
3 Material und Methoden

3.1 *Material*

3.1.1 Chemikalien / Enzyme / „Kits“

Becton Dickinson, Heidelberg: Kulturschalen und Flaschen, oberflächenbehandelt, gammasterilisiert

BioTeZ, Berlin-Buch: Oligonukleotide

BioWhittaker, Walkersville, USA: Kulturmedien

Biochrom, Berlin: Kulturmedien und Seren

Boehringer, Mannheim: Ampicillin, RNaseA, High Pure PCR Product Purification Kit, Complete Mini Protease Inhibitor

Qiagen, Hilden: Qiagen Plasmid Mini Kit, Qiagen Plasmid Maxi Kit

Eurogentec, Seraing, Belgien: Molekulargewichts-Standards (100bp-Marker, 200bp-Marker)

Genomed, Bad Oeynhausen: JetSorb Gel Extraction Kit

Gibco/BRL, Berlin: 2-YT Boullion, Select Agar, Kulturmedien

Greiner, Frickenhausen: Kunststoffflaschen, Kulturschalen

Invitak, Berlin: InviTaq Polymerase, KCl-Puffer, dNTP-Mix

Invitrogen, Leek, Holland: Plasmide (pCDNA 3.1myc)

ICN, Irvine, USA: Trans-³⁵S-label (³⁵S-Methionin), ³⁵S dATP

NEN DuPont, Boston, USA: n-9,10-³H-Palmitinsäure

New England Biolabs (NEB), Schwalbach/Taunus: Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP); Endoglykosidase H (EndoH); Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF); Restriktionsenzyme; T4 DNA-Ligase; DNA Polymerase I Klenow Fragment; T4 DNA Ligase

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden: T7 Sequencing™ Kit

Sigma-Aldrich, Deisenhofen: Kollagen, poly-L-Lysin

Stratagene, Heidelberg: Chameleon™ Double-Stranded, Site-Directed Mutagenesis Kit; Epicurian Coli XL1-Blue Competent Cells

Weitere nicht näher spezifizierte Feinchemikalien stammen von der Firma Roth, Karlsruhe. Die Bestandteile verwendeter Lösungen und ihre Zusammensetzungen sind im Methodenteil aufgeführt. Bei kommerziell erhältlichen Kits wird auf die beiliegenden Firmenschriften verwiesen.

3.1.2 Zelllinien / Gene / Antiseren

3.1.2.1 Zelllinien

- CV-1 Nierenzelllinie aus der afrikanischen Grünen Meerkatze
- BON humane Pankreas-Tumorzelllinie
(zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Ahnert-Hilger, Institut für Anatomie, Charité, Berlin)
- PC12 neuroendokrine Pheochromocytoma-Zelllinie der Ratte
(zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Paul Foley, Institut für Virologie, Universität Leipzig)

3.1.2.2 Bakterienstämme

- Escherichia coli Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg)
- Escherichia coli Stamm TOP10 (Invitrogen, Groningen, Holland)

3.1.2.2 Gene

- Syt Gen der Synaptotagmin-Isoform I der Ratte

3.1.2.3 Antiseren

- M49 monoklonales Synaptotagmin-Antiserum
- 9E10 myc-Antiserum
- anti-Maus IgG TRITC-konjugiert (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)

3.1.3 Geräte / Dokumentation

Agarose-Gelelektrophorese:	Agagel Mini, Biometra
SDS-Gelelektrophorese:	Minigel/Maxigel, Biometra
DNA-Sequenzierung:	LifeTechnologies/Biometra
Fluoreszenzmikroskop:	Axiskop, Zeiss
Konfokales Laserscanning-Mikroskop:	Leica TCS SP2 System mit Leica DM IRBE
Zentrifugen:	Tischzentrifuge Bachhofer Tischzentrifuge 541712 Eppendorf Laborzentrifuge 3 K 12 Sigma Laborzentrifuge Avanti J-25 Beckman Coulter Ultrazentrifuge L 7-65 Beckman Rotor Ti 45, SW 28 Vakuumzentrifuge Univapo 150H, UniEquip
UV-Spektrophotometer:	Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech
Dokumentation:	Video-Kamera: Kappa CF 8/1 RCC Objektiv: Cosimcar/Pentax TV Lens 16mm 1:1.4 Software: ImageP2 Version 8.2 Das System wurde komplett von der Firma H&K Meßsysteme, Berlin, bezogen. Scanner Epson GT-7000 Densitometrie-Software Biometra ScanPack V. 3.0 Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop V. 4.0

3.1.4 Lösungen / Medien

TE-Puffer (pH8)	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
-----------------	-------------------------------------

PBS-Puffer	10 mM Na-Phosphat, pH 7,5 130 mM NaCl
LB-Medium	2 % Trypton (enzymatisch hydrolysiert) 1 % Hefeextrakt 1 % NaCl
SOC-Medium	2 % Trypton (enzymatisch hydrolysiert) 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 10 mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O 20 mM Glukose

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

CV-1-Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit einem Zusatz von 5% FCS (fetal calf serum), BON-Zellen in DMEM/DMEM-HAM's F12 (1:1) mit einem Zusatz von 10% FCS und 1% Streptomycin/Penicillin (alles von Biochrom, Berlin) vermehrt. Beide wurden bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert.

Die PC12-Zellen einer frühen Passage stellte Dr. Paul Foley von der Universität Leipzig zur Verfügung. Sie wurden in DMEM mit einem Zusatz von 10% FCS, 5% Pferdeserum und 1% Streptomycin/Penicillin bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ vermehrt. Als Kulturgefäße dienten Kunststoffflaschen und -schalen verschiedener Größe (Greiner, Frickenhausen), die zuvor mit Kollagen bzw. poly-D-Lysin beschichtet wurden. Dazu wurde 1 mg Kollagen in 32 ml Ethanol (30%) gelöst, davon je 3 ml auf

eine 100 mm-Kulturschale gegeben und abgedampft. Zur Beschichtung mit poly-D-Lysin wurde 100-millimolare Lösung verwendet. Zur neuronalen Differenzierung wurden die Zellen 5 Tage vor und 2 Tage nach der Transfektion mit 50 ng/ml 2.5S NGF(Maus) behandelt.

