechend.

2.2.4.9 Auftrennung von Peptidgemischen durch reverse-phase-Chromatographie

Zur Auftrennung von Peptiden wurde eine *reverse-phase*-Chromatographie durchgeführt. Hierfür wurden etwa 10-100 µg eines Peptidgemischs 1:10 mit Puffer A verdünnt und dann auf eine 250 x 4 mm Polyethyleniminsäule (Nucleosil 100-3 C 18, Macherey & Nagel) aufgetragen, die an eine HPLC-Anlage (Äkta purifier, Amersham-Pharmacia) angeschlossen war. Die Elution erfolgte für 5 min isokratisch mit 2,5 % Puffer B, für 5 min im Gradient von 2,5 bis 25 % Puffer B, für 12,5 min im Gradienten von 25 bis 45 % Puffer B und 10 min im Gradienten von 45 bis 95 % Puffer B bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min.

Puffer A: 0,1 % TFA; 3 % Acetonitril

Puffer B: 0,1 % TFA; 95 % Acetonitril

2.2.4.10 Massenspektrometrische Analyse von Peptiden

Zur massenspektrometrischen Analyse von Peptiden wurde α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure als Matrix verwendet.

Es wurde ein Bruker Reflex MALDI Massenspektrometer verwendet.

2.2.5 Nachweis von Enzymen

2.2.5.1 Gekoppelter optischer Test zum Nachweis der NAD⁺-Kinase

Zum photometrischen Nachweis der NAD⁺-Kinase wurden in eine Halbmikroküvette (Roth) die folgenden Lösungen pipettiert:

50 µl	100 mM NAD ⁺	5 mM Endkonzentration
100 µl	100 mM ATP	10 mM Endkonzentration
10 µl	100 mM Glucose-6-Phosphat	1 mM Endkonzentration
10 µl	1 M MgCl ₂	10 mM Endkonzentration

Es wurden 10-100 µl Proteinlösung dazugegeben und mit Meßpuffer auf 1 ml aufgefüllt. Die Küvette wurde ins Photometer gestellt und bei 340 nm 2-5 min gemessen (Vorlauf). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 10 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Roche) gestartet und die Bildung von NADP⁺ wurde bei 340 nm verfolgt. Die Steigung im linearen Bereich wurde für eine Quantifizierung der Aktivität herangezogen, eine eventuelle Steigung im Vorlauf wurde zuvor abgezogen.

Meßpuffer: 50 mM Tris/HCl; pH 7,8, 150 mM NaCl, 150 mM KCl

2.2.5.2 Gekoppelter optischer Test zum Nachweis der NMNAT

Zum photometrischen Nachweis der NMNAT wurden in eine Halbmikroküvette (Roth) die folgenden Lösungen pipettiert:

33 μ l	30 mM NMN	(1 mM Endkonzentration)
100 μ l	30 mM ATP	(3 mM Endkonzentration)
10 μ l	1 M $MgCl_2$	(10 mM Endkonzentration)
5 μ l	Ethanol	(0,5 % Endkonzentration)

Es wurden 10-20 μ l Proteinlösung dazugegeben und mit Meßpuffer auf 1 ml aufgefüllt. Die Küvette wurde ins Photometer gestellt und bei 340 nm 2-5 min gemessen (Vorlauf). Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 10 U Alkohol-Dehydrogenase (Sigma) gestartet und weiter bei 340 nm gemessen. Die Steigung im linearen Bereich wurde für eine Quantifizierung der Aktivität herangezogen, eine eventuelle Steigung im Vorlauf wurde zuvor abgezogen.

Meßpuffer: 50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ; pH 8,0, 300 mM NaCl

2.2.5.3 Aktivitätsnachweis der NAD^+ -Kinase im nativen Gel

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der NAD^+ -Kinase im nativen Gel wurde das Gel nach der Elektrophorese für 10 min in Renaturierungslösung geschwenkt, dann wurden dieser Lösung nacheinander die Substrate der NAD^+ -Kinase- und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktion und MTT zugesetzt. Als letztes wurde frisch angesetztes PMS (lichtempfindlich) zu der Lösung gegeben. Es wurde im Dunkeln für 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Das Gel wurde anschließend mit Wasser gewaschen.