Zum Umsetzen der CV-1- und BON-Zellen wurde das Medium abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Trypsinlösung (0.25% mit 2mM EDTA), bis sich die Zellen abzulösen begannen. Die Trypsinlösung wurde abgenommen, die Zellen in frischem Medium suspendiert und in neue Kulturgefäße ausgesät. Die PC12-Zellen wurden ohne Trypsinierung durch einfaches Abspülen mit der Pipette vom Boden der Kulturgefäße abgelöst und wie oben beschrieben umgesetzt.

3.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

3.2.2.1 Umklonierung

3.2.2.1.1 Restriktionsendonuklease-Verdau

Zur Umklonierung wurde das DNA-Fragment (cDNA) mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem jeweils verfügbaren Vektor ausgeschnitten und der gewünschte Zielvektor mit den gleichen Enzymen behandelt. Hierzu wurden ca. 1-3 µg DNA mit ca. 4 Einheiten Restriktionsendonuklease pro µg DNA in einem Endvolumen von 10-20 µl angesetzt. Enzyme und Puffer wurden von der Firma NEB, Schwalbach bezogen. Der Verdau erfolgte für 1-2 Stunden bei der für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur.

3.2.2.1.2 Phosphatase-Behandlung

Zur Verhinderung einer Religierung der Vektoren wurden diese einer Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP; NEB, Schwalbach) unterzogen. Dabei wurden dem Ansatz 10 Einheiten CIP zugegeben und für 45 Minuten bei 37°C (kohäsive DNA-Enden) bzw. 42°C (glatte Enden) inkubiert.

3.2.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Nach Zugabe von 2 µl Stop-Puffer (73 mM Saccharose; 100 mM Tris/HCl pH 7,6; 63 mM EDTA; 1% Bromphenolblau) auf 10 µl Restriktionsansatz folgte die Elektrophorese bei 80-100 Volt in einem 1%igen Gel (bei Fragmentgrößen unter 200 bp Länge in 2%igem Gel) für 45 - 60 min. Zur Herstellung der Agarose-Gele und als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde TAE-Puffer (40 mM Tris pH 8,3; 40 mM Eisessig; 1 mM EDTA) verwendet. Die Detektion der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid (Endkonzentration im TAE-Puffer 0,5 mg/ml), nach Beendigung der Elektrophorese konnten die Banden unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht werden.

3.2.2.1.4 Reinigung der DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung der DNA-Fragmente (Vektoren oder cDNA) aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Gel-Extraktions-Kits (Jet-sorb, Genomed). Die DNA-Banden wurden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und nach Zugabe von Natriumchlorat-Puffer bei 50°C für 15 min geschmolzen. Nach Zugabe der Jet-sorb-Suspension (Silica-Matrix) und mehrmaligem Waschen mit Puffer hoher und niedriger Salzkonzentration wurde die DNA von der flüssigen Agarose getrennt und konnte anschließend durch Zugabe von 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1mM EDTA) bei 50°C von der Silica-Matrix eluiert werden.

3.2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von cDNA-Fragmenten mit Vektoren wurde eine vom Phagen T4 kodierte DNA-Ligase (NEB, Schwalbach) verwendet. Als molekulares Verhältnis zwischen Vektor und cDNA-Fragment wurden Mengenverhältnisse zwischen 1:2 und 1:4 eingesetzt, wobei die Fragmentmengen vorher mit Hilfe eines analytischen Agarosegels ermittelt wurden. Dem Reaktionsansatz wurden 5 Einheiten T4 DNA-Ligase sowie 1 µl Reaktionspuffer (10x, NEB, Schwalbach) zugesetzt. Die Ligation erfolgte bei 14°C für 2 Stunden oder bei 4°C über Nacht (16 Stunden). Der Ansatz wurde daraufhin in kompetente Bakterienzellen transformiert.

3.2.2.1.6 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe der Kalziumchlorid-Methode (modifiziert nach Maniatis et al., 1982). 200 ml logarithmisch wachsende XL1Blue oder JM109-Bakterienzellen (OD 660nm=0,4 bis 0,6 in LB-Medium) wurden 10 min auf Eis gekühlt und aus dem Nährmedium abzentrifugiert. Nach Resuspension in 50 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (60 mM; 10 mM PIPES pH 7; 15% Glycerol) und Inkubation auf Eis für 30 min wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 5 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert. Die so behandelten Zellen wurden in Aliquots von je 100 µl oder 200 µl kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert bzw. bei 4°C aufbewahrt und am nächsten Tag verwendet.

3.2.2.1.7 Transformation von Bakterienzellen

Jeweils 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 bis 2 ng zu transformierende Plasmid-DNA wurden mit 100 oder 200 µl der kompetenten Zellen gemischt, 45 min auf Eis gekühlt und für 45 Sekunden auf 42°C erhitzt. Nach nochmaligem kurzem Abkühlen wurden

800 µl Wachstumsmedium (LB oder SOC) zugegeben und bei 37°C eine Stunde geschüttelt, um den Zellen die Expression des jeweiligen Resistenzgens zu ermöglichen. Anschließend wurden die Bakterien auf Nährplatten, die mit einem Antibiotikum (meistens Ampicillin) versetzt waren, ausplattiert. Nur die Zellen, die mit Plasmid-DNA transformiert waren, können das Resistenzgen exprimieren und auf Antibiotikahaltigem Nährmedium wachsen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht werden genetisch identische Klone als weiße Flecken erkennbar.

3.2.2.1.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

Die Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab (3 ml Bakterienkulturen) erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit, Invitex, Berlin) bzw. nach einer Methode nach Del Sal et al. (1988). Dabei wurden jeweils 1.5 ml Bakterienkultur abzentrifugiert und die Zellen in 200 µl STET-Puffer (8% Saccharose; 0,1% Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl pH 8.0) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 µl Lysozym (50 mg/ml) wurden die Lösungen 45 Sekunden auf 100°C erhitzt und anschließend 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt, der Überstand mit 8 µl CTAB (5%) (Sigma, Deisenhofen) gemischt, der entstandene DNA-CTAB Komplex abzentrifugiert und erneut in 300 µl NaCl-Lösung (1,2 M) aufgenommen. Nach Präzipitation der DNA mit Ethanol (100%) wurde zentrifugiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, im Luftstrom getrocknet und in 20 bis 40 µl TE-Puffer mit RNase A (20 mg/ml) aufgelöst.

Zur Plasmid-Präparation im Maxi-Maßstab (100 - 200 ml Kulturen) wurde ein kommerziell erhältliches Kit (QIAGEN Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden) verwendet, das die DNA mit Hilfe von Ionen-Austauscher-Säulen von Verunreinigungen trennt.

Mutagenese mittels Overlap-Extension-PCR

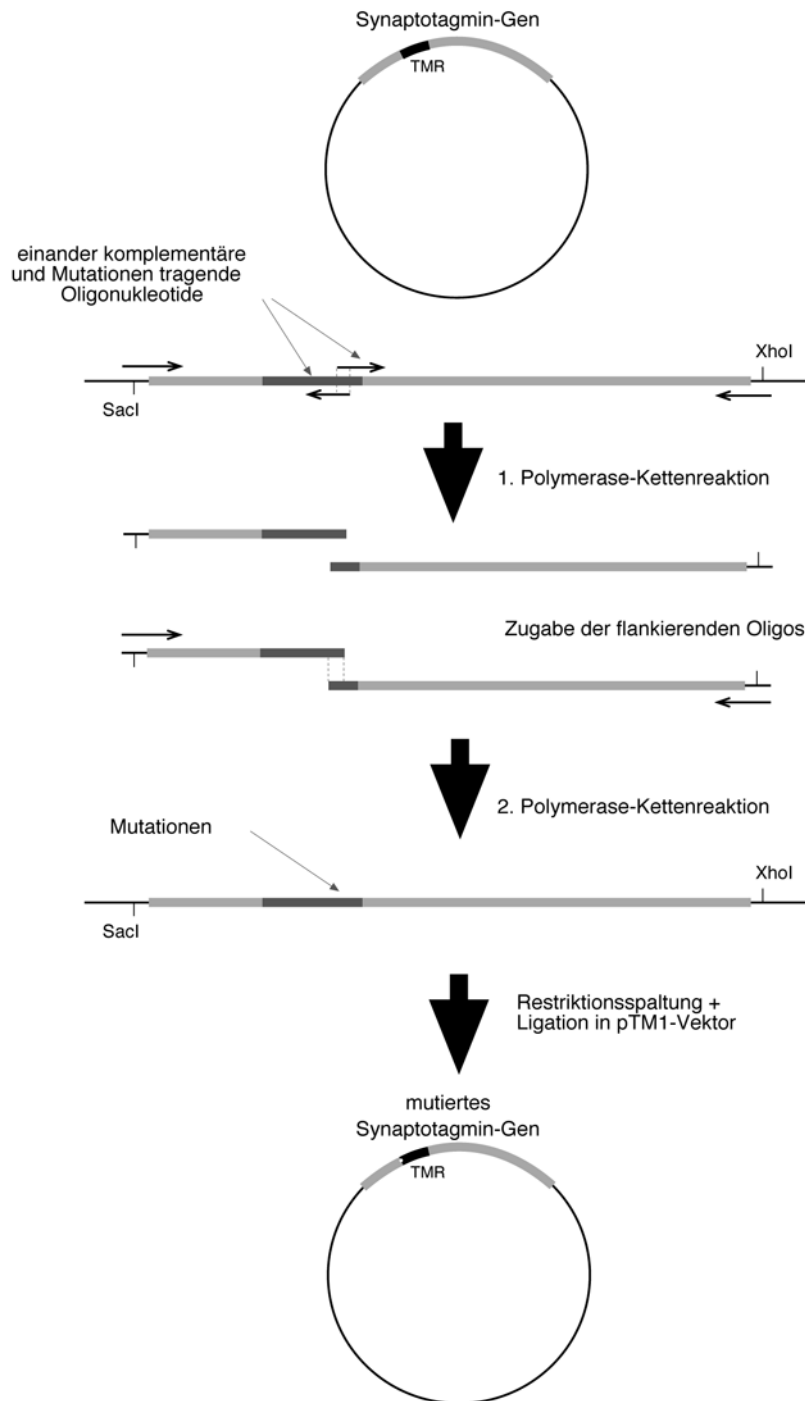


Abbildung 4: Mutagenese mittels Overlap-Extension-PCR

Es wurden vier Oligonukleotide synthetisiert, von denen zwei einander komplementäre Enden aufweisen, in denen sie die entsprechenden Mutationen tragen. Unter Standard-PCR-Bedingungen wurden zuerst zwei Fragmente des Gens amplifiziert, im Agarosegel getrennt und gereinigt. Beide Fragmente wurden dann zusammen einer zweiten PCR unterworfen, wobei die überlappenden Enden als Primer dienten und nur die äußeren Oligonukleotide zugegeben wurden. Das mutierte Gen wurde über zwei Restriktionsschnittstellen in den entsprechenden Vektor kloniert.

3.2.2.1.9 Analytischer Enzymverdau

Zur Überprüfung der erfolgreichen Umklonierung wurde abschließend ein analytischer Restriktionsenzymverdau mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Anzahl der verwendeten Enzyme wurden 6-7 µl der präparierten DNA eingesetzt und mit den entsprechenden Enzymen nach den Vorschriften der Hersteller (NEB, Schwalbach) verdaut.