Renaturierungslösung: 100 mM Tris/HCl; pH 7,8, 150 mM NaCl
 MTT (Endkonzentration): 0,5 mg/ml
 PMS (Endkonzentration): 0,05 mg/ml
 Substrate (Endkonzentrationen): 10 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM NAD^+ ,
 1 mM Glucose-6-Phosphat,
 100 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Roche)

2.2.5.4 Aktivitätsnachweis durch Nukleotidtrennung mittels Anionenaustauscher-Chromatographie

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivitäten der NAD^+ -Kinase und der NMNAT wurden die Enzyme mit den entsprechenden Substraten für 1-12 h bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden dann 1:10 mit Puffer A versetzt und sofort auf eine 125 x 4 mm Polyethyleniminsäule (Nucleosil 4000-7 PEI, Macherey & Nagel) aufgetragen, die an eine HPLC-Anlage (Äkta purifier, Amersham-Pharmacia) angeschlossen war. Die Elution erfolgte für 4 min isokratisch in Puffer A und nachfolgend für 15 min im Gradient von 0 bis 70 % Puffer B bei einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min.

Die Elutionszeiten der Nukleotide wurden durch Standards mit 10 μ mol des jeweiligen Nukleotids ermittelt und dienen zu deren Nachweis.

Puffer A: 25 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 /Essigsäure; pH 4,5
 Puffer B: 25 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 ; pH 7,4, 2 M NaCl

2.2.6 Reinigung der NAD⁺-Kinase

2.2.6.1 Reinigung der endogenen NAD⁺-Kinase aus Rinderleber

Zur Reinigung der NAD⁺-Kinase aus Rinderleber wurden etwa 200 g Lebergewebe aufgearbeitet, bzw. etwa 1 l einer bei -80 °C gelagerten cytosolischen Fraktion (2.2.2.1) wurde bei 4 °C aufgetaut und verarbeitet. Während der Reinigung wurde die Aktivität der NAD⁺-Kinase mit Hilfe des photometrischen Tests (2.2.5.1) detektiert und quantifiziert.

Die cytosolische Fraktion wurde einer Hitzedenaturierung unterzogen (2.2.3.1). Der Überstand wurde mit 70 %iger Ammoniumsulfatsättigung gefällt (2.2.3.2). Das Pellet wurde in 55 % gesättigter Ammoniumsulfatlösung resuspendiert, abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde resuspendiert und gegen Dialysepuffer in einer Membran mit einer Ausschlußgröße von 10-14 kDa (Schleicher & Schuell) dialysiert.

Die dialysierte Fraktion wurde auf eine DEAE-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen (2.2.3.3). Das Eluat wurde in einem Fraktionssammler in etwa 5 ml großen Fraktionen aufgefangen. Die NAD⁺-Kinase eluierte bei 250-300 mM NaCl von der Säule, aktive Fraktionen wurden vereinigt.

Die Fraktion der DEAE-Chromatographie wurde auf eine Hydroxylapatit-Säule (FPLC) aufgetragen (2.2.3.6). Das Eluat wurde in etwa 2 ml großen Fraktionen gesammelt. Die NAD⁺-Kinase eluierte bei 150-200 mM Phosphat, aktive Fraktionen wurden vereinigt. Das Eluat wurde dialysiert.

Die dialysierte Fraktion wurde einer High Q-Anionenaustauscher-Chromatographie (FPLC) (2.2.3.6) unterzogen. Das Eluat wurde in etwa 2 ml großen Fraktionen gesammelt. Die NAD⁺-Kinase eluierte bei 250-300 mM NaCl, aktive Fraktionen wurden vereinigt. Das Eluat wurde dialysiert.