3.2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese

3.2.2.2.1 Overlap-Extention-PCR

Diese Methode zur Erzeugung von Mutationen beruht auf der Möglichkeit, degenerierte PCR-Primer, d.h. sich geringfügig von der Zielsequenz unterscheidende und Mutationen tragende Oligonukleotide zu verwenden, die trotzdem an der Template-DNA binden und die Reaktion der DNA-Polymerase primen können. Dabei werden an der zu mutierenden Region des Gens auf beiden Seiten des Doppelstranges Oligonukleotide angelagert, die die Mutationen tragen und PCR-Fragmente erzeugen,

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
pTM sense	GGG AAT TCC CCG GGG AGC TCA G
pTM anti	TTA GGC CTC TCG AGC TCG ACC CT
Syt C1 sense	TCC TGC TTT TGT GTC TGT AAG AAA TGT TTG TTC AAG AAA TG
Syt C1 anti	CTT ACA GAC ACA AAA GCA GGA GGT TAC GAC TAA AAG GAC
Syt C1/2 sense	TCC TCC TTT TGT GTC TGT AAG AAA TGT TTG TTC AAG AAA TG
Syt C1/2 anti	CTT ACA GAC ACA AAA GGA GGA GGT TAC GAC TAA AAG GAC
Syt C3/4 sense	TCT GTC TCT AAG AAA TGT TTG TTC AAA AAG AAA AAC AAG AAG AAG GGG
Syt C3/4 anti	CAT TTC TTA GAG ACA GAA AAG CAG CAG GTT ACG AC
Syt C3-5 sense	TCT GTC TCT AAG AAA TCT TTG TTC AAA AAG AAA AAC AAG AAG AAG GGG
Syt C3-5 anti	GAT TTC TTA GAG ACA GAA AAG GAG GAG GTT ACG AC
Syt C5 sense	TGT GTC TGT AAG AAA TCT TTG TTC AAA AAG AAA AAC AAG AAG AAG GGG
Syt C5 anti	GAT TTC TTA CAG ACA CAA AAG CAG CAG GTT ACG AC
Syt C1/2/5 sense	TGT CTG TGT AAG AAA TCT TTG TTC AAA AAG AAA AAC AAG AAG AAG GGG
Syt C1/2/5 anti	GAT TTC TTA CAG ACA CAA AAC CAC CAG GTT ACG AC

Abbildung 5: Sequenzen der als Primer für die ortsgerechte Mutagenese per Overlap-Extension PCR verwendeten Oligonukleotide; für alle Mutanten diente Synaptotagmin-wt in pTM als Vorlage mit Ausnahme der Totalmutante Syt mut, die durch Mutagenese von Syt mut1/2 mittels Oligos Syt C3-5 erhalten wurde.

DNA-Sequenzierung nach Sanger

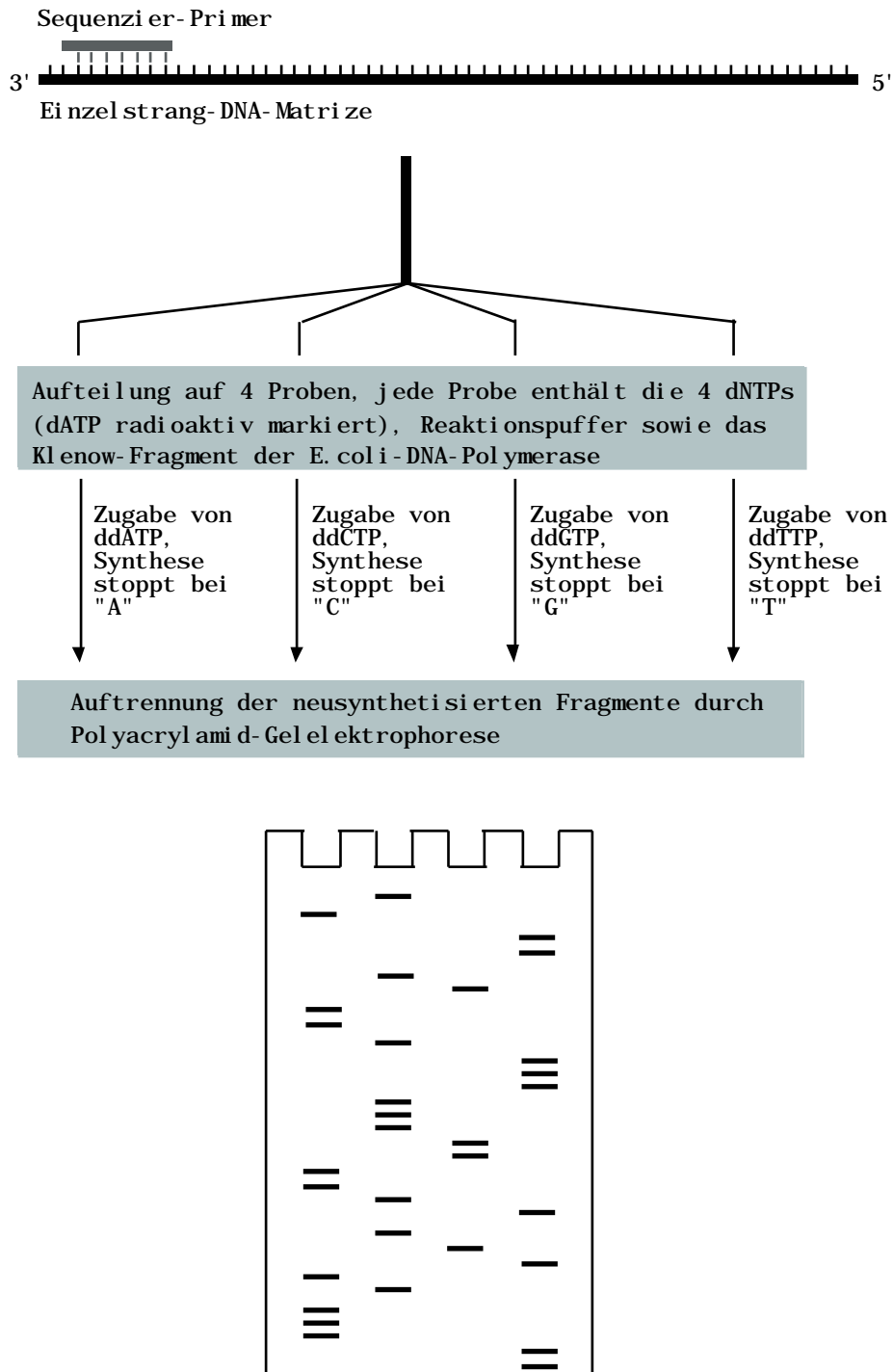


Abbildung 6: Schematische Darstellung der DNA-Sequenzierungsreaktion nach Sanger. Erläuterungen siehe Text

die einander komplementäre Enden tragen und so in einer weiteren PCR als Primer dienen können. Nach der zweiten PCR entsteht wieder das komplette Gen, das allerdings nun die in die Oligos integrierten Mutationen trägt. Einen Überblick über die angewendete Methode bietet Abbildung 4.