Die dialysierte Fraktion wurde einer Cibacron-Blue-Chromatographie (2.2.3.4) unterzogen, das Eluat wurde in etwa 1 ml großen Fraktionen gesammelt, aktive Fraktionen wurden vereinigt.

Dialysepuffer: 20 mM Tris/HCl; pH 7,8

Zur Reinigung der NAD⁺-Kinase mittels nativer Gelelektrophorese bzw. zur Molekulargewichtsbestimmung mittels Größenausschluß-Chromatographie wurden die vereinigten Fraktionen der DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie (s.o.) nicht dialysiert sondern zur Konzentrierung erneut mit 70 % Ammoniumsulfatsättigung gefällt. Das Pellet wurde in minimalem Volumen resuspendiert und direkt auf eine zuvor geeichte Sephadex G-200-Gelfiltrationssäule aufgetragen (2.2.3.7). Das Eluat der Gelfiltration wurde in etwa 5 ml großen Fraktionen gesammelt.

Zur weiteren Reinigung durch native Gelelektrophorese (2.2.3.8) wurden die Fraktionen der Gelfiltration direkt oder nach Konzentrierung auf einem Centricon (Schleicher & Schuell, 0,5 ml, Ausschlußgröße 10000 g/mol) mit Probenpuffer versetzt und auf ein natives Gel aufgetragen. Die Färbung des Gels erfolgte einerseits mit Coomassie Blue (2.2.4.4) und andererseits mittels Aktivitätsassay (2.2.5.3). Zur Analyse der mit Aktivitätsassay gefärbten NAD⁺-Kinase im SDS-PAG wurde die so gefärbte Gelbande ausgeschnitten, in kleine Stücke zerschnitten, mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C inkubiert.

Es wurde ein 14 x 18 cm großes 12 %iges SDS-PAG (2.2.4.1) mit einem 0,3 cm dicken Kamm gegossen. Die Gelstücke mit SDS-Probenpuffer wurden auf ein solches Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 3-4 h bei 40 mA, das Gel wurde mit Coomassie Blue gefärbt.

2.2.6.2 Reinigung der humanen rekombinanten NAD⁺-Kinase

Zur Überexpression (2.2.1) der humanen NAD⁺-Kinase in Bakterienzellen wurden die gereinigten pQE-30 Vektorkonstrukte mit NAD⁺-Kinase-cDNA (2.1.8.2) in *E. coli* M15 transformiert (2.1.6.3). Zur Anzucht der Bakterien wurden 3 l Kulturmedium (2.1.6.1) mit Ampicillin und Kanamycin verwendet. Die Zellen wurden mit 2 mM IPTG induziert und nach einer Expressionszeit von 6 h im Brutschrank bei 37 °C abzentrifugiert. Während der Reinigung wurde die Aktivität der NAD⁺-Kinase mit Hilfe des photometrischen Tests (2.2.5.1) detektiert und quantifiziert.

Die Bakterienzellen wurden in 20 mM Tris/HCl; pH 7,8 aufgeschlossen (2.2.2.2). Der Überstand wurde einer Hitzedenaturierung (2.2.3.1) unterzogen. Der Überstand wurde auf eine DEAE-Anionenaustauscher-Säule (2.2.3.3) aufgetragen. Das Eluat wurde in einem Fraktionssammler in etwa 5 ml großen Fraktionen aufgefangen. Die NAD⁺-Kinase eluierte bei 250-300 mM NaCl von der Säule, aktive Fraktionen wurden vereinigt.

Die Fraktion wurde einer Nickel-NTA-Chromatographie (2.2.3.5) unterzogen. Die Nickel-NTA-Chromatographie wurde mit einem Waschpuffer ohne Imidazol und einem Elutionspuffer mit 50 mM Imidazol durchgeführt. Das Eluat wurde in einem Fraktionssammler in etwa 5 ml großen Fraktionen aufgefangen. Die NAD⁺-Kinase eluierte bei 5-10 mM Imidazol von der Säule, aktive Fraktionen wurden vereinigt.