3.2.2.2.2 DNA Oligonukleotide

Die für die Overlap-Extension-PCR als Primer benötigten Oligonukleotide wurden von der Firma BioTeZ, Berlin-Buch bezogen. Die Länge der Oligos variierte zwischen 20 und 40 Basenpaaren. Abbildung 5 zeigt die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

3.2.2.3 DNA-Sequenzierung

Der zur Sequenzierung eingesetzte Primer (T7-Promotor-Primer, Promega, Mannheim) bindet an die Promotor-Region der T7-RNA-Polymerase und ist so für eine Vielzahl von Plasmiden verwendbar.

Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf der Sequenzierreaktion nach Sanger et al. (1977). Das Sequenzier-Oligonukleotid wird an die vorher mit NaOH denaturierte Plasmid-DNA gebunden. Dann wird das Oligonukleotid mit einer DNA-Polymerase und unter Zusatz eines Nukleotidgemisches und ^{35}S -dATP verlängert und dabei radioaktiv markiert. Nach Aufteilung der Proben auf 4 Ansätze erfolgt die Kettenabbruchreaktion, wobei jeder Ansatz wiederum ein Nukleotidgemisch und außerdem jeweils einen bestimmten Anteil eines Didesoxy-Nukleotids (ddNTP) enthält. Diese Nukleotid-Analoga werden zwar wie normale Nukleotide in den DNA-Strang eingebaut, allerdings kann die Kette danach nicht mehr weiter verlängert werden, es kommt zum Kettenabbruch. Es entstehen DNA-Fragmente definierter Längen, da jeder Reaktionsansatz jeweils nur ein bestimmtes ddNTP enthält. Die Kettenabbrüche sind je

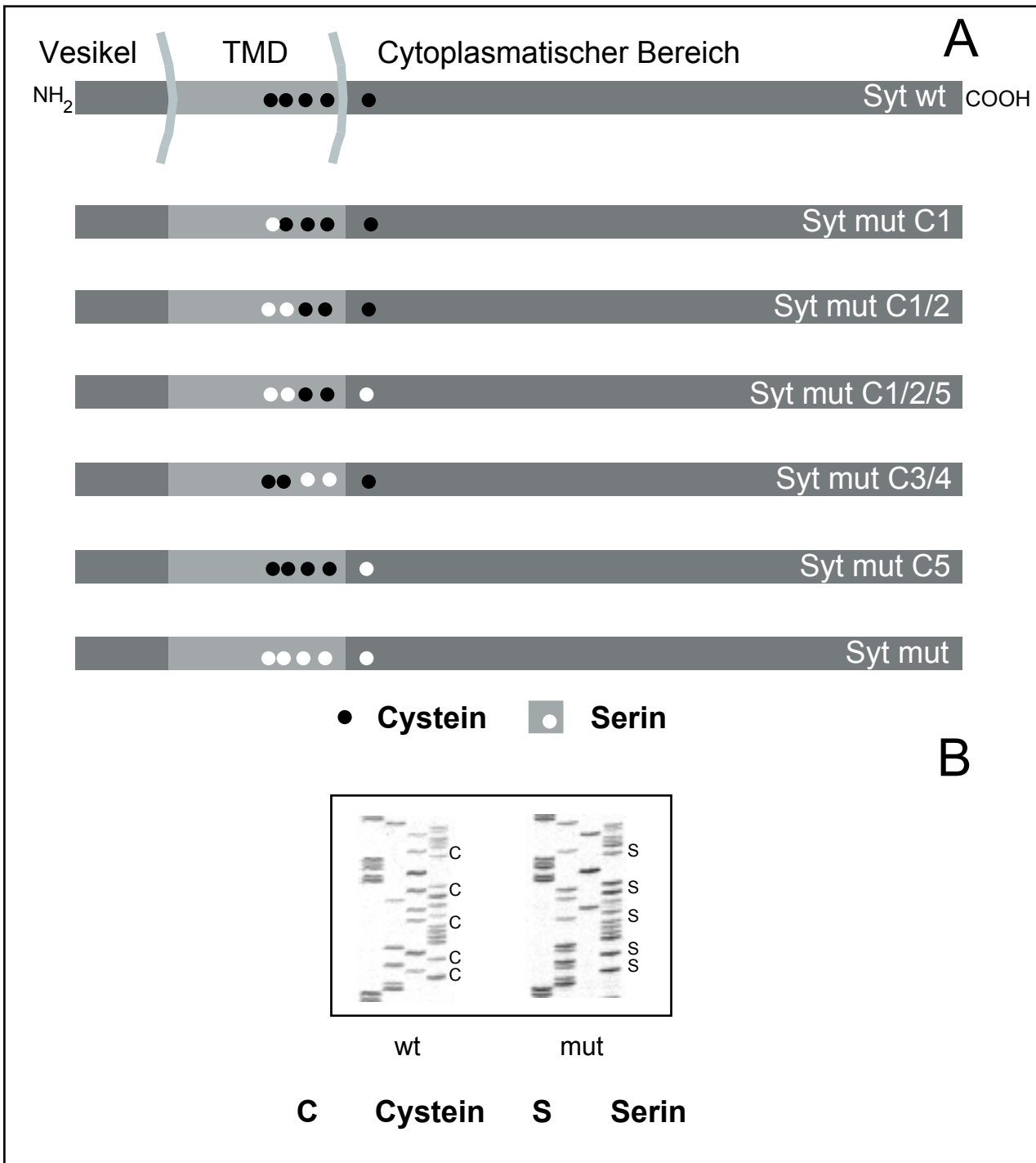


Abbildung 7: Darstellung der hergestellten Mutanten des Synaptotagmin-Gens,

A schematische Gegenüberstellungen der Mutanten mit den interessierenden Palmitoylierungsstellen in der Acylierungsregion; B Sequenzierergebnisse von Wildtyp und Vollmutante (alle Sequenzierergebnisse siehe Abb. 11), dargestellt sind jeweils die Bereiche der Basen 217 bis 253. C zeigt die Positionen der Cysteine (Triplets TGC bzw. TGT), S die Positionen der neu entstandenen Serine (Triplets TCC bzw. TCT).

nach Anwendung auf die ersten 50 - 500 bp oder 100 - 1000 bp verteilt. Die Fragmente werden in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Größe getrennt und mittels Fluorographie sichtbar gemacht.

3.2.2.4 *Herstellung von Synaptotagmin-Deletionsmutanten*

Zur Bestimmung der Fettsäurebindungsstelle und zur Untersuchung des Einflusses der Fettsäuren auf Reifung und Funktion des Synaptotagmins wurden Mutanten des Gens hergestellt. Das Wildtyp-Gen (wt) lag im pTM1-Vektor vor und konnte direkt einer Mutagenese mittels Overlap-Extension-PCR unterworfen werden. Abbildung 5 zeigt die Sequenzen der zur Bildung selektiver Deletionsmutanten als PCR-Primer eingesetzten Oligonukleotide (siehe auch 3.2.2.1).

Zur Bestimmung der Fettsäure-Bindungsstellen im Synaptotagmin-Gen wurden Mutanten hergestellt, bei denen ein oder mehrere Cysteine selektiv gegen Serine ausgetauscht wurden. Die Mutationen lagen jeweils in den überhängenden Enden der PCR-Primer, nach der zweiten PCR entstand jeweils das mutierte Gen mit den flankierenden Restriktionsenzym-Schnittstellen für Sac I und Xho I. Die Fragmente sowie der pTM-Vektor wurden mit diesen Enzymen verdaut und anschließend Fragment und Vektor ligiert.

Nach erfolgreicher Klonierung der mutierten Fragmente wurden die Klone mittels Restriktionsenzymverdau gescreent und sequenziert. Abbildung 7 zeigt schematisch die gebildeten Konstrukte (A) und die Sequenzierergebnisse der einzelnen Mutanten (B).

Prinzip des Vaccinia-Expressionssystems

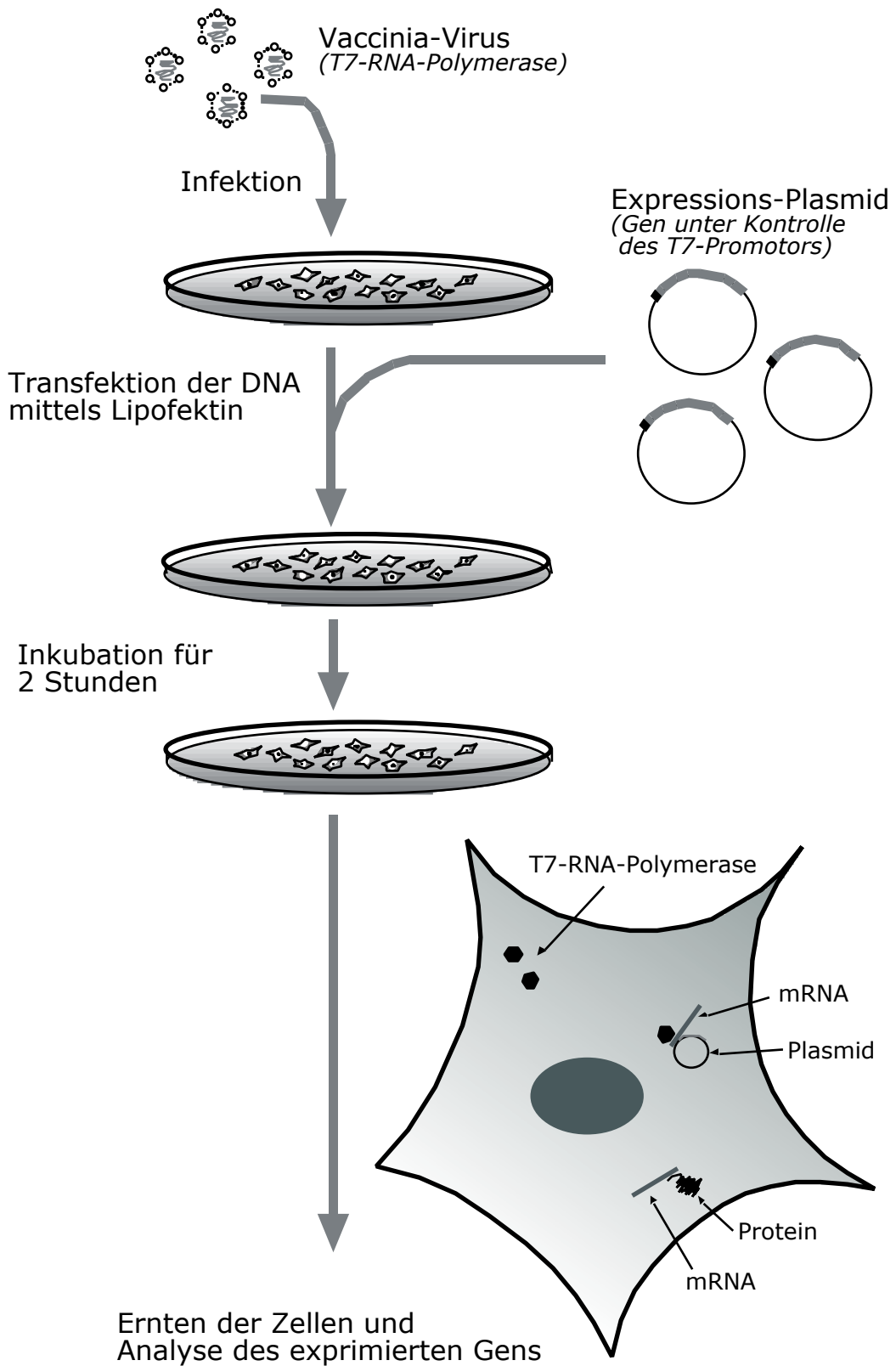


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Vaccinia-Expressionssystems,
Erläuterung siehe Text

Das Vaccinia-Virus gehört zu der Familie der Orthopoxviren und wird seit langem erfolgreich als Vektor zur Expression von Fremdgenen in eukaryotischen Zellen verwendet (Fuerst et al., 1986). Da sich das Virus, welches ein doppelsträngiges, etwa 190 kb großes DNA-Genom trägt, im Cytoplasma und nicht im Zellkern vermehrt, konnte ein zweistufiges Expressionssystem für transiente Expression von fremden Proteinen entwickelt werden. Zuerst infiziert man eukaryotische Zellen (CV1 oder BON) mit einer speziell konstruierten, rekombinanten Form des Vaccinia-Virus, welche das Gen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 enthält (vTF7-3 Virus). Die infizierten Zellen produzieren daraufhin im Cytoplasma die RNA-Polymerase. Transfiziert man nun die Zellen mit einem speziell entwickelten Plasmid (pTM1), in welchem das gewünschte Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors lokalisiert ist, erkennt die T7-RNA-Polymerase auf dem Plasmid vorliegende T7-Promotoren und transkribiert das darauf folgende Gen sehr wirkungsvoll in mRNA, die wiederum in Protein translatiert wird.

Zur Expression des Synaptotagmin-Gens sowie der Deletionsmutanten wurden CV1-Zellen sowie BON-Zellen verwendet, die in Kunststoffschalen von etwa 35mm Durchmesser vorher bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert wurden. Infiziert wurde mit einer MOI von 10 PFU Vaccinia-T7-Virus pro Zelle in 200 - 500 µl Medium. Während der folgenden Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Schalen alle 30 min geschwenkt, um ein eventuelles lokales Austrocknen der Zellschicht zu vermeiden. Die Transfektion der infizierten Zellen erfolgte mittels Lipofektin-Reagenz (Life Technologies), wobei zwei Stunden nach der Infektion je 10 µl Lipofektin und 200 µl DMEM-Medium, bei geplanter ³⁵S-Methionin-Markierung mit DMEM ohne Methionin, gemischt und dazu je 3 µl DNA (Plasmid plus Fremdgen) zugegeben wurden. Während einer 20minütigen Inkubationszeit der Lipofektin-DNA-Lösungen bei Raumtemperatur wurde das virushaltige Medium über den Zellen entfernt und selbige zweimal mit Medium gespült. Die Lipofektin-DNA-Lösungen wurden auf jeweils 1 ml mit Medi-

um ergänzt und zu den Zellen gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37 °C konnte die Markierung erfolgen. Abbildung 8 zeigt den schematischen Ablauf der durchgeführten Proteinexpression.

3.2.4 Proteincharakterisierung

3.2.4.1 Radioaktive Markierung

Zur Charakterisierung der exprimierten Konstrukte wurde eine metabolische Markierung mit ³⁵S-Methionin (Trans-³⁵S-Label, ICN) und zum Nachweis der Palmitoylierung eine Markierung mit ³H-Palmitinsäure (Hartmann Analytik, Frankfurt) durchgeführt.

Die Markierung erfolgte 2 - 3 Stunden nach der Transfektion der Zellen mit der Plasmid-DNA. Für eine ³⁵S-Methionin-Markierung wurden die Zellen zunächst mit Medium ohne Methionin gewaschen und schließlich mit 0.5 ml dieses Mediums versetzt. Durch Zugabe von 30 µCi Trans-³⁵S-Label wurde dann für 2 bis 3 Stunden radioaktiv markiert.

Die Fettsäure-Markierung erfolgte nach Waschen der Zellen mit DMEM und Zugabe von 0,5 ml Medium und 0.5 mCi ³H-Palmitinsäure. Die Inkubationszeit betrug wiederum 2 bis 3 Stunden.

Die Zellen wurden in beiden Fällen danach mit PBS („phosphate buffered saline“, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM KH₂PO₄, 6 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) gespült und mit 600 µl RIPA-Puffer (1% Triton X-100, 1% Natriumdesoxycholat, 0.1% Natriumdodecylsulfat [SDS], 0.15 M Natriumchlorid, 20 mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF], 10 mM Jodacetamid) lysiert. Durch Zentrifugation für 15 min wurden Kernbestandteile abzentrifugiert.

3.2.4.2 Immunpräzipitation

Die Präzipitation der exprimierten Proteine erfolgte mittels monoklonaler Antikörper gegen Synaptotagmin I bzw. gegen das *myc*-Epitop (Sigma-Aldrich). Dem gewonnenen Lysat wurde 1 µl bzw. 10 µl Antiserum zugegeben und über Nacht bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden 30 µl Protein-A-Sepharose (1:1 in RIPA-Puffer) zugegeben und bei 4 °C erneut 2 Stunden geschüttelt. Die Protein-A-Sepharose mit dem gebundenen Protein wurde abzentrifugiert (1 min bei 13000 rpm) und dreimal durch Resuspendierung und Zentrifugation mit RIPA-Puffer gewaschen, um eine unspezifische Proteinbindung zu minimieren.

3.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Dem Immunpräzipitat wurden 10 µl Probenpuffer (31.25 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% Glycerin, 3% SDS, 0.5% Bromphenolblau) zugesetzt, je nach Markierung mit oder ohne Merkptaoethanol (5%), 5 min auf 100°C erhitzt und abzentrifugiert (10 min bei 20000 x g). Die Proben wurden dann in einem 8-12%igen Polyacrylamid-Gel bei einer Spannung von 170 V aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min fixiert (10% Methanol, 10% Essigsäure in H₂O), dreimal mal mit Wasser gewaschen und schließlich 30 min in Na-Salicylat (1M) geschwenkt. Das Gel wurde auf Whatman-Papier überführt und in einem Geltdrockner unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-OmatTM) aufgelegt und bei -80°C belichtet.

3.2.4.4 Pulse-Chase-Experimente, Endo-H- und PNGase-F-Verdau

Die nach 3.2.3 infizierten und transfizierten Zellen wurden nur für wenige Minuten mit Trans-³⁵S-Label markiert. Nach Wegwaschen des Markierungsmediums wurde durch

Zugabe eines Überschusses an unmarkierter Aminosäure der Einbau der radioaktiven Aminosäuren unterbunden und die Zellen entweder sofort auf Eis lysiert (Pulse) oder vor der Zellyse für bestimmte Zeiten (Chase) bei 37°C inkubiert. Lysiert und immunpräzipitiert wurden die Zellen, wie bereits beschrieben.