Die Fraktion der Nickel-NTA-Chromatographie wurde auf eine Hydroxylapatit-Säule (FPLC) aufgetragen (2.2.3.6). Das Eluat wurde in etwa 2 ml großen Fraktionen gesammelt. Die NAD⁺-Kinase eluierte bei 150-200 mM Phosphat, aktive Fraktionen wurden vereinigt.

Zur Reinigung der N-terminal um 64 Aminosäuren verkürzten NAD⁺-Kinase wurden *E. coli* JM109 mit dem NK-64-pQE-30 Vektorkonstrukt (2.1.8.2) in 3 l Kulturmedium (2.1.6.1) mit Ampicillin angezogen. Die Zellen wurden mit 2 mM IPTG induziert und nach einer Expressionszeit von 4 h im Brutschrank bei 37 °C abzentrifugiert. Die Bakterienzellen wurden mit 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 8,0, 300 mM NaCl aufgeschlossen. Der Überstand wurde einer Nickel-NTA-Chromatographie unterzogen. Die Nickel-NTA-Chromatographie wurde mit einem Waschpuffer mit 10 mM Imidazol und einem Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol durchgeführt. Die NAD⁺-Kinase eluierte bei 100-150 mM Imidazol von der Säule, aktive Fraktionen wurden vereinigt.

2.2.7 Reinigung der humanen rekombinanten NMNAT

Zur Überexpression (2.2.1) der humanen NMNAT in Bakterienzellen wurden die gereinigten pQE-30 Vektorkonstrukte mit NMNAT-cDNA (2.1.9.3) in *E. coli*-JM109 transformiert. Zur Anzucht der Bakterien wurden 3 l Kulturmedium (2.1.6.1) mit Ampicillin verwendet. Die Zellen wurden mit 1 mM IPTG induziert und nach einer Expressionszeit von 4 h im Brutschrank bei 37 °C abzentrifugiert. Während der Reinigung wurde die Aktivität der NMNAT mit Hilfe des photometrischen Tests (2.2.5.2) detektiert und quantifiziert.

Die Bakterienzellen wurden in 50 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄; pH 8,0, 300 mM NaCl aufgeschlossen (2.2.2.2). Der Überstand wurde einer Nickel-NTA-Chromatographie (2.2.3.5) unterzogen. Die Nickel-NTA-Chromatographie wurde mit einem Waschpuffer mit 10 mM Imidazol und einem Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol durchgeführt. Die NMNAT eluierte bei 100-150 mM Imidazol von der Säule, aktive Fraktionen wurden vereinigt.

2.2.8 *In vitro*-Phosphorylierung der NMNAT

Phosphorylierung mit Kernextrakten:

Für eine Phosphorylierung der rekombinanten NMNAT mit Kernextrakten wurde gereinigte NMNAT (2.2.7) in einem Protein-Verhältnis von 1:2 mit Kernextrakten (2.2.2.4), 100 mM ATP und 1 μCi γ [^{32}P]-ATP (NEN) in 1 x Phosphorylierungspuffer für 5-60 min bei 37 °C inkubiert. Dem Ansatz wurden wahlweise BIM (Bisindolylmaleimid, Calbiochem, 1 μM Endkonzentration) oder PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, Sigma, 1 μM Endkonzentration) und CaCl_2 (2 mM Endkonzentration) zugegeben.

Um die Phosphorylierung der endogenen NMNAT nachzuweisen wurden Kernextrakte präpariert und 30-60 min mit γ [^{32}P]-ATP in Phosphorylierungspuffer inkubiert. Nachfolgend wurde eine Immunpräzipitation (2.2.3.10) durchgeführt.

Phosphorylierung mit Proteinkinasen:

Für die Phosphorylierung mit Proteinkinasen (Casein Kinase II, human, rekombinant, Calbiochem, Protein Kinase C α , human rekombinant/Calbiochem) wurden jeweils 1 μg NMNAT mit 10-20 U (eine Unit war jeweils definiert als pmol übertragenes Phosphat pro Minute) der jeweiligen Proteinkinase, 100 mM ATP und 1 μCi γ [^{32}P]-ATP in 1 x Phosphorylierungspuffer für 5-30 min bei 37 °C inkubiert. Die Phosphorylierung mit PKC wurden in Gegenwart von BIM (1 μM Endkonzentration) oder PMA (1 μM Endkonzentration) und CaCl_2 (2 mM Endkonzentration) durchgeführt.

Quantitative Phosphorylierung:

Zur Ermittlung der Phosphorylierungsstelle der NMNAT wurde eine quantitative Phosphorylierung durchgeführt. Hierfür wurde die NMNAT in einem Proteinverhältnis von 1:10 mit PKC, 250 μM ATP, PMA (1 μM Endkonzentration) und CaCl_2 (2 mM Endkonzentration) in 1 x Phosphorylierungspuffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurde noch einmal die gleiche Menge an PKC zugegeben und es wurde erneut für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Zur Analyse durch eine nachfolgende SDS-PAGE wurden die Phosphorylierungsreaktionen jeweils durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Mit den Proben bzw. dem Präzipitat der Immunpräzipitation wurde eine SDS-PAGE (2.2.4.1) durchgeführt. Zur Dokumentation wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt (2.2.4.4), getrocknet und autoradiographiert. Hierfür wurde ein Biomax MR-1-Film (Kodak) und der Exposure Casette-Intensifying Screen (Kodak) verwendet. Es wurde 2 h-1 Tag bei -80 °C inkubiert. Die Filme wurden in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

5 x Phosphorylierungspuffer: 50 mM HEPES/KOH; pH 7,9, 50 % Glycerin, 100 mM MgCl_2 , 250 mM KCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT

2.2.9 Verdauung der NMNAT

Partielle Verdauung:

Für eine partielle Verdauung der NMNAT wurden die Proteasen AspN, GluC und Trypsin (Roche, *sequencing grade*) den Angaben des Herstellers entsprechend gelöst. NMNAT wurde in einem Proteinverhältnis von 5:1 (AspN), 20:1 (GluC) bzw. 100:1 (Trypsin) mit der jeweiligen Protease versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Verdauung wurde mit der Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt.

Die Ansätze wurden einer SDS-PAGE auf einem 15%igen Gel (2.2.4.1) unterzogen. Zur Dokumentation wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt (2.2.4.4), getrocknet und autoradiographiert. Hierfür wurde ein Biomax MR-1-Film (Kodak) und der Exposure Casette-Intensifying Screen (Kodak) verwendet. Es wurde etwa 8 h bei -80 °C inkubiert. Die Filme wurden in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert.

Vollständige Verdauung:

Zur Peptid-Analyse wurde der Phosphorylierungsansatz 1:10 mit Wasser versetzt und 30 min auf Eis gestellt. Da NMNAT bei Salzkonzentrationen unterhalb von 300 mM präzipitierte, konnte hierbei etwa 90 % der NMNAT aus dem Phosphorylierungsansatz ausgefällt werden. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde noch dreimal mit eiskaltem Wasser gewaschen und anschließend in Verdauungspuffer resuspendiert. Der NMNAT-Lösung wurde Trypsin in einem Proteinverhältnis von 5:1 zugesetzt. Es wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert

Verdauungspuffer: 100 mM NH_4HCO_3 , 10 mM β -Mercaptoethanol

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

2.3.1.1 Zelllinien, Medien, Kulturgefäße

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

Hek-293-Zellen	(Human Embryonic Kidney)
HeLa-S3-Zellen	(Human Cervix Carcinoma)
Wi-38-Zellen	(Human Fetal Lung Fibroblast)
HepG2-Zellen	(Human Hepatoblastoma)