Um die Art der Glykosylierung der Expressionsprodukte zu klären, wurden die Proteine vor der SDS-PAGE und nach der Immunpräzipitation einem Verdau mit Endoglykosidasen unterworfen. Dabei wurden Endoglykosidase H (Endo-H) und Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) verwendet, wobei mit ersterer Mannose-Seitenketten und mit letzterer alle N-glykosidisch gebundenen Seitenketten abgespalten werden können. Es wurde nach den Empfehlungen des Herstellers (NEB, Schwalbach) verfahren. Für den Verdau mit Endo-H bzw. PNGase-F wurden die ³⁵S-markierten und präzipitierten Proben in 30 µl Denaturierungspuffer (NEB) aufgenommen, für 5 min auf 100°C erhitzt und zentrifugiert (10 min bei 14000 rpm). Danach wurden je 15 µl in drei neue Eppendorf-Röhrchen überführt. Für den Verdau mit PNGase-F (Probe 1) wurden 2 µl PNGase-F Puffer (10x), 2 µl NP40 (10%) sowie 1 µl PNGase-F (1x10⁶ Einheiten / ml), dem Verdau mit Endo-H (Probe 2) 2 µl Endo-H Puffer (10x), 2 µl destilliertes Wasser sowie 1 µl Endo-H (0.5x10⁶ Einheiten / µl) zugegeben. Probe 3 wurde als Kontrolle lediglich mit 2 µl Endo-H-Puffer sowie 3 µl destilliertem Wasser versetzt. Nach Inkubation für 1 Stunde bei 37°C wurden jeweils 10 µl reduzierender Probenpuffer zugegeben und die Proben anschließend im SDS-Gel getrennt.

3.2.4.5 Zellfraktionierung im Saccharose-Gradienten

Um weiterhin Aufschluß über den intrazellulären Transport der exprimierten Proteine zu erhalten, wurden die transfizierten Zellen auf einem Saccharose-Gradienten getrennt. Dazu wurden CV1- oder BON-Zellen (ca. 80% konfluent) in Kulturschalen mit 100mm Durchmesser infiziert und mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (analog 3.2.3 mit den vierfachen Mengen der eingesetzten Substanzen) sowie mit je

100 μCi Trans- ^{35}S -Label für zwei Stunden markiert (analog 3.2.4.1). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen und mit 1 ml PBS-Puffer mit Protease-Inhibitor Complete Mini (Boehringer, Mannheim; 1 Tablette / 10ml PBS) von den Platten gespült. Die Zellen wurden danach durch 20maliges Aufziehen mit einer sehr engen Kanüle (Braun, Melsungen) auf Eis aufgebrochen, in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und Kerne und unaufgeschlossene Zellen abzentrifugiert (5 min bei 20000 x g). Der Überstand wurde auf einen Saccharose-Gradienten gegeben, der durch manuelles Übereinanderschichten von je 400 μl Saccharose-Lösungen mit fallender Konzentration (2 M, 1.8 M, 1.6 M, 1.4 M, 1.2 M, 1 M, 0.8 M, 0.6 M, 0.4 M, 0.2 M) in Eppendorf-Zentrifugenröhrchen hergestellt wurde. Es folgte eine Zentrifugation von 3 Stunden bei 36000 rpm und 4°C. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden die Röhrchen am Boden mit einer Kanüle punktiert und die enthaltene Lösung tropfenweise in 12 Eppendorf-Reaktionsgefäße (je 400 μl) fraktioniert. Durch Zugabe von je 800 μl RIPA-Puffer wurden die Proteine von den Membranfragmenten getrennt, analog 3.2.4.2 immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

3.2.4.6 *Indirekte Immunfluoreszenz*

Mit indirekter Immunfluoreszenz können Unterschiede im intrazellulären Transport exprimierter Proteine sichtbar gemacht werden. Dazu wurden PC-12 Zellen mit NGF als Suspension in unbeschichteten 600ml-Kulturflaschen gezüchtet, in beschichtete 24-Well-Kulturplatten ausgesät und transient mittels Lipofektion mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 1300 rpm (Hettich-Zentrifuge) abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und davon etwa 50.000 Zellen pro Kavität einer 24-Well-Platte ausgesät. Die Kavitäten der Kulturplatte wurden vorher für 60 min mit je 500 μl einer 100mM Poly-D-Lysin-Lösung beschickt und nach Abnehmen der Lösung getrocknet. Zur Differenzierung wurde den Ansätzen NGF (nerve growth factor) für eine Endkonzentration von 50-100 ng/ml zugegeben.

Nach 3 Tagen wurde das Medium abgenommen, mit serumfreiem Medium gespült und wie oben beschrieben mittels Lipofektin mit dem Fremdgen transfiziert. Dazu wurden 10 μ l Lipofektin und 3 mg Plasmid in 200 μ l DMEM ohne Serum gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dieser Mischung wurden die Zellen für 4 Stunden/über Nacht inkubiert, danach abgelöst, zentrifugiert und auf poly-D-Lysin-beschichteten Deckgläschen ausgesät.

Nach weiteren 2 Tagen Inkubation mit NGF-haltigem Medium wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (3% in PBS) für 15 min fixiert und die Reaktion durch Zugabe von Glycin (0.1 M in PBS) gestoppt. Durch Zugabe von Triton X-100 (0.1% in PBS) wurden die Zellen für die Aufnahme der Antikörper permeabilisiert. Der erste Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:300 (monoklonales anti-Syt) bzw. 1:200 (anti-*myc*) und der zweite 1:50 (FITC-konjugiertes anti-Maus-Antiserum), beide in PBS mit 2% Rinderserum-Albumin, für jeweils eine Stunde zu den Zellen gegeben, wobei die ungebundenen Antikörper nach jeder Zugabe durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt wurden. Die Deckgläser wurden mit 90%igem Glycerin in PBS auf Deckgläser gesetzt und die zelluläre Fluoreszenzverteilung mikroskopisch untersucht und fotografisch festgehalten.