Für die Kultur der Hek-293-, der HeLa-S3- und der Wi-38-Zellen aller wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Glutamax-I, Natriumpyruvat, 4500 mg/l Glucose und Pyridoxin (Gibco) verwendet. Das Medium wurde vor Verwendung mit 10 % fötalem Kälberserum (Biochrom) und 1 % Penicillin-Sreptomycin-Lösung (Gibco, Penicillin: 10000 U/ml, Sreptomycin: 10000 µg/ml) versetzt. Für die Kultur der HepG2-Zellen wurde dem Medium zusätzlich Insulin (500 ng/l Endkonzentration, Gibco) zugesetzt.

Für die Kultivierung der Zellen wurden 6-Well-Platten, 75 cm²-Flaschen und 25 cm²-Flaschen (Costar) verwendet. Für die Kultivierung der HepG2-Zellen wurden die Kulturgefäße zuvor mit Kollagen beschichtet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert.

2.3.1.2 Auftauen von Zellen

Ein 1 ml-Aliquot eines DMSO-Stocks gefrorener Zellen (ca. 1×10^7 Zellen) wurde aufgetaut und in 10 ml 37 °C warmes Medium überführt. Die Suspension wurde sofort für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 5 ml Medium aufgenommen und in eine 25 cm²-Flasche überführt. Die Zellen waren nach 2-7 Tagen konfluent und konnten dann passagiert werden (2.3.1.3).

2.3.1.3 Passagieren von Zellen

Um Zellen auf neue Kulturgefäße umzusetzen, wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen wurden einmal mit 37 °C warmen PBS gewaschen und mit 37 °C warmer Trypsinlösung (HeLa-S3-Zellen, Wi-38-Zellen, HepG2-Zellen) bzw. PBS/0,05 % EDTA (Hek-293-Zellen) versetzt. Die Lösung wurde sofort wieder entfernt, und die Zellen wurden für 2-10 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden dann mit frischem 37 °C warmen Medium von dem Boden des Kulturgefäßes gespült und in einer Verdünnung von 1:2-1:5 auf neue Kulturgefäße umgesetzt.

Sollte eine definierte Menge Zellen umgesetzt werden, wurde das Casy 1-Zellzählgerät (Schärfe System) verwendet.

PBS:	0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,065 % Na ₂ HPO ₄ , 0,02 % KH ₂ PO ₄ ; pH 7,5
Trypsinlösung:	0,05 % Trypsin (Gibco, USP Grade), 0,2 % EDTA in PBS

2.3.1.4 Zellernte

Zur Ernte wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturschale entfernt (2.3.1.3) und für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und konnte dann in einem beliebigen Puffer resuspendiert werden.

PBS: 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,065 % Na₂HPO₄, 0,02 %, KH₂PO₄; pH 7,5

2.3.2 Zelltransfektion

Plasmide, die für eine Transfektion von humanen Zellen verwendet werden sollten, wurden im Maxi-Präparations-Maßstab (2.1.4.4) gereinigt. Zu transfizierende Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät und waren zum Zeitpunkt der Transfektion zu etwa 60-80 % konfluent.

Für eine Transfektion wurden 5 x 10⁵ Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und 24-36 h im Brutschrank inkubiert. Das Plasmid (2-10 µg) wurde mit 25 µl 2,5 M CaCl₂ und 225 µl Wasser versetzt. In ein 5 ml-Polystyrolröhrchen (Greiner 12,0/75 mm) wurden 250 µl 2 x HBS-Puffer vorgelegt. Die Plasmidlösung wurde tropfenweise unter Vortexen zu dem Puffer gegeben. Die Lösung wurde 30 min bei RT inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben.

Die Zellen wurden im Brutschrank 12 h lang inkubiert. Das Medium wurde dann abgenommen, es wurde zwei bis dreimal mit PBS gewaschen, und die Zellen wurden mit frischem Medium weitere 12-48 h inkubiert.

2 x HBS-Puffer: 1,64 % NaCl, 1,19 % HEPES, 0,021 % Na₂HPO₄/NaOH; pH 7,05

PBS: 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,065 % Na₂HPO₄, 0,02 %, KH₂PO₄; pH 7,5

2.3.3 Immunfluoreszenz

Für eine Immunfluoreszenz-Analyse wurden 5 x 10⁵ Zellen pro Well einer 6-Well-Platte auf 0,5 x 0,5 cm Deckgläschen (Roth) ausgesät und 24-36 h im Brutschrank inkubiert. Zum Fixieren wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen, mit eiskaltem Methanol versetzt und 10 min bei -20 °C inkubiert. Das Methanol wurde abgenommen, und die Zellen wurden zwei bis dreimal mit PBS gewaschen. Zum Blockieren wurde 10 % fötales Kälberserum in PBS auf die Zellen gegeben, und es wurde 10 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und der 1. Antikörper wurde in 10 % fötalem Kälberserum in PBS (in einer Verdünnung von 1:1000-1:200) für 30 min bei RT auf die Zellen gegeben. Es wurde dreimal mit PBS gewaschen, dann wurde der zweite Antikörper (Molecular Probes) in 10 % fötalem Kälberserum in PBS (in einer Verdünnung von 1:500-1:100) auf die Zellen gegeben, und es wurde 25 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Zu dieser Lösung wurde DAPI (100 nM Endkonzentration, Molecular Probes) gegeben, und es wurde weitere 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen.

Um die Zellen unter dem Mikroskop zu untersuchen, wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt. Zum Eindeckeln wurde zunächst ein Tropfen ProTaq Mount Fluor (Quartett) auf einen Objektträger gegeben, die Deckgläschen wurden aus dem Well genommen und mit der Seite, auf der die Zellen fixiert waren, luftblasenfrei auf die Flüssigkeit gelegt. Es wurde 20 min im Dunkeln getrocknet. Danach konnten die Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet und photographiert werden.

PBS: 0,8 % NaCl, 0,02 % KCl, 0,065 % Na₂HPO₄, 0,02 % KH₂PO₄; pH 7,5

2.3.4 *In vivo*-Phosphorylierung der NMNAT

Wi-38-Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro Well eines 6-Wells ausgesät (2.3.1.3). Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und waren bis zum nächsten Tag zu etwa 80 % konfluent gewachsen. Das Medium wurde von den Zellen entfernt und es wurde 3 x mit phosphatfreiem Medium (Sigma) gewaschen.

1 mCi [³²P]-Orthophosphat (NEN) wurde in 5 ml phosphatfreiem Medium gelöst. Jeweils 1 ml des Mediums (200 µCi) wurde pro Well zu den Zellen gegeben und es wurde 8 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend lysiert.

Um eine Stimulation der PKC zu bewirken wurde 10 min vor Zellyse PMA (Sigma, 1 µM Endkonzentration) zu den Zellen gegeben. Um eine Hemmung der PKC zu bewirken wurde 1 h vor Zellyse BIM (Calbiochem, 1 µM Endkonzentration) zu den Zellen gegeben.

Zur Zellyse wurden die Zellen mit 200 µl Lysepuffer pro Well versetzt und 30 Mal durch eine Kanüle gezogen. Die Suspension wurde für 10 min bei 14000 x g und 4 °C abzentrifugiert, von den Überständen wurde eine Proteinbestimmung (2.2.4.6) gemacht. 500 µg Protein wurden für eine Immunpräzipitation (2.2.3.10) eingesetzt. Die Pellets der Immunpräzipitation wurden einer SDS-PAGE (2.2.4.1) unterzogen. Zur Dokumentation wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt (2.2.4.4), getrocknet und autoradiographiert. Hierfür wurde ein Biomax MR-1-Film (Kodak) und der Exposure Casette-Intensifying Screen (Kodak) verwendet. Es wurde für 10 Tage bei -80 °C inkubiert. Die Filme wurden in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert.