

3 Methoden

3.1 Bakterienkulturen

3.1.1 Lagerung und Reaktivierung von Bakterienkulturen

0,5ml einer Übernachts-Flüssigkultur (Kap. 3.1.3) wurden mit 0,5ml 70%-igem Glycerin vermischt und bei -80°C gelagert. Für die Reaktivierung dieser Glycerinkulturen wurde mit einer Impfnadel ein kleiner Teil der gefrorenen Glycerinkultur abgekratzt und damit eine Plattenkultur (Kap. 3.1.2) oder eine Flüssigkultur (Kap. 3.1.3) angeimpft.

3.1.2 Plattenkulturen

LB-Medium wurde zusammen mit 15g/l Agar-Agar autoklaviert. Nach Abkühlung auf etwa 55°C wurde das zur Selektion notwendige Antibiotikum in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: Ampicillin $100\mu\text{g/ml}$; Kanamycin $50\mu\text{g/ml}$; Zeocin $25\mu\text{g/ml}$ (Kap. 2.3). Das warme, mit den entsprechenden Zusätzen versehene Medium wurde in sterile Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Platten erfolgte über mehrere Wochen bei 4°C , bei Zugabe von Zeocin zusätzlich im Dunkeln.

Durch Zugabe von $10\mu\text{g/ml}$ IPTG und $40\mu\text{g/ml}$ X-Gal konnte beim pBluescript II KS-Plasmid (Kap. 2.3) eine zusätzliche Blau-Weiß-Selektion auf β -Galactosidase-Aktivität erreicht werden. Dabei färbten sich die negativen Klone aufgrund eines auf dem Plasmid kodierten intakten β -Galactosidase-Gens blau, während die positiven Klone nach Unterbrechung des β -Galactosidase-Gens durch das inklonierte DNA-Fragment weiß blieben. Der pZerO-2-Vektor (Kap. 2.3) ermöglichte ebenfalls eine zusätzliche Selektion durch die Kodierung des Suizidgens *ccdB*, dessen Produkt die bakterielle DNA-Gyrase inhibiert und dessen Expression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert werden kann, da es unter Kontrolle einer *lac*-Promotor/Operator-Region steht. Daher wuchsen bei entsprechender IPTG-Konzentration nur Klone, bei denen durch Ligation eines DNA-Fragmentes in die multiple Klonierungsstelle (Kap. 3.18.1) des pZerO-2-Vektors das Suizidgen nicht transkribiert werden konnte.

Bei Bedarf wurden die Bakterien nach einer Transformation (Kap. 3.18.3) auf die jeweiligen Platten, die etwa 30min zuvor bei 37°C austrockneten, vollständig ausplattiert. Glycerinkulturen (Kap. 3.1.1) wurden mit einer Impfnadel in Form eines Gittermusters ausgestrichen.

LB-Medium: 0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 0,5% Natriumchlorid

3.1.3 Flüssigkulturen

0,6 bis 500ml LB-Medium (Kap. 3.1.2), gegebenenfalls mit entsprechendem Antibiotikum (Kap. 3.1.2; Kap. 2.3) wurden aus einer Glycerinkultur (Kap. 3.1.1) oder von einer einzelnen Kolonie einer Agar-Platte (Kap. 3.1.2) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 280 Upm geschüttelt. 0,6ml Kultur wurden dabei in 1,3ml Röhren, 3ml in 10ml Greiner-Röhren geschüttelt. Für größere Mengen wurden entsprechende Glaskolben verwendet, wobei die optimale Größe der Kolben etwa der 10-fachen, die minimale der 4-fachen Menge der jeweiligen Kultur entspricht.

Für Flüssigkulturen gilt folgende Beziehung zwischen OD₆₀₀ und der Zelldichte:
 $1 \text{ OD}_{600} = 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$

3.2 Kultur von Säugetierzellen

3.2.1 Lagerung und Reaktivierung von Stammkulturen

Die Zellen wurden 5min bei 300 x g zentrifugiert und in einer Konzentration von 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml in Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurden 1ml Aliquots in Cryo-Röhren gefüllt und unmittelbar danach bei einer kontrollierten Abkühlung von etwa 1°C/min in einer speziellen Einfrierbox für mindestens 16h bei -80°C gelagert, bevor sie in -196°C kalten flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Die Reaktivierung der eingefrorenen Zellen erfolgte durch rasches Auftauen im 37°C warmen Wasserbad. Sofort nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 10ml des entsprechenden Mediums (Kap. 3.2.4; Kap. 3.2.2) gewaschen. Nach Zentrifugation für 5min bei 300 x g sind sie in dem entsprechenden Medium aufgenommen und, falls nicht anders angegeben, in eine 75cm²-Zellkulturflasche überführt worden.

Einfriermedium: 90% FKS, 10% DMSO

3.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Säugetierzellen wurden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gehalten. FKS wurde grundsätzlich durch Erhitzen auf 56°C für 20min inaktiviert. Suspensionszellen (Jurkat, U937, J774A.1) wurden in S-Medium, adhärenente Zellen (HEK293, HeLa) in A-Medium kultiviert. Die entsprechenden Medien für CHO-K1, RBL, 80/1 und 18BE10-Zellen sind im Anschluß aufgeführt. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage je nach Konfluenz im Verhältnis 1:4 bis 1:10 umgesetzt. Adhärenente Zellen wurden dabei für 5min in 0,5ml (25cm²-Zellkulturflaschen), 1,5ml (75cm²-Zellkulturflaschen) oder 4ml (150cm²-Zellkulturflaschen) Trypsinlösung bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 10ml des jeweiligen Mediums vereinzelt und auf neue Zellkulturflaschen oder -Schalen verteilt.

S-Medium: 500ml RPMI 1640, 50ml FKS, 5ml 200mM L-Glutamin, 5ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin

A-Medium: 500ml DMEM, 50ml FKS, 5ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin

CHO-K1-Medium: 500ml DMEM, 25ml FKS, 5ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin

RBL-Medium: 500ml Iscove's MEM, 50ml FKS, 5ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin, 1mM Natriumpyruvat

80/1-Medium: 500ml RPMI 1640, 50ml FKS, 5ml 200mM L-Glutamin, 5ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin, 25mM HEPES, 5ml 100x Stammlösung nicht essentieller Aminosäuren, 1mM Natriumpyruvat, 0,5ml 50mM β -Mercaptoethanol, 10U/ml IL-2, 2 μ g/ml Concanavalin A

18BE10-Medium: 500ml RPMI 1640, 50ml FKS, 5ml 200mM L-Glutamin, 5ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin, 25mM HEPES, 5ml 100x Stammlösung nicht essentieller Aminosäuren, 1mM Natriumpyruvat, 0,5ml 50mM β -Mercaptoethanol, 100U/ml GM-CSF

PBS-d: 8g/l Natriumchlorid, 0,2g/l Kaliumchlorid, 1,44g/l Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 0,2g/l Kaliumdihydrogenphosphat

Trypsinlösung: 0,25% Trypsin, 0,05% EDTA in PBS-d

3.2.3 Kultivierung und Inaktivierung von embryonalen Fibroblastenzellen

Ein Cryo-Röhrchen mit $1,4 \times 10^7$ G418-resistenten embryonalen Fibroblastenzellen (EMFI) wurde aufgetaut (Kap. 3.2.1) und in eine 150cm²-Zellkulturflasche mit 25ml EMFI-Medium überführt. Die EMFI wurden bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂ gehalten. Nach 2 bis 4 Tagen wuchsen die EMFI konfluent und konnten im Verhältnis 1:4 passagiert werden. Dazu wurden sie für etwa 5min in 4ml Trypsinlösung (Kap. 3.2.2) inkubiert, vereinzelt und je nach Verwendung wieder ausgesäht, inaktiviert oder eingefroren (Kap. 3.2.1). Die EMFI wurden bis

zur 3. Passage gehalten.

Um EMFI als sogenannte „Feeder-Zellen“ für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen verwenden zu können (Kap. 3.2.4) ist es notwendig, ihr Wachstum zu inhibieren. Nachdem sie konfluent gewachsen sind, wurden sie trypsiniert und nach Vereinzeln mit EMFI-Medium für 5min bei 300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zur mitogenen Inaktivierung mit einer Dosis von 5500rad radioaktiv bestrahlt. Anschließend wurden die inaktivierten EMFI in EMFI-Medium resuspendiert und in folgender Weise ausgesät:

	Fläche (cm ²)	Zellzahl
75cm ² -Flasche	75	4,7 x 10 ⁶
25cm ² -Flasche	25	1,7 x 10 ⁶
6-Lochplatte	9,5	6 x 10 ⁵
24-Lochplatte	2	1,2 x 10 ⁵
96-Lochplatte	1	3 x 10 ⁴

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂ bildeten die EMFI einen Zellrasen und konnten 7 weitere Tage lang als Feeder-Zellen für die Kultivierung von embryonalen Stammzellen (Kap. 3.2.4) verwendet werden.

EMFI-Medium: 500ml DMEM (4,5g/l Glucose), 60ml FKS, 6ml 200mM L-Glutamin, 6ml 100x Stammlösung nicht essentieller Aminosäuren, 1,2ml 50mM β-Mercaptoethanol, 3ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin

3.2.4 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Totipotente murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) stammen aus der inneren Zellmasse muriner Blastocysten und wachsen in Kultur in Form von adhärierenden Aggregaten. Um aus den ES-Zellen in einem späteren Stadium wieder einen vollständigen Organismus heranwachsen lassen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, die Totipotenz der Zellen aufrechtzuerhalten. Dies geschieht durch Zugabe des „Leukemia Inhibitory Factor“ (LIF), der die Differenzierung der ES-Zellen verhindert und ihre Proliferation fördert.

ES-Zellen wurden reaktiviert (Kap. 3.2.1) und in eine 75cm²-Zellkulturflasche mit 15ml ES-Medium und einem Zellrasen mit inaktivierten EMFI überführt. Sie wurden grundsätzlich nur auf inaktivierten EMFI, die als sogenannte „Feeder-Zellen“ dienen und die Differenzierung der ES-Zellen unterdrücken, kultiviert (Kap. 3.2.3). Die ES-Zellen wurden alle 1 bis 2 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:5 passagiert, wobei sie nach einem Waschschrift mit 10ml PBS-d (Kap. 3.2.2) 5min mit 1,5ml ES-Trypsinlösung abgelöst und nach Zugabe von 10ml ES-Medium vereinzelt wurden, bevor sie entweder wieder weggefroren (Kap. 3.2.1), zur Elektroporation verwendet

(Kap. 3.2.5) oder aber in neue Zellkulturflaschen mit Feeder-Zellen umgesetzt wurden. Die Kultivierung der ES-Zellen wurde in einem möglichst kurzen Zeitraum durchgeführt und die Zellen in dem frühest möglichen Stadium wieder eingefroren, da die Totipotenz durch spontane Differenzierungsereignisse in späteren Zellpassagen verloren gehen kann. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 10% CO₂.

ES-Medium: 500ml DMEM (4,5g/l Glucose), 90ml FKS, 6ml 200mM L-Glutamin, 6ml 100x Stammlösung nicht essentieller Aminosäuren, 1,2ml 50mM β -Mercaptoethanol, 3ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin, 3ml LIF Stammlösung in DMEM (10⁵U/ml)

ES-Trypsinlösung: 0,05% Trypsin, 0,01% EDTA in PBS-d (Kap. 3.2.2)

3.2.5 Elektroporation und Selektion von embryonalen Stammzellen

Für die gezielte Änderung eines bestimmten DNA-Abschnitts in murinen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) bedient man sich der homologen Rekombination, bei der es zu einem DNA-Austausch an einem ganz bestimmten Chromosomenlocus kommt. Dabei müssen die flankierenden Sequenzen des einzubauenden DNA-Konstrukts mit denen des auszutauschenden DNA-Abschnitts homolog sein. Um das DNA-Konstrukt in die ES-Zellen zu schleusen, wendet man die Methode der Elektroporation an, bei der die Zellen für einige Millisekunden einem elektrischen Feld ausgesetzt werden, wodurch DNA-Fragmente aus dem Medium in die Zellen eindringen können.

Zu diesem Zweck wurden die ES-Zellen einen Tag vor der Elektroporation auf Feeder-Zellen ausgesät (Kap. 3.2.3; Kap. 3.2.4). Diese Zellen wurden dann mit ES-Trypsin abgelöst (Kap. 3.2.4) und nach Zugabe von 10ml ES-Medium (Kap. 3.2.4) vereinzelt. Nach Zentrifugation für 5min bei 300 x g wurden die Zellen in 10ml PBS-d (Kap. 3.2.2) resuspendiert und gezählt (Kap. 3.2.8). Anschließend wurden sie ein weiteres Mal zentrifugiert und mit PBS-d auf eine Konzentration von $1,2 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. 0,8ml dieser Zellsuspension wurden mit 20 μ g des liniarisierten DNA-Konstrukts vermischt, in eine sterile Elektroporationsküvette mit 4mm Elektrodenabstand gefüllt und bei 240V und 500 μ F elektroporiert. Nach 10min Inkubation auf Eis wurden jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen auf 10cm Zellkulturschalen mit Feeder-Zellen ausgesät (Kap. 3.2.3; Kap. 3.2.4). Am folgenden Tag wurde das ES-Medium gewechselt und nach einem weiteren Tag die Selektion der Zellen mit dem eingebauten DNA-Konstrukt, das ein Neomycin-Resistenzgen unter der Transkriptionskontrolle eines eigenen Promotors enthält, mit 400 μ g/ml G418 begonnen. Das ES-Medium wurde einmal täglich gewechselt bis der Großteil der Zellen abgestorben ist.

3.2.6 Isolierung G418-resistenter embryonaler Stammzellklone

Nachdem der Großteil der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) etwa 5 bis 7 Tage nach der Elektroporation (Kap. 3.2.5) unter G418-Selektion abgestorben war, wuchsen die resistenten Zellen zu einzelnen Kolonien heran und konnten unter dem Lichtmikroskop isoliert und auf 96-Lochplatten übertragen werden. Dabei wurde das Medium entfernt, und die einzelnen ES-Zellkolonien konnten mit 10 μ l ES-Trypsin (Kap. 3.2.4) durch mehrfaches Auf- und Abpipetieren abgelöst und in 96-Lochplatten überführt werden. Nach Zugabe von 200 μ l ES-Medium (Kap. 3.2.4) inklusive 400 μ g/ml G418 wurden die isolierten ES-Zellen vereinzelt und zu gleichen Teilen auf zwei weitere, mit Feeder-Zellen bewachsene und mit 100 μ l desselben Mediums angefüllte 96-Lochplatten verteilt (Kap. 3.2.3).

Nachdem die ES-Zellklone nach etwa 5 bis 7 Tagen konfluent gewachsen sind, wurde jeweils eine der beiden 96-Lochplatten für die genomische Analyse verwendet, während die andere eingefroren wurde. Zum Einfrieren wurden die adhärenen ES-Zellen mit je 200 μ l PBS-d (Kap. 3.2.2) gewaschen und mit je 25 μ l ES-Trypsin (Kap. 3.2.4) abgelöst. Nach Vereinzelung der Zellen wurden 75 μ l ES-Einfriermedium zugegeben und kurz gemischt. Die Platten wurden anschließend bis zu 3 Monate lang bei -80°C gelagert.

ES-Einfriermedium: 85% FKS, 15% DMSO

3.2.7 Isolierung und Kultivierung primärer muriner Milzzellen

Nachdem die Milz einer toten Maus herauspräpariert wurde, ist sie vorsichtig auf Eis in PBS-d (Kap. 3.2.2) mit dem Stempel einer sterilen 2ml Einmalspritze zerrieben worden. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Spitzröhrchen überführt, und nachdem sich innerhalb 1min die großen Bestandteile abgesetzt haben, ist der Überstand in ein weiteres 15ml Röhrchen überführt und für 5min bei 300 x g zentrifugiert worden. Anschließend sind die Zellen in 1x Erythrozyten-Lysispuffer (Kap. 3.4.3) resuspendiert und nach 3min Inkubation erneut bei 300 x g für 5min zentrifugiert worden. Nach zweimaligem Waschen in PBS-d sind die Zellen gezählt (Kap. 3.2.8) und für die Durchflußzytometrie weiterverwendet (Kap. 3.20) oder in S-Medium (Kap. 3.2.2) für bis zu 4h bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert worden.

3.2.8 Zellzahlbestimmung

Neubauer-Zählkammer

Zellen wurden im Verhältnis von 1:1 bis 1:5 mit 3%-iger Trypanblau-Lösung verdünnt, wobei tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und sich blau färben. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Bei Auszählung aller 4 großen Felder ergab sich folgende Beziehung:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen} / 4 \times \text{Verdünnung} \times 10^4.$$

Automatische Zellzahlbestimmung

Zur automatischen Zellzahlbestimmung wurde das Coulter Z1 Zellzählgerät verwendet. Dabei wurden 50 μl Zellsuspension in 10ml FACS-Puffer verdünnt und 1ml dieser Verdünnung ausgezählt. Das Gerät wurde auf Partikel mit 5 μm Durchmesser geeicht, der Verdünnungsfaktor betrug 1:200.

3.3 Proteinexpression in *E. coli*

Für die Proteinexpression in den *E. coli*-Stämmen Top10F', M15 und SG13009 (Kap. 2.1) wurden die Expressionsvektoren pGEX-2T (Kodierung eines N-terminalen Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteins) und pQE60 (Kodierung einer C-terminalen Hexahistidinsequenz) (Kap. 2.3) verwendet. Die Proteinexpression beider Vektoren steht unter der Kontrolle einer *lac*-Promotor/Operator-Region. Durch Zugabe von IPTG kann die Proteinexpression induziert werden.

3.3.1 Induktion der Proteinexpression

50ml Flüssigkultur (Kap. 3.1.3) der mit dem jeweiligen Vektorkonstrukt transformierten Bakterien (Kap. 3.18.3) wurde über Nacht bei 37°C und 280 Upm inkubiert und am darauffolgenden Tag im Verhältnis 1:10 bis 1:20 mit LB-Medium (Kap. 3.1.2) verdünnt. Für eine Proteinexpression im analytischen Maßstab wurden 50ml, für eine Expression im präparativen Maßstab 1 bis 2l angesetzt. Anschließend wurden die Bakterien für weitere 2 bis 3h bei 37°C und 280 Upm im Bakterienschüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht war. Nach Zugabe von 0,5mM IPTG ist die Inkubation der Bakterien für weitere 4h fortgesetzt worden.

3.3.2 Bakterienaufschluß

Aufschluß unter nativen Bedingungen

Die Bakterien wurden bei 3500 x g für 15min zentrifugiert und in 30ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Lyse erfolgte bei 4°C in einer French-Press (Gaulin, Micron-Lab 40) mit 2 x 800 bar. Unlösliche Bakterienbestandteile wurden anschließend bei 48000 x g und 4°C für 20min pelletiert. Der klare Überstand wurde für die Reinigung des Proteins weiterverwendet (Kap. 3.3.3).

Resuspensionspuffer: 150mM Natriumchlorid, 16mM Dinatriumhydrogenphosphat, 4mM Natriumdihydrogenphosphat, 1% Triton-X-100, pH 7,3

Aufschluß unter denaturierenden Bedingungen

Die Bakterien wurden bei 3500 x g für 15min zentrifugiert und in 30ml Harnstoffpuffer aufgenommen. Nach 1h bei Raumtemperatur im Überkopfschüttler mit mäßigem Tempo, bei der die Lösung aufklarte, schloß sich ein zusätzlicher Lyseschritt in einer French-Press (Gaulin, Micron-Lab 40) mit 2 x 800 bar an. Es folgte eine Zentrifugation für 20min bei 48000 x g, um unlösliche bakterielle Bestandteile zu pelletieren. Der klare Überstand wurde für die Reinigung des Proteins weiterverwendet (Kap. 3.3.3).

Harnstoffpuffer: 8M Harnstoff, 0,1M Natriumdihydrogenphosphat, 10mM Tris/HCl, pH 8,0

3.3.3 Proteinreinigung durch Affinitätschromatografie

Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

Die mit dem pGex-2T-Vektor (Kap. 2.3) hergestellten Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsproteine wurden über ihre Affinität zu reduziertem Glutathion, welches an Agarose-Partikeln immobilisiert ist, bei 4°C gereinigt. Dazu wurde der unter nativen Bedingungen aufgeschlossene Proteinextrakt (Kap. 3.3.2) auf eine Glutathion-Agarosesäule (5ml Volumen) gegeben, die zuvor mit 10 Volumen Resuspensionspuffer (Kap. 3.3.2) equilibriert worden war. Während der ganzen Prozedur wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe (P1, Pharmacia Biotech) eine Flußrate von etwa 1ml/min sichergestellt. Anschließend wurde die Säule mit 20 Volumen Resuspensionspuffer gewaschen und mit weiteren 5 Volumen Elutionspuffer umgepuffert. Die Elution erfolgte mit 20ml Elutionspuffer, in dem 5mM reduziertes Glutathion frisch gelöst

waren. Es wurden 20 1ml-Fractionen gesammelt, von denen anschließend der Proteingehalt bestimmt (Kap. 3.5) und die Reinheit des Proteins über Polyacrylamidgele (Kap. 3.6) und anschließender Proteingelfärbung (Kap. 3.7) kontrolliert wurde. Die Säule wurde mit weiteren 30ml Elutionspuffer inklusive 5mM reduziertem Glutathion gewaschen und mit weiteren 5 Volumen Resuspensionspuffer wieder in den Ausgangszustand zurückversetzt.

Elutionspuffer: 50mM Tris/HCl, pH 8,0

Reinigung von Hexahistidin-markierten Proteinen

Die mit dem pQE60-Vektor (Kap. 2.3) hergestellten C-terminal Hexahistidin-fusionierten Proteine wurden über ihre Affinität zu Nickelionen, die an dem Chelator Nitrilotriacetylsäure (NTA) komplexiert und an Agarose-Partikeln immobilisiert sind, bei Raumtemperatur gereinigt. Dazu wurde der unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossene Proteinextrakt (Kap. 3.3.2) zu 3ml des immobilisierten Nickel-NTA-Komplexes (Ni-NTA) gegeben und für 1h bei mäßiger Geschwindigkeit gerührt. Anschließend ist die Suspension in eine Leersäule gegeben worden, wobei die Flüssigkeit aus der Säule heraustropfen und die Ni-NTA-Agarose sich in der Säule absetzen konnte. Die Flußrate wurde auf etwa 1ml/min eingestellt, indem die Höhe des Flüssigkeitsspiegels des jeweiligen Puffers entsprechend variiert wurde. Die Ni-NTA-Agarose ist anschließend mit 2 x 4ml Waschpuffer gewaschen worden, bevor die Proteine mit 4 x 1ml Elutionspuffer-1 und anschließend mit 16 x 1ml Elutionspuffer-2 eluiert wurden. Es wurden 20 1ml-Fractionen gesammelt, von denen anschließend der Proteingehalt bestimmt (Kap. 3.5) und die Reinheit des Proteins über Polyacrylamidgele (Kap. 3.6) und anschließender Proteingelfärbung (Kap. 3.7) kontrolliert wurde.

Waschpuffer: 8M Harnstoff, 0,1M Natriumdihydrogenphosphat, 10mM Tris/HCl, pH 6,3

Elutionspuffer-1: 8M Harnstoff, 0,1M Natriumdihydrogenphosphat, 10mM Tris/HCl, pH 5,9

Elutionspuffer-2: 8M Harnstoff, 0,1M Natriumdihydrogenphosphat, 10mM Tris/HCl, pH 4,5

3.4 Proteinexpression in Säugetierzellen

Für die Proteinexpression in Säugetierzellen wurden Plasmide verwendet, die eine Expression unter der Kontrolle des „early“ Enhancer/Promotor-Komplexes aus dem Affenvirus SV40 (z.B. pZeoSV2, Kap. 2.3) oder des „immediate-early“ Promotors aus dem Cytomegalovirus (z.B. pRC/CMV, pcDNA3.1, Kap. 2.3) erlauben.

3.4.1 Transfektion von Säugetierzellen

Calciumphosphat-Methode

Die Calciumphosphat-Methode bietet sich vor allem bei adhärent wachsenden Zellen an. Sie wurde für HeLa, HEK293 und CHO-K1-Zellen angewendet. Am Vortag wurden die Zellen in der Weise ausgesäht, daß sie zum Zeitpunkt der Transfektion maximal 50% konfluent gewachsen sind. Für eine 6-Lochplatte wurden je Loch 70 μ l, für eine 10cm-Zellkulturschale 1ml und für eine 15cm-Zellkulturschale 2,5ml Transfektionsansatz eingesetzt. Für 1ml Transfektionsansatz wurden 50 μ l einer 2,5M wässrigen Calciumchlorid-Lösung und 10 μ g Plasmid-DNA mit TE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 0,5ml aufgefüllt, die dann unter ständigem Durchmischen tropfenweise zu 0,5ml vorgelegtem 2x HEBS-Puffer zugegeben wurden. Die sich bildenden Calciumphosphat-Kristalle sollten möglichst feinkörnig sein und bereits nach wenigen Minuten unter dem Lichtmikroskop sichtbar werden. Unmittelbar nach Sichtbarwerden der Kristalle im Lichtmikroskop wurde die Lösung gleichmäßig unter ständigem Schwenken der Zellkulturschale auf die Zellen getropft. Das Präzipitat wurde 6 bis 16h auf den Zellen belassen, bevor die Zellen geerntet oder nach einmaligem Waschen mit PBS-d mit normalem Medium weiterkultiviert wurden (Kap. 3.2.2).

2x HEBS-Puffer: 280mM Natriumchlorid, 1mM Kaliumchlorid, 1,1mM Dinatriumhydrogenphosphat, 10mM Glucose, 40mM HEPES, pH 7,08

TE-Puffer: 1mM EDTA, 10mM Tris/HCl, pH 7,08

Elektroporation

Die Elektroporation (vgl. auch Kap. 3.2.5) eignet sich vor allem für Suspensionszellen. Sie wurde für Jukat und aufgrund der besseren Transfektionsrate teilweise auch für CHO-K1-Zellen angewendet. Die Zellen wurden, falls nötig, trypsiniert (Kap. 3.2.2) und nach Vereinzeln für 5min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10ml PBS-d (Kap. 3.2.2) resuspendiert und gezählt (Kap. 3.2.8). Nach einer weiteren Zentrifugation für 5min bei 300 x g wurden die Zellen auf eine Konzentration von 5 x 10⁶ Zellen/ml mit PBS-d eingestellt. 0,8ml dieser Suspension wurden mit 20 μ g Plasmid-DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 4mm überführt. CHO-K1-Zellen wurden bei 250V, Jurkat-Zellen bei 280V und 1070 μ F elektroporiert. Anschließend sind CHO-K1-Zellen mit 10ml des entsprechenden Mediums auf 10cm-Zellkulturschalen und Jurkat-Zellen in 25cm²-Zellkulturflaschen ausgesäht worden (Kap. 3.2.2).

3.4.2 Selektion stabil exprimierender Zelllinien

Die Selektion Protein überexprimierender Zelllinien erfolgte über die Zugabe der Antibiotika Zeocin (500 μ g/ml) und G418 (400 μ g/ml). Zeocin selektioniert Zellen, die ein Plasmid mit einem Zeocin-Resistenzgen in ihr Genom integriert haben (z.B. pZeoSV2, Kap. 2.3), während G418 die Zellen selektioniert, die ein Plasmid mit einem Neomycin-Resistenzgen in ihr Genom integriert haben (z.B. pcDNA3.1, pRC/CMV, Kap. 2.3).

Selektion von Suspensionszellen

Einen Tag nach der Transfektion (Kap. 3.4.1) wurden die Zellen mit der 1,5-fachen oben angegebenen Menge des entsprechenden Antibiotikums unter Selektion gesetzt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt, wobei die Zellen für 5min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend in frischem Medium mit Antibiotikum resuspendiert wurden. Nach einer Woche wurde die Menge des Antibiotikums auf den oben angegebenen Wert reduziert. Nach etwa 2 bis 3 Wochen sind die meisten Zellen abgestorben. Unmittelbar nachdem sich die Zahl der überlebenden Zellen wieder leicht erhöht hat, sind sie in einer durchschnittlichen Konzentration von 0,5 Zellen/Loch auf 1 bis 4 96-Lochplatten verteilt worden. Die isolierten Zellen wuchsen in etwa 1 bis 2 Wochen wieder zu Zellklonen hoch, die auf 24-Lochplatten verteilt wurden. Nachdem die Zellen dort eine kritische Zelldichte erreicht haben, ist die Expression des jeweiligen Proteins mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Kap. 3.20) in den einzelnen Zellklonen kontrolliert worden. Die überexprimierenden Zellklone sind anschließend verbreitert und weggefroren worden (Kap. 3.2.1). Die Zugabe von Antibiotikum erfolgte kontinuierlich.

Selektion von adhärennten Zellen

Einen Tag nach der Transfektion (Kap. 3.4.1) wurden die Zellen mit der 1,5-fachen oben angegebenen Menge des entsprechenden Antibiotikums unter Selektion gesetzt. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Nach einer Woche wurde die Menge des Antibiotikums auf den oben angegebenen Wert reduziert. Nach etwa 1 bis 2 Wochen sind die meisten Zellen abgestorben. Als die überlebenden Klone zu einzelnen Kolonien hochgewachsen sind, wurden diese nach Entfernung des Mediums unter dem Lichtmikroskop mit 10 μ l Trypsinlösung (Kap. 3.2.2) unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren abgelöst und in 24-Lochplatten mit je 0,5ml Medium überführt. Nach Erreichen der Konfluenz sind sie in 6-Lochplatten umgesetzt worden. Nachdem sie auch dort konfluent gewachsen sind, ist die Expression des jeweiligen Proteins mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Kap. 3.20) in den einzelnen Zellklonen kontrolliert worden. Die überex-

primierenden Zellklone sind anschließend verbreitert und weggefroren worden (Kap. 3.2.1). Die Zugabe von Antibiotikum erfolgte kontinuierlich.

3.4.3 Isolierung membranständiger Proteine

Einen Tag nach der Transfektion (Kap. 3.4.1) wurden Zellen geerntet, in PBS-d (Kap. 3.2.2) gewaschen und gezählt (Kap. 3.2.8). Bei Organpräparationen wurden die Organe auf Eis in PBS-d zerkleinert und durch ein Haushaltssieb gerieben. Nach Überführung in ein 15ml Spitzröhrchen konnten sich große Fragmente absetzen, während der Überstand in ein neues 15ml Röhrchen gegeben wurde. Nach Zentrifugation für 5min bei 300 x g wurden die isolierten Zellen für 3 bis 5min in 1x Erythrozyten-Lysispuffer resuspendiert, wodurch eine Lyse der Erythrozyten erreicht wurde. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-d wurden die Zellen ebenfalls gezählt, wobei auch tote Zellen berücksichtigt wurden. Sämtliche Zellpräparationen sind mit TEM-Puffer auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt worden, bevor sie in einem Homogenisator 30-mal auf Eis geschert wurden. Nachdem die Kerne bei 100 x g und 4°C für 5min abzentrifugiert worden sind, wurde der trübe Überstand bei 30000 Upm und 4°C in der Tischultrazentrifuge mit dem Rotor Ti100.4 für 30min zentrifugiert, um die Membranfragmente zu pelletieren. Diese Membranfragmente sind anschließend in 20-fach geringerem Volumen als die vorherige Zellsuspension in Lysispuffer aufgenommen und in Eppendorff-Reagenzgefäßen für mindestens 1h bei 4°C und mäßiger Geschwindigkeit überkopfgeschüttelt worden. Es schloß sich eine Ultrazentrifugation in dem Rotor Ti100.4 für 20min bei 70000 Upm und 4°C an, bei der die Membranfragmente pelletiert wurden. Die aus den Membranfragmenten herausgelösten Proteine befinden sich im Überstand und wurden nach der Bestimmung der Proteinkonzentration (Kap. 3.5) bis zu mehreren Monaten bei -80°C gelagert.

10x Erythrozyten-Lysispuffer: 4,49g Ammoniumchlorid, 0,5g Kaliumhydrogencarbonat, 18,5mg EDTA, pH 7,3, ad 50ml

TEM-Puffer: 0,5mM Magnesiumchlorid, 5mM EDTA, 10mM Tris/HCl, pH 7,6

Lysis-Puffer: 300mM Natriumchlorid, 2% Digitonin, 50mM Tris/HCl, pH 7,6

3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung bei 280nm

Die Photometrische Konzentrationsbestimmung bei 280nm beruht auf dem Prinzip, daß Tyrosin- und Tryptophanreste in Proteinen ultraviolettes Licht mit einer Wellenlänge von 280nm absor-

bieren.

Zunächst wurde das Photometer bei der Wellenlänge von 280nm mit einer Quarzküvette als Referenz geeicht, in der sich der gleiche Puffer befand, in dem auch die Proteine gelöst waren. Anschließend wurde die Absorption der Proteinlösungen bei 280nm (A_{280}) in der gleichen Quarzküvette bestimmt. Folgender Zusammenhang besteht näherungsweise zwischen A_{280} und der Proteinkonzentration:

$$\text{Proteinkonzentration} = 0,5\text{mg/ml} \times A_{280}.$$

3.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die von Bradford beschriebene Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250, der unspezifisch an Proteine bindet und dabei sein Absorptionsmaximum von 465nm nach 595nm verschiebt.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der BioRad-Proteintest verwendet. Dabei wurden in einer Microtiterplatte $20\mu\text{l}$ Färbereagenz zu $80\mu\text{l}$ Proteinlösung gegeben. Parallel zu den Proben wurde eine Konzentrationsreihe mit Lösungen bekannter BSA-Konzentrationen zwischen 0 und $100\mu\text{g/ml}$ BSA mitgeführt. Nach kurzem Durchmischen des Färbereagenzes mit den Proteinlösungen wurde die Absorption bei 595nm mit Hilfe eines ELISA-Lesegerätes (Dyna-tech, MR 5000) bestimmt und die Konzentration der Proben anhand der mitgeführten BSA-Konzentrationsreihe bestimmt.

3.6 Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

3.6.1 Glycingele

Glycingele wurden nach der Lämmli-Methode hergestellt, bei der die Proteine durch die Kombination von oberem Sammel- und unterem Trenngel in einem Volumenverhältnis von etwa 1:3 an der Grenzschicht fokussiert werden, wodurch die Proteinbanden in Lämmli gelen deutlich schärfer ausfallen als bei reinen Trenngelen. Die Zusammensetzung der Gele stellte sich wie folgt dar:

Lösung	Trenngel		Sammelgel
	10%	15%	5%
Trenngelpuffer	1,5ml	1,5ml	
Sammelgelpuffer			0,9ml
Polyacrylamidlösung	2ml	3ml	0,6ml
destilliertes Wasser	2,5ml	1,5ml	2ml
10% Ammoniumperoxodisulfat	$50\mu\text{l}$	$50\mu\text{l}$	$50\mu\text{l}$
TEMED	$5\mu\text{l}$	$5\mu\text{l}$	$5\mu\text{l}$

Die angegebenen Mengen beziehen sich auf jeweils 1 Minigel einer Biorad Minigelkammer. Die Polymerisierung der Gele wurde durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat gestartet. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit Wasser überschichtet, um eine möglichst gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Das Sammelgel wurde erst gegossen, nachdem das Trenngel auspolymerisiert war und das Wasser mit Whatman-Papier komplett entfernt worden war. In das Sammelgel wurde ein Taschenkamm plaziert. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurde der Taschenkamm entfernt und die Taschen unter fließendem Wasser gespült. Anschließend sind jeweils 2 Gele in eine Vertikal-Gelkammer (Mini-Protean, Biorad) eingespannt worden, die mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt wurde. Die Proteinproben sind im Verhältnis 3:1 mit 4x Probenpuffer gemischt und aufgrund der schwerlöslichen Eigenschaften des untersuchten EDG6-Rezeptors in der Regel *nicht* für 5min bei 95°C aufgekocht und danach sofort auf Eis abgeschreckt worden. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei 150V für etwa 1,5h durchgeführt.

Trenngelpuffer: 0,1% SDS, 1,5M Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,1% SDS, 1M Tris/HCl, pH 6,8

Polyacrylamidlösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bis-Acrylamid

5x Elektrophoresepuffer: 15,1g Tris, 72g Glycin, 5g SDS, ad 1l

4x Probenpuffer: 40ml Glycerin, 4g SDS, 4ml β -Mercaptoethanol, 2mg Bromphenolblau, 2,5g Tris, mit HCl auf pH 6,8, ad 100ml

3.6.2 Tricingele

Tricingele zeichnen sich durch ihre besonders guten Trenneigenschaften für niedermolekulare Proteine aus. Sie wurden in Anlehnung an das Protokoll für Glycingele (Kap. 3.6.1) hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele stellte sich wie folgt dar:

Lösung	Trenngel		Sammelgel
	8%	12%	4%
Gelpuffer	2ml	2ml	0,375ml
Polyacrylamidlösung	1,2ml	1,8ml	0,875ml
destilliertes Wasser	2,4ml	1,8ml	2,25ml
10% Ammoniumperoxodisulfat	30 μ l	30 μ l	30 μ l
TEMED	3 μ l	3 μ l	3 μ l
Glycerin (=5,5%)	0,334ml	0,334ml	

Der 1x Anodenpuffer ist in die äußere, der 1x Kathodenpuffer in die innere Kammer der Minigelapparatur (Mini-Protean, Biorad) gefüllt worden. Die Proteinproben sind im Verhältnis

3:1 mit 4x Probenpuffer (Kap. 3.6.1) gemischt, für 5min bei 95°C aufgeköcht und danach sofort auf Eis abgeschreckt worden. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei 70V für etwa 1h durchgeführt.

10x Anodenpuffer: 2M Tris/HCl, pH 8,9 (in 1x Anodenpuffer)

10x Kathodenpuffer: 1M Tricin, 1% SDS, 1M Tris/HCl, pH 8,25 (in 1x Kathodenpuffer)

Gelpuffer: 0,3% SDS, 3M Tris/HCl, pH 8,45

3.6.3 Harnstoffgele

Harnstoffgele eignen sich aufgrund der stark denaturierenden Eigenschaften vor allem für Proteine, die in anderen Gelsystemen dazu tendieren, nicht oder nur unzureichend in das Gel einzuwandern oder auszufallen. Sie wurden in Anlehnung an das Protokoll für Glycingele (Kap. 3.6.1) hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele stellte sich wie folgt dar:

	12% Trenngel	5% Sammelgel
Trenngelpuffer	1,875ml	
Sammelgelpuffer		1,25ml
Polyacrylamidlösung	3ml	0,65ml
Harnstoff	4,05g	2,7g
10% Ammoniumperoxodisulfat	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

Die Gelelektrophorese wurde gemäß der Beschreibung für Glycingele (Kap. 3.6.1) durchgeführt, die verwendeten Lösungen sind ebenfalls die gleichen.

3.7 Färbung von Proteingelen

3.7.1 Coomassie-Färbung

Bei der Coomassie-Färbung bindet der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau-R unspezifisch an Proteine, ohne die Polyacrylamidmatrix der Proteingele mitzufärben. Die Nachweisgrenze liegt bei dieser Methode im Bereich von einigen 100ng pro Proteinbande.

Nach der Gelelektrophorese (Kap. 3.6) wurden die Gele für 1h in die Coomassie-Färbelösung gelegt und bei mäßiger Geschwindigkeit geschwenkt, wobei die Gele gleichzeitig fixiert und gefärbt wurden. Anschließend sind sie solange in Entfärbelösung geschwenkt worden, bis die Gelmatrix nahezu rückstandsfrei wieder entfärbt war. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt. Die Proteinbanden hingegen behielten ihre blaue Farbe und setzten sich somit klar vom Hintergrund ab.

Coomassie-Färbelösung: 50% Methanol, 10% Essigsäure, 0,05% Coomassie Brilliant Blau-R

Entfärbelösung: 10% Essigsäure

3.7.2 Silberfärbung

Für die Silberfärbung von Proteinen, deren Nachweisgrenze bei 1 bis 10ng liegt und die damit deutlich sensitiver ist als die Coomassie-Färbung (Kap. 3.7.1), wurde das „Silver Staining Kit“ (Pharmacia Biotech) verwendet. Dabei wurde das Gel für 30min in Fixier- und weitere 30min in Sensitivierlösung geschwenkt. Nach 3 Waschschritten mit deionisiertem Wasser für je 5min wurde die Silberreaktion durch Zugabe der Silbernitratlösung gestartet. Nach 20min wurde zweimal 1min mit deionisiertem Wasser gewaschen und in der Entwicklerlösung 2 bis 5min lang entwickelt. Bevor sich ein deutlicher Hintergrund herausbildete, wurde die Stopplösung zugegeben und für 10min inkubiert. Schließlich ist das Gel dreimal 5min mit deionisiertem Wasser gewaschen und digitalisiert worden.

Fixierlösung: 2/5 Volumen Ethanol, 1/10 Volumen 96% Essigsäure

Sensitivierlösung: 3/10 Volumen Ethanol, 0,125% Glutardialdehyd, 0,2% Natriumthiosulfat, 6,8% Natriumacetat, frisch ansetzen

Silbernitratlösung: 0,25% Silbernitrat, 1/2500 Volumen 37% Formaldehyd, frisch ansetzen

Entwicklerlösung: 2,5% Natriumcarbonat, 1/5000 Volumen 37% Formaldehyd, frisch ansetzen

Stopplösung: 40mM EDTA

3.8 Transfer und Nachweis von Proteinen auf PDVF-Membranen

3.8.1 Transfer nach der Western-Blot-Methode

Der Transfer von Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PDVF)-Membran wurde mit der Mini-Blot Apparatur (Biorad) im Naßverfahren durchgeführt. Dazu wurde ein Stapel bestehend aus einem feuchten Schwamm, zwei feuchten Whatman-Papieren, dem Polyacrylamidgel, einer PDVF-Membran, die zuvor für 30sek in Methanol aktiviert und anschließend für mehrere Minuten in Blotpuffer eingetaucht wurde, zwei weiteren feuchten Whatman-Papieren und einem abschließenden feuchten Schwamm gemäß Herstellerangaben in die Blotapparatur eingespannt. Befeuchtet wurden die Papiere und Schwämme mit Blotpuffer, und es wurde darauf geachtet, daß die einzelnen Bestandteile des Stapels luftblasenfrei

aufeinanderlagen. Die Blotkammer wurde mit Blotpuffer gefüllt und mit einer Kühlbox, die gefrorenen Blotpuffer enthielt, versehen, um die Apparatur während des Transfers zu kühlen. Pro Blotkammer konnten 2 Gele geblottet werden. Der Transfer der Proteine auf die PDVF-Membran wurde für 1h bei 70V durchgeführt.

Blotpuffer: 25mM Tris, 192mM Glycin

3.8.2 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Proteintransfer (Kap. 3.8.1) wurde die Polyvinylidendifluorid (PDVF)-Membran zunächst für 1h bei mäßiger Geschwindigkeit in 20ml Blockierlösung geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. Nach zwei darauffolgenden Waschschritten mit TBST für jeweils 5 min wurde der Überstand einer der Primärantikörper 2A1, 6D7 und 8B4 (jeweils anti-murine-EDG6 Rattenantikörper), 3D12 (anti-humaner CCR7 Rattenantikörper, Isotypkontrolle) oder 9E10 (anti-*myc*-Epitop Mausantikörper, Positivkontrolle bei *myc*-Epitop markierten überexprimierten Rezeptoren (Kap. 3.4, 2.10)) im Verhältnis von 1:10 mit TBST verdünnt und jeweils 10ml auf die PDVF-Membran gegeben. Nach weiterem Schwenken für 1h wurden wiederum 3 Waschschrritte (1 x 15min, 2 x 5min) mit TBST eingelegt, bevor 10ml des Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:2000 (Alkalische Phosphatase gekoppelter anti-Maus oder anti-Ratte Antikörper) oder 1:5000 (Peroxidase gekoppelter anti-Ratte Antikörper) mit TBST für 1h auf die PDVF-Membran gegeben wurden. Nach drei weiteren Waschschrritten (1 x 15min, 2 x 5min) mit TBST wurden die mit dem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper inkubierten PDVF-Membranen dem Chemolumineszenz-Nachweis unterzogen (Kap. 3.8.2), während die mit dem Alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper inkubierten PDVF-Membranen für den NBT/BCIP Nachweis vorgesehen waren (Kap. 3.8.2).

TBST: 150mM Natriumchlorid, 10mM Tris/HCl, pH 8,0, 0,05% Tween-20

Blockierlösung: 5% Magermilchpulver in TBST

Chemolumineszenz-Nachweis

Der Chemolumineszenznachweis wurde mit Hilfe des ECL-Verfahrens (Amersham) durchgeführt. Dabei wurden pro Membran je 1ml der Reagenzien 1 und 2 gemischt, kurz durchmischt und flächendeckend auf die Membran getropft. Der Blot ist dann für 1min mit Cellophanfolie bedeckt worden, bevor die Lösung vorsichtig von der Membran abgetropft wurde. Der Blot ist unmittelbar in Cellophanfolie gewickelt und in Klarsichtfolie eingeschweißt worden. Anschließend ist in

einer Filmkassette für etwa 15min ein Röntgenfilm aufgelegt und schließlich entwickelt worden.

NBT/BCIP-Nachweis

Bei dieser Nachweismethode wird durch die Alkalische Phosphatase die Oxidation von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) bei gleichzeitiger Reduktion von Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) katalysiert, was in beiden Fällen zur Bildung eines blauen Präzipitats führt.

Zu 10ml Phosphatasepuffer sind 66 μ l NBT und 33 μ l BCIP (Promega) gegeben worden. Anschließend wurde die Lösung kurz gemischt und auf die Membran gegeben. Da sich innerhalb weniger Minuten ein Präzipitat bildet, wurde die Membran in dieser Zeit nicht geschwenkt. Als sich ein leichter Hintergrund bildete, ist die Reaktion mit 10ml einer wässrigen 50mM EDTA-Lösung gestoppt worden. Die Membran wurde anschließend digitalisiert.

Phosphatasepuffer: 5mM Magnesiumchlorid, 100mM Natriumchlorid, 100mM Tris/HCl, pH 9,5

3.8.3 Abwaschen gebundener Antikörper

Zum Abwaschen gebundener Antikörper nach der Chemolumineszenz-Immunodetektion (Kap. 3.8.2) wurde die noch feuchte Membran für 30min bei 50°C in Waschpuffer und anschließend zweimal für 10min bei Raumtemperatur in TBST (Kap. 3.8.2) geschwenkt. Anschließend ist die Membran bis zur weiteren Verwendung in Klarsichtfolie eingeschweißt worden.

Waschpuffer: 100mM β -Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5mM Tris/HCl, pH 6,7

3.9 Reinigungsmethoden für Nukleinsäuren

3.9.1 Phenolextraktion von Proteinen

Um die Proteine aus einer DNA-Präparation zu entfernen, wurde die DNA-Lösung, die ein Mindestvolumen von 0,1ml haben sollte, mit einem Volumen TE-gesättigtem Phenol versetzt und für etwa 1min kräftig gevortext. Danach wurde das Gemisch für 5min bei 13000 Upm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Dieses Gemisch wurde ebenfalls für etwa 1min kräftig durchmischt und anschließend für 3min bei 13000 Upm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die von Proteinen befreite DNA-Präparation.

3.9.2 Ethanolpräzipitation von DNA und RNA

Die DNA-Präparation wurde mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 4,8) versetzt und kurz geschüttelt. Anschließend wurden 2,5 Volumen -20°C kalten absoluten Ethanols zugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und für mindestens 1h bei -20°C oder 20min bei -80°C gelagert. Die DNA wurde dann durch Zentrifugation für 30min bei 13000 Upm und 4°C (Tischkühlzentrifuge) pelletiert. Das Präzipitat wurde durch Zugabe von 0,5ml -20°C kaltem absolutem Ethanol gewaschen und dann für mehrere Minuten an der Luft getrocknet, bevor es in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen wurde.

3.9.3 Abtrennung von Oligonukleotiden in DNA-Präparationen

Um Oligonukleotide nach einer reversen Transkription (Kap. 3.10.1) aus dem Ansatz zu entfernen, wurden „MicroSpin S-400 HR“ Säulen (Pharmacia Biotech) verwendet. Das Säulenmaterial wurde zunächst resuspendiert und anschließend in einem 1,5ml Eppendorff-Reagenzgefäß 1min bei $735 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule in ein neues 1,5ml Eppendorff-Reagenzgefäß gestellt, zwischen 25 und $100\mu\text{l}$ des zu reinigenden DNA-Ansatzes aufgetragen und weitere 2min bei $735 \times g$ zentrifugiert. Die gereinigte Probe konnte danach dem Eppendorff-Reagenzgefäß entnommen werden.

3.10 Amplifizierung von DNA mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.10.1 Synthese einzelsträngiger cDNA für die PCR

Für die Synthese einzelsträngiger cDNA ist die reverse Transkriptase „Superscript“ (Gibco) verwendet worden. $1\mu\text{g}$ mRNA beziehungsweise $10\mu\text{g}$ Gesamt-RNA wurden in $10\mu\text{l}$ DEPC-Wasser aufgenommen. Zu diesem Ansatz wurde $1\mu\text{l}$ (1pmol) Oligo(dT) Primer gegeben und für 3min bei 80°C denaturiert. Danach wurde die Lösung für 10min auf 37°C abgekühlt und eine Stammlösung mit $4\mu\text{l}$ 5x Transkriptasepuffer, $2\mu\text{l}$ 0,1M DTT, $1\mu\text{l}$ dNTP-Stammlösung, $1\mu\text{l}$ RNAsin und $1\mu\text{l}$ reverse Transkriptase zugegeben. Dieser Ansatz, der ein Gesamtvolumen von $20\mu\text{l}$ hatte, wurde für 1,5h bei 37°C inkubiert. Schließlich sind zur Inaktivierung der RNA $20\mu\text{l}$ einer 0,4M Natriumhydroxid-Lösung und nach weiteren 10 min bei 37°C $20\mu\text{l}$ 1M Tris/HCl (pH 7,5) zur Neutralisierung zugegeben worden. Der Ansatz mit einem Endvolumen von $60\mu\text{l}$ ist bei -20°C gelagert worden.

dNTP-Stammlösung: je 10mM der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP

DEPC-Wasser: 0,1% DEPC zu deionisiertem Wasser geben, kräftig schütteln, für mindestens 3h inkubieren lassen und anschließend autoklavieren.

3.10.2 Amplifizierung von DNA mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der *in vitro* Amplifizierung von einzel- und doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Für die PCR wurden die thermostabilen Polymerasen „Thermoprime Plus“ (Advanced Biotechnologies) und „CombiPol“ (InViTek) sowie die Thermoblöcke „Trio-Thermoblock“ (Biometra) und „Touch Down“ (Hybaid) verwendet. Der Zyklus einer automatisierten Amplifizierung war wie folgt aufgebaut:

1. *Denaturierung der Matrizen-DNA:*

Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 94°C.

2. *Primer-Anlagerung:*

Die Anlagerungstemperatur lag je nach Reaktion zwischen 50 und 65°C. Die Dauer der Primer-Anlagerung war für gewöhnlich 1min.

3. *Polymerisierung der komplementären DNA-Stränge:*

Die optimale Polymerisierungstemperatur war 72°C. Die Dauer des Polymerisierungsschritts variierte zwischen 30sek bei erwarteten Amplifikaten von wenigen hundert Basenpaaren und 1,5min bei Amplifikaten mit 1000 Basenpaaren und mehr.

In den meisten Fällen wurde mit 35 Zyklen gearbeitet. Ein typischer Reaktionsansatz der ThermoPrime Plus DNA-Polymerase sieht wie folgt aus: 1x Polymerasepuffer, 1,5mM Magnesiumchlorid, 0,2mM dNTPs (Kap. 3.10.1), 25pmol 3'- und 5'-Primer (Kap. 2.7), 1µl cDNA (Kap. 3.10.1), 1,25U Polymerase. Bei Verwendung der „CombiPol“ DNA-Polymerase, die aufgrund ihrer zusätzlichen 3'→5'-Exonucleaseaktivität in der Lage ist, Fehler bei der DNA-Synthese zu korrigieren, war der Reaktionsansatz entsprechend bis auf eine höhere dNTP-Konzentration von 0,4mM und der zusätzlichen Verwendung der mitgelieferten 5x Enhancer-Lösung.

3.10.3 Amplifizierung von 5'-cDNA-Enden mittels RACE-PCR

Die Amplifizierung von cDNA-Enden wurde mit Hilfe der RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) Technik gelöst (Frohman, 1994). Zur Amplifizierung des 5'-Endes der cDNA wurde zunächst eine reverse Transkription mit einem genspezifischen Primer (GSPRT) durchgeführt. Der Primer wurde so gewählt, daß er komplementär zu einem bekannten Abschnitt der cDNA ist. Die reverse Transkription wurde wie in Kap. 3.10.1 beschrieben durchgeführt, wobei allerdings anstelle des Oligo(dT) Primers der genspezifische GSPRT Primer verwendet wurde.

Der Primer wurde mittels „MicoSpin S-400 HR“Säulen (Pharmacia Biotech) wieder aus dem Ansatz entfernt (Kap. 3.9.3). 10µl der DNA aus dem gereinigten Ansatz wurden mittels der terminalen Transferase am 3'-Ende polyadenyliert (Kap. 3.17.4). Nach der Polyadenylierung ist der Reaktionsansatz auf 0,5ml mit TE-Puffer aufgefüllt worden. Von diesem Ansatz sind nun 10µl als DNA-Polymerisationsvorlage, die sogenannte „Template-DNA“, für die 1. PCR genommen worden (Kap. 3.10.2). Als Primer sind 25pmol GSP1 und Q0 sowie 2pmol QT verwendet worden (Kap. 2.7). Der Primer QT lagert sich dabei zunächst an das 3'-Poly(A)-Ende der eingesetzten Template-DNA an und fungiert somit als initial-5'-Primer, während GSP1 als genspezifischer 3'-Primer dient. Nach der ersten Amplifizierung lagert sich dann der Q0-Primer an den entsprechenden komplementären Sequenzabschnitt des ursprünglichen QT-Primers an und sorgt während der folgenden Zyklen für eine effiziente Amplifizierung des Sequenzabschnittes zwischen Q0 und GSP1. Die Primer wurden mittels „MicoSpin S-400 HR“Säulen wieder aus dem Ansatz entfernt und 10µl des Reaktionsansatzes der 1. PCR dienten dann als Template-DNA für eine weitere PCR mit jeweils 25 pmol der Primer Q1 (5'-Primer) und GSP2 (3'-Primer).

Bedingungen der 1. PCR: (1) 5min, 98°C (ohne Polymerase!); (2) 2min, 75°C (Thermoprime Plus DNA-Polymerase zugeben (Kap. 3.10.2)); (3) 2min, 52°C; (4) 40min, 72°C; (5) 1min, 94°C; (6) 1min, 52-60,7°C; (7) 3min, 72°C; 30 Zyklen (5-7); (8) 15min, 72°C

Bedingungen der 2. PCR: (1) 5min, 98°C (ohne Polymerase!); (2) 2min, 75°C (Thermoprime Plus DNA-Polymerase zugeben (Kap. 3.10.2)); (3) 1min, 94°C; (4) 1min, 52-60,7°C; (5) 3min, 72°C; 30 Zyklen (3-5); (6) 15min, 72°C

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

3.11 Trennmethode für Nukleinsäuren

3.11.1 DNA-Trennung durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte über Horizontalgele. Die Agarosekonzentration der Gele wurde wie folgt gewählt:

Agarosekonzentration im Gel (%)	Trennbereich (kbp)
0,3	60 - 5,0
0,6	20 - 1,0
0,7	10 - 0,8
0,9	7 - 0,5
1,2	6 - 0,4
1,5	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

Die Agarose wurde in 1x TBE gelöst und solange aufgeköcht, bis keine Schlieren mehr in der Lösung vorhanden waren. Vor dem Erkalten der Gele wurde $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid zugegeben und nach dem Gießen ein Taschenkamm in die Gelhalterung eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt. Als Laufpuffer der submarinen Gele diente 1x TBE. Die Elektrophoresen wurden bei kleinen $7 \times 8\text{cm}^2$ -Gelen (50ml Gel) mit 120V, bei mittleren $12 \times 14\text{cm}^2$ -Gelen (150ml Gel) mit 160V und bei großen $20 \times 25\text{cm}^2$ -Gelen (450ml Gel) mit 200V betrieben. Der Lauf konnte anhand des Farbstoffes Bromphenolblau, der Bestandteil des Probenpuffers ist, verfolgt werden. Die DNA-Auftrennung wurde durch die interkalierende Ethidiumbromid-Färbung am UV-Schirm bei Wellenlängen von 254 beziehungsweise 366nm sichtbar.

10x TBE: 890mM Borsäure, 20mM EDTA, 890mM Tris

10x Probenpuffer: 10mM EDTA, 25% Ficoll 400, 0,8% Bromphenolblau, 1x TBE

3.11.2 DNA-Trennung durch Polyacrylamid-Harnstoffgele

Die Auftrennung von einzelsträngigen DNA-Molekülen im Größenbereich von etwa 25 bis 1000bp erfolgte während der Sequenzierung (Kap. 3.19) über denaturierende Polyacrylamid-Harnstoffgele mit einer Dicke von 0,25mm und Längen von 30, 44 und 66cm. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

30cm Gel: 7M Harnstoff, 1x TBE, 8% Polyacrylamid

44cm Gel: 7M Harnstoff, 1x TBE, 6% Polyacrylamid

66cm Gel: 6M Harnstoff, 1x Long Run TBE, 4% Polyacrylamid, 0,8% Dimethylsulfoxid

Die Gele wurden aus 2 Glasplatten entsprechender Länge, die zuvor mit Wasser, 10% SDS und 70% Ethanol gereinigt wurden, zusammengesetzt. Zwei seitliche, 0,25mm dicke Abstandhalter sorgten für die passende Tiefe der Gele. Die Polymerisation von 60ml Gellösung wurde durch Zugabe von $40\mu\text{l}$ TEMED und $400\mu\text{l}$ 10% Ammoniumperoxodisulfat gestartet. Anschließend

wurde das Gel durch einen Sterilfilter luftblasenfrei zwischen die beiden Glasplatten gegossen und der Vorkamm an der oberen Gelkante eingesetzt und arretiert. Nachdem das Gel auspolymerisiert war und die obere Pufferkammer mit 1x TBE (Kap. 3.11.1) bei 30cm und 44cm Gelen beziehungsweise mit 1x Long Run TBE bei 66cm Gelen gefüllt wurde, ist der Vorkamm entfernt und der 48- oder 64-zahnige Kamm eingesetzt worden. Anschließend wurde das Gel vertikal in den Sequencer Li-Cor 4200L (MWG Biotech) eingespannt und die untere Pufferkammer gefüllt. Nach einer Vorlaufzeit von etwa 30min, in der nicht auspolymerisierte Gelerückstände entfernt und die Temperatur angepaßt wurde, wurden 0,8 oder 1,2 μ l der mit Probenpuffer versetzten Proben aufgetragen. Die 30cm Gele liefen bei 1000V etwa 5h, die 44cm Gele bei 1500V über Nacht und die 66cm Gele bei 2200V ebenfalls über Nacht. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte über die Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen mittels des eingebauten Lasers und die Erfassung der Fluoreszenz über eine entsprechende Optik. Die Auswertung der Banden erfolgte am Rechner.

10x Long Run TBE: 1340mM Tris, 45mM Borsäure, 25mM EDTA

Probenpuffer: 95% Formamid, 10mM EDTA, 0,1% Fuchsin (basisch), 0,01% Bromphenolblau, pH 9,0

Polyacrylamid-Lösung: Long Ranger (FMC)

3.11.3 RNA-Trennung durch Formamid-Agarosegele

30 μ g Gesamt-RNA beziehungsweise 3 μ g mRNA wurden in 30 μ l Denaturierungspuffer gelöst, dessen Formamid zuvor über „AG 501-X8 und Bio-Rex MSZ 501(D)“ Mischbett-Ionenaustauscher (Biorad) deionisiert wurde. 1,2% Agarose wurden in 5/6 Volumen 1x MOPS-Puffer aufgekocht und auf 60°C abgekühlt, bevor 1/6 Volumen 37% Formaldehyd (2,2M Endkonzentration) sowie 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid zugegeben wurden. Nachdem das Horizontalgel der Größe 12 x 14 cm² (150ml Gel) gegossen war, wurden die in Denaturierungspuffer gelösten Proben für 15min bei 70°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und anschließend mit 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt. Der Lauf des submarinen Gels erfolgte mit 1x MOPS-Puffer für etwa 4h bei 120V, wobei eine zwischengeschaltete Pumpe den Laufpuffer zwischen Anoden- und Kathodenraum umwälzte. Die RNA konnte anschließend auf einem UV-Schirm begutachtet werden.

10x MOPS-Puffer: 50mM Natriumacetat, 10mM EDTA, 200mM MOPS, pH 7,0

Denaturierungspuffer: 2,2M Formaldehyd, 50% deionisiertes Formamid, 1x MOPS-Puffer

10x Probenpuffer: 10% Ficoll 400, 0,8% Bromphenolblau, 1x MOPS-Puffer

3.12 Durchmustern einer Genbank

Zwei bis vier Tage vor dem Versuch wurden 15cm Agar-Platten (NZY-Medium, 1,5% Agar-Agar) gegossen und bei 4°C gelagert. Am Vortag wurden 50ml LB-Medium (Kap. 3.1.2), das zur Induktion der Phagenkompetenz mit 0,2% Maltose und 10mM Magnesiumsulfat versetzt wurde, mit einer einzelnen Kolonie des Bakterienstamms *E. coli* XL1-Blue MRF' angeimpft und über Nacht bei 30°C im Schüttler inkubiert. 50ml einer 1:100 Verdünnung dieser Kultur wurden für weitere 2 bis 3h bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis die Zellen zu einer OD₆₀₀ von 1,0 herangewachsen sind. Für jede 15cm Platte sind 0,3ml dieser Bakterienkultur mit 0,3ml Medium verdünnt und in einem 1,5ml Gefäß mit etwa 5×10^4 pfu der Genbank versetzt worden. Die Zellsuspensionen wurden für 15min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 8ml autoklaviertem und auf 48°C abgekühltem NZY Top-Agar (NZY-Medium, 0,7% Agar-Agar) kurz vermischt. Der Top-Agar ist sofort auf eine NZY Agar-Platte gegossen worden. Bei einer Komplexität der verwendeten genomischen DNA-Genbank von etwa 1×10^6 Klonen wurden 20 15cm-Platten mit je 5×10^4 pfu ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Schließlich wurde die Phagen-DNA auf Nitrocellulose-Filter transferiert (Kap. 3.13.3) und hybridisiert (Kap. 3.14.2).

NZY-Medium: 0,5% Hefeextrakt, 1% Casein Hydrolysat, 0,5% Natriumchlorid, 0,2% Magnesiumsulfat-Heptahydrat

3.13 Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose- oder Nylonmembranen

3.13.1 DNA-Transfer mittels Southern-Blot-Methode

Das DNA-Agarosegel (Kap. 3.11.1) wurde für etwa 20min in 0,25M HCl geschwenkt, wobei die DNA unspezifisch in kleinere Fragmente gespalten wurde, damit sie sich anschließend besser transferieren ließ. Anschließend wurde das Gel zweimal 20min in Denaturierungslösung geschwenkt, wobei Doppelstrang-DNA in Einzelstrang-DNA überführt wurde. Schließlich ist das DNA-Agarosegel weitere zweimal 20min in Neutralisierungslösung geschwenkt und dann geblotet worden.

Kapillar-Blot

Beim Kapillar-Blot wird der Nukleinsäuretransfer durch eine gerichtete Ionenwanderung vollzogen. Dabei wurden zwei in 20x SSC getränkte Whatman-Papiere auf einen ebenen Untergrund gelegt, wobei deren Enden in 20x SSC-Puffer eintauchten. Luftblasenfrei wurde anschließend das Agarosegel aufgelegt, auf dessen 4 Seiten jeweils Streifen einer Plastikfolie gelegt wurden, um einen Flüssigkeitsstrom jenseits des Gels zu verhindern. Auf das Gel wurden nun nacheinander ebenfalls luftblasenfrei eine feuchte Nylon- oder Nitrocellulosemembran, 2 feuchte und 2 trockene Whatman-Papiere sowie ein Stapel trockener Papierhandtücher aufgetürmt. Schließlich wurde der Blot noch mit einem Gewicht von etwa 500g beschwert und über Nacht stehengelassen. Die Nukleinsäuren sind anschließend auf Nylonmembranen mit UV-Licht (150mJoule/cm²) und auf Nitrocellulosemembranen durch Erhitzen auf 80°C für 2h fixiert worden.

Vakuum-Blot

Beim Vakuum-Blot wird eine gerichtete Ionenwanderung durch Anlegen eines Vakuums unterhalb des Blot-Aufbaus ausgelöst. Hierzu wurde ein Vakuum-Blotter (Appligene) verwendet, auf dessen angefeuchtete Blot-Ebene zunächst ein feuchtes Whatman-Papier gelegt wurde. Darauf wurden nacheinander luftblasenfrei die feuchte Nylon- oder Nitrocellulosemembran, die der Gelgröße angepaßte Plastikmaske und das Gel aufgelegt. Die Apparatur wurde dicht verschlossen, und es wurde für die Dauer von 1h ein konstantes Vakuum von 45mbar/cm² eingestellt. Ferner wurde darauf geachtet, daß sich auf dem Gel immer ein Flüssigkeitsfilm mit 20x SSC befand. Die Nukleinsäuren sind anschließend wie bereits beim Kapillar-Blot beschrieben fixiert worden.

Denaturierungslösung: 1M Natriumhydroxid

Neutralisierungslösung: 1M Tris/HCl, pH 6,0

20x SSC: 3M Natriumchlorid, 0,3M Natriumcitrat

3.13.2 RNA-Transfer mittels Northern-Blot-Methode

RNA-Agarosegele (Kap. 3.11.3) wurden mit der Kapillar-Blot-Methode (Kap. 3.13.1) 2 Tage auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Aufgrund des hohen Formaldehyd-Anteils im Gel wurde der Blot unter einem Abzug aufgebaut.

3.13.3 Transfer von Phagen-DNA

Der Transfer von Phagen-DNA wird bei der Durchmusterung einer Genbank (Kap. 3.12) eingesetzt. Ein Phagenplaque enthält neben den Phagenpartikeln freie Phagen-DNA, die durch direkten Kontakt auf einen Nitrocellulosefilter übertragen werden kann. Gemäß diesem Übertragungsprinzip wurden auf die einzelnen Platten einer ausplattierten Genbank (Kap. 3.12) nacheinander zwei trockene Nitrocellulose-Rundfilter luftblasenfrei aufgelegt. Der erste Filter wurde nach 2min, der zweite nach etwa 4min wieder abgenommen. Die Lage der Filter wurde durch 4 wahllose Einstiche mittels einer Kanüle und entsprechenden Markierungen auf der Rückseite der Agar-Platten sowie durch eine weitere Markierung am Rand der Platten und der Filter fixiert. Danach wurden die Filter für 2min in Denaturierungslösung, für weitere 5min in Neutralisierungslösung und abschließend für 30sek in Pufferlösung eingelegt. Schließlich sind die Nitrocellulose-Rundfilter auf Filterpapieren getrocknet und für 2h bei 80°C erhitzt worden.

Denaturierungslösung: 1,5M Natriumchlorid, 0,5M Natriumhydroxid

Neutralisierungslösung: 1,5M Natriumchlorid, 0,5M Tris/HCl, pH 5,6

Pufferlösung: 2x SSC (Kap. 3.13.1), 0,2M Tris/HCl, pH 7,5

3.14 Spezifische Detektion von Nukleinsäuren durch Hybridisierung

Mit dieser Methode können zuvor auf Nylon- oder Nitrocellulosemembranen transferierte und fixierte Nukleinsäuren (Kap. 3.13) mit Hilfe markierter komplementärer DNA-Fragmente, die auch als „Sonden“ bezeichnet werden, spezifisch nachgewiesen werden.

3.14.1 Markierung von DNA-Fragmenten

Radioaktive Markierung

Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde das „Random Primers DNA Labeling System“ (Gibco) verwendet. Das Prinzip der DNA-Markierung beruht auf der Synthese eines komplementären DNA-Matrizenstranges mit Hilfe der Klenow-Polymerase und unter Verwendung radioaktiv markierter Nukleotide (Feinberg und Vogelstein, 1983).

25ng des zu markierenden DNA-Fragments wurden in einem Volumen von 23 μ l Wasser für 5min bei 95°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis abgeschreckt. Dann wurden jeweils 2 μ l 0,5mM dATP, dGTP und dTTP sowie 15 μ l des mitgelieferten Puffers zugegeben, in dem sich auch die als Primer für die Klenow- Polymerase fungierenden Hexanukleotide befanden. Nach-

dem 5 μ l (50 μ Ci) [α -³²P] dCTP hinzugefügt worden sind, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μ l (3U) Klenow-Fragment gestartet. Nach 1,5h bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf eine mit TE-Puffer (Kap. 3.10.3) equilibrierte „Nick-Column“ (Sephadex G 50-Säule, Pharmacia Biotech) aufgetragen, mit 350 μ l TE-Puffer einlaufen lassen und mit weiteren 400 μ l TE-Puffer eluiert. Die Qualität der Markierung wurde mittels eines Geigerzählers abgeschätzt. Vor der Hybridisierung (Kap. 3.14.2) ist die markierte Probe ein weiteres Mal aufgekocht und abgeschreckt worden.

Digoxigenin-Markierung

Für die nichtradioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde das „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“ (Boehringer Mannheim) verwendet. Das Prinzip der DNA-Markierung beruht auf dem zufälligen Einbau Digoxigenin markierter Nucleotide bei der Synthese eines komplementären DNA- Matrizenstranges.

3 μ g DNA wurden in 16 μ l Wasser gelöst und für 10min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 4 μ l der „DIG-High Prime“ Lösung inkubierte der Ansatz über Nacht bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,8 μ l 0,5M EDTA (pH 8,0) gestoppt und die Qualität der Markierung mit den mitgelieferten Teststäbchen gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt.

3.14.2 Hybridisierung von Nucleinsäuren mit markierten DNA-Fragmenten

Hybridisierung von Nitrocellulosemembranen

Nachdem die Nucleinsäuren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und fixiert worden waren (Kap. 3.13), wurde die Hybridisierung mit einer spezifischen radioaktiv markierten Probe (Kap. 3.14.1) durchgeführt. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran zunächst über Nacht im Rollhybridisierungs-ofen (Hybaid) bei 42°C in 50ml Formamid-Hybridisierungslösung prähybridisiert. Anschließend sind 20ml Formamid-Hybridisierungslösung verworfen und die radioaktiv markierte Probe zugegeben worden, die zuvor 5min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis abgeschreckt wurde (Kap. 3.14.1). Nach Inkubation über Nacht bei 42°C im Rollhybridisierungs-ofen wurde die Membran zweimal 20min mit Waschpuffer 1 bei 42°C und zweimal 20min mit Waschpuffer 2 bei 50°C gewaschen. Temperatur, Dauer und Anzahl der letzten Waschschrirte variierten je nach Intensität des verbleibenden Signals auf dem Blot, das mit Hilfe eines Geigerzählers abgeschätzt wurde. Schließlich wurde der Blot in Cellophanfolie verpackt, in Klarsichtfolie eingeschweißt und zur Detektion (Kap. 3.14.3) in eine Filmkassette eingelegt.

Hybridisierung von Nylonmembranen

Die Hybridisierung von Nylonmembranen erfolgte in Anlehnung an die Hybridisierung von Nitrocellulosemembranen. Dabei wurde der Blot über Nacht bei 68°C in 50ml Nylon-Hybridisierungslösung prähybridisiert und nach Reduzierung des Volumens der Nylon-Hybridisierungslösung auf 30ml und Zugabe des radioaktiv oder Digoxigenin-markierten DNA-Fragments (Kap. 3.14.1) über Nacht bei 68°C hybridisiert. Anschließend ist die Membran zweimal 20min mit Waschpuffer 1 bei 68°C und zweimal 20min mit Waschpuffer 2 bei 68°C im Rollhybridisierungssofen gewaschen worden.

Hybridisierung mit ExpressHyb-Hybridisierungslösung

Die „ExpressHyb“ Hybridisierungslösung (Clontech) ermöglicht eine schnelle Hybridisierung und eine effektive Ablösung alter Hybridisierungsproben. Die Lösung ist für die Hybridisierung des MTN (Multiple Tissue Northern) Blots (Clontech) verwendet worden.

Nach 1h Prähybridisierung in einem 50ml Falcon-Röhrchen bei 65°C im Rollhybridisierungssofen mit 10ml ExpressHyb-Hybridisierungslösung inklusive 1mg Fischsperma-DNA, die zuvor mit einer feinen Kanüle geschert und für 5min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis abgeschreckt wurde, sind 25ng der radioaktiv markierten Probe (Kap. 3.14.1) zusammen mit 30µg gescherter humaner DNA und 150µg gescherter Fischsperma-DNA in 5x SSC zugegeben worden, die zuvor ebenfalls für 5min bei 95°C denaturiert, anschließend auf Eis abgeschreckt und dann für 30min bei 68°C inkubiert wurden. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 65°C statt. Der Blot wurde dann fünfmal 20min mit Waschpuffer 3 bei 65°C und anschließend zweimal 20min mit Waschpuffer 4 bei 55°C im Rollhybridisierungssofen gewaschen, bevor er in Cellophanfolie verpackt und in Klarsichtfolie eingeschweißt wurde, um ein Austrocknen zu vermeiden.

50x Denhardts Lösung: 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon, 2% BSA

Formamid-Hybridisierungslösung: 50% Formamid, 50mM Pipes (pH 6,5), 5x SSC (Kap. 3.13), 5x Denhardts Lösung, 200mg/l Hefe t-RNA (vorher in wenig deionisiertem Wasser 5min aufkochen und sofort auf Eis abschrecken)

Nylon-Hybridisierungslösung: 5x SSC, 0,1% Natriumlaurylsarkosin, 0,02% SDS, 1% Blockierreagenz beziehungsweise 1/10 Volumen Blockierlösung (10x Konzentrat aus „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“, Boehringer Mannheim, Kap. 3.14.1)

Waschpuffer 1: 2x SSC, 0,1% SDS

Waschpuffer 2: 0,1x SSC, 0,1% SDS

Waschpuffer 3: 2x SSC, 1% SDS

Waschpuffer 4: 0,1x SSC, 0,5% SDS

3.14.3 Detektion markierter DNA-Fragmente

Detektion Digoxigenin-markierter DNA-Fragmente

Die Detektion Digoxigenin-markierter DNA-Fragmente wurde mit dem „DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II“ (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Nach der Hybridisierung (Kap. 3.14.2) wurde der Blot für 1min in Waschpuffer und für 30min in 1x Blockierlösung geschwenkt. Anschließend ist in 1x Blockierlösung eine 1:10000-Verdünnung der kurz an zentrifugierten Anti-Digoxigenin Antikörperlösung hergestellt und der Blot für 30 min inkubiert worden. Es schlossen sich zwei Waschschrte für jeweils 15min mit Waschpuffer an. Schließlich wurde der Blot für 2min in Equilibrierungspuffer geschwenkt und mit 1ml/100cm² der Chemolumineszenz-Lösung CSPD überschichtet und mit Cellophanfolie abgedeckt. Nach 5min Inkubation wurde das CSPD abgetropft und die Membran in Cellophanfolie und in eine auf 37°C vorgewärmte Filmkassette gelegt, die dann für mehrere Minuten bei 37°C nach Auflegen eines Röntgenfilms, der anschließend entwickelt wurde, inkubierte.

Detektion radioaktiv markierter DNA-Fragmente

Für die Detektion radioaktiv markierter DNA-Fragmente wurde die in Cellophanfolie eingewickelte und in Klarsichtfolie eingeschweißte Membran (Kap. 3.14.2) in eine Filmkassette gelegt und entweder nach Auflegen eines Röntgenfilms bei -80°C oder nach Auflegen einer Phosphoimager-Belichtungsplatte (Fuji) bei 4°C für mehrere Stunden bis hin zu mehreren Tagen inkubiert. Der Röntgenfilm ist anschließend entwickelt und die Phosphoimager-Belichtungsplatte ist mit dem „Fujix Bas 2000 Phospho-Imager“ (Fuji) digitalisiert worden.

Maleinsäurepuffer: 0,15M Natriumchlorid, 0,1M Maleinsäure, pH 7,5

Waschpuffer: 0,3% Tween 20 in Maleinsäurepuffer

1x Blockierlösung: 1/10 Volumen 10x Blockierlösung in Maleinsäurepuffer

Equilibrierungspuffer: 0,1M Natriumchlorid, 0,1M Tris/HCl, pH 9,5

3.14.4 Abwaschen hybridisierter Proben

Abwaschen radioaktiv markierter DNA-Fragmente

Eine 0,5% SDS-Lösung wurde kurz aufgekocht, anschließend die Membran zugegeben und für 10 min unter ständigem Rühren inkubiert. Danach wurde der Blot kurz in 2x SSC (Kap. 3.13)

equilibriert und in Klarsichtfolie bis zur weiteren Verwendung eingeschweißt.

Abwaschen Digoxigenin-markierter DNA-Fragmente

Nach kurzem Waschen der Membran in deionisiertem Wasser wurde sie zweimal 15min bei 37°C in 0,2M Natriumchlorid/0,1% SDS inkubiert, anschließend in 2x SSC equilibriert und bis zur weiteren Verwendung in Klarsichtfolie eingeschweißt.

3.15 Isolierungsmethoden für Nukleinsäuren

3.15.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch Zentrifugation. Dazu wurde mit einer Kanüle ein Loch in den Boden eines 0,5ml Eppendorff-Reagenzgefäßes gestochen und mit wenig Glaswolle abgedichtet. Die DNA-Banden wurden dann aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in das Eppendorff-Reagenzgefäß gegeben. Das 0,5ml Gefäß wurde in ein 1,5ml Gefäß gestellt und für 5min bei 13200 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend ist die Lösung mit der isolierten DNA im 1,5ml Gefäß phenolisiert (Kap. 3.9.1) und mit Ethanol präzipitiert worden (Kap. 3.9.2).

3.15.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurde grundsätzlich ein alkalischer Aufschluß der Bakterien in Anwesenheit von RNase und Detergenz mit anschließendem Aussalzen der Proteine und der chromosomalen DNA verwendet.

Analytische Schnellpräparation

Etwa 1,5ml Übernachtskultur von Bakterien (Kap. 3.1.3) wurden für 1min bei 13200 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 0,2ml P1 aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurden 0,2ml P2 zugegeben, durchmischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 0,2ml P3 und vorsichtigem Mischen wurden die Proben für 5min bei 13200 Upm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA direkt durch Zugabe von Ethanol gefällt (Kap. 3.9.2).

Analytische Schnellpräparation in Microtiterplatten

Bei diesem Verfahren wurden 600µl Übernachtskulturen in 1,3ml Röhrchen in einem FACS-Ständer angesetzt (Kap. 3.1.3). Davon wurden dann 200µl in eine Microtiterplatte übertragen

und 10min bei 10000 x g zentrifugiert. Die Bakterien sind in 40 μ l P1 resuspendiert und nach Zugabe von 40 μ l P2 5min lang aufgeschlossen worden. Nach Vermischen der Lösung mit 40 μ l P3 ist die Microtiterplatte für 15min bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend auf eine neue Microtiterplatte übertragen worden. Mit je 150 μ l absoluten Ethanol und anschließendem Zentrifugieren bei 10000 x g für 30min ist die Plasmid- DNA dann gefällt und mit weiteren 200 μ l absoluten Ethanol gewaschen und schließlich bei 10000 x g für 15min zentrifugiert und an der Luft getrocknet worden. Die Plasmid-DNA ist zur Kontrolle gleich in der Microtiterplatte geschnitten worden (Kap. 3.17.1).

Präparative Plasmidisolierung

Die präparative Plasmidisolierung erfolgte mit JetStar Maxi- und [Midi-] Säulen (Genomed), basierend auf dem Prinzip der Anionenaustauscher-Säulenchromatographie. Dabei wurden 500ml [100ml] einer Übernachtskultur von Bakterien in einem 500ml [250ml] Zentrifugenröhrchen bei 3500 x g für 15min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde anschließend in 10ml [4ml] P1 resuspendiert. Der Ansatz ist in ein 50ml Falcon-Röhrchen übertragen worden. Danach wurde die Zellsuspension mit 10ml [4ml] P2 vermischt und für 5min inkubiert. Nach Zugabe von 10ml [4ml] P3 und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 20 min bei 13000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend auf eine Maxi- [Midi-] Säule gegeben, die zuvor mit 30ml [10ml] P4 equilibriert worden war. Die Säule wurde einmal mit 60ml [zweimal mit 10ml] P5 gewaschen. Schließlich wurde die Plasmid-DNA mit 15ml [5ml] P6 eluiert. Nach Zugabe von 0,7 Volumen -20°C kaltem Isopropanol zur Fällung der DNA ist der Ansatz für 30min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert worden. Das Präzipitat ist mit 10ml -20°C kalten absoluten Ethanol gewaschen und ein weiteres Mal für 15min bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert worden. Anschließend ist die Plasmid-DNA nach Trocknung an der Luft in 0,5ml [0,1ml] Wasser aufgenommen worden.

P1: 10mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A, 50mM Tris/HCl, pH 5,5

P2: 200mM Natriumhydroxid, 1% SDS

P3: 3M Kaliumacetat, pH 5,5

P4: 0,6M Natriumchlorid, 0,15% Triton-X-100, 0,1M Natriumacetat, pH 5,0

P5: 0,8M Natriumchlorid, 0,1M Natriumacetat, pH 5,0

P6: 1,25M Natriumchlorid, 0,1M Natriumacetat, pH 8,5

3.15.3 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Ramirez-Solis et. al. (1992). Dabei wurden Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS-d (Kap. 3.2.2) über Nacht bei 37°C in Lysispuffer inkubiert (50µl je Loch einer 96-Lochplatte beziehungsweise 2ml bei geernteten Zellen einer 75cm²-Zellkulturflasche). Es schlossen sich eine Phenolextraktion (Kap. 3.9.1) und eine Ethanolpräzipitation an (Kap. 3.9.2), wobei das Volumen der wäßrigen Lösung je Loch einer 96-Lochplatte auf 100µl erhöht wurde. Während der Phenolextraktion wurde die 96-Lochplatte mit einer Klebefolie verschlossen und geschüttelt. Dabei haben sich Bestandteile der Klebefolie durch das Phenol gelöst, wodurch die phenolische Phase anschließend zähflüssig wurde und somit die wäßrige Phase leicht abgenommen werden konnte.

Lysispuffer: 10mM EDTA, 10mM Natriumchlorid, 0,5% Natriumlaurylsarkosin, 1mg/ml Proteinase K (frisch), 10mM Tris/HCl, pH 7,5

3.16 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.16.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung bei 260nm

Da alle Nukleotide eine Pyrimidin- oder Purinbase besitzen, zeigen sie eine starke UV-Absorption im Bereich von 250 bis 280nm. Die Messung der Absorption wäßriger DNA- oder RNA-Lösungen bei 260nm (A_{260}) in einer Quarzküvette gegen Wasser als Referenz läßt näherungsweise folgende Beziehung zur Nukleinsäurekonzentration zu:

Nukleinsäurekonzentration ($\mu\text{g/ml}$) = Faktor \times A_{260} ,

wobei der Faktor bei Doppelstrang-DNA 50, bei Einzelstrang-RNA oder -DNA 40 und bei Oligonukleotiden 20 ist. Diese Angaben beziehen sich auf RNA-freie DNA beziehungsweise auf DNA-freie RNA. Als Verunreinigungen treten häufig auch Phenolreste oder Proteine auf, die stark bei 280 nm absorbieren (Kap. 3.5). Die Reinheit der Präparation läßt sich aus dem Quotienten von A_{260}/A_{280} abschätzen. Bei reinen Nukleinsäurepräparationen liegt der Wert des Quotienten zwischen 1,8 (reine DNA) und 2,0 (reine RNA).

3.16.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mit dieser Methode wurde die Konzentration sehr geringer DNA-Mengen abgeschätzt. Eine Verdünnung der zu bestimmenden DNA-Lösung, die beispielsweise für eine Ligation eingesetzt werden sollte (Kap. 3.18.1), wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.11.1) in ein

kleines Gel mit einem 10er Taschenkamm einwandern lassen. Nach kurzem Gellauf ist die DNA-Menge anhand der Stärke der Ethidiumbromid gefärbten Bande abgeschätzt worden, wobei 5ng DNA gerade noch sichtbar waren.

3.17 Enzymatische Reaktionen an DNA

3.17.1 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionen wurden nach den Angaben der Hersteller in den jeweils mitgelieferten Puffersystemen durchgeführt. In der Regel wurden für 1 μ g Plasmid-DNA 1 bis 2U, für genomische DNA mindestens 3U Endonuklease verwendet und für 0,5 bis 2h beziehungsweise bei genomischer DNA über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Volumen an zugesetztem Enzym betrug grundsätzlich nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens.

3.17.2 Abspaltung von 5'-Phosphatresten durch alkalische Phosphatase

Zur Verhinderung intramolekularer Religationen wurden vor der Ligation (Kap. 3.18.1) etwa 10 μ g linearisierte Plasmid-DNA für 30 min mit 1U alkalischer Phosphatase bei 37°C im Restriktionspuffer (Kap. 3.17.1) inkubiert. Zur Entfernung der alkalischen Phosphatase schlossen sich eine Phenolextraktion (Kap. 3.9.1) und eine Ethanolfällung an (Kap. 3.9.2).

3.17.3 Herstellen von glatten Enden an DNA-Fragmenten

Um Klonierungen von DNA-Fragmenten zu ermöglichen, deren Enden nicht mit denen des linearisierten Vektors übereinstimmen, werden die 3'-überhängenden Enden entfernt und die 5'-überhängenden Enden aufgefüllt, so daß man glatte DNA-Enden erhält. Zu diesem Zweck wurde die T4-DNA-Polymerase eingesetzt, die eine stark ausgeprägte 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt und somit den dargelegten Anforderungen gerecht wird.

Zu 20 μ l Restriktionsansatz (Kap. 3.17.1) wurde 1 μ l einer 400 μ M Desoxynukleotid-Stammlösung gegeben und die Reaktion mit 1,25U T4-DNA-Polymerase bei 16°C für 30min gestartet. Zur Entfernung der T4-DNA-Polymerase folgten eine Phenolextraktion (Kap. 3.9.1) und eine Ethanolfällung (Kap. 3.9.2).

3.17.4 3'-Polyadenylierung von DNA mittels terminaler Transferase

Die Polyadenylierung durch die terminale Transferase wurde durchgeführt, um bei der RACE-PCR (Kap. 3.10.3) einen Anlagerungspunkt für den äußersten 5'- Primer zu erhalten. Dazu wurden 10 μ l cDNA aus dem Ansatz einer reversen Transkription (Kap. 3.10.1) verwendet, der

zuvor von Oligonukleotiden befreit wurde (Kap. 3.9.3). Hinzu kamen $4\mu\text{l}$ des mitgelieferten 5x Puffers und $1,2\mu\text{l}$ der ebenfalls mitgelieferten 25mM Cobalt(II)-Chloridlösung sowie $4\mu\text{l}$ einer 1mM dATP-Lösung. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 10U der terminalen Transferase. Der Ansatz wurde bei 37°C für 8min inkubiert und anschließend durch Zugabe von $20\mu\text{l}$ 0,4M NaOH gestoppt. Nach einer weiteren Inkubation für 5min bei 37°C ist der Ansatz durch Zugabe von $20\mu\text{l}$ 1M Tris/HCl (pH 7,5) neutralisiert worden.

3.18 Klonierung von DNA

3.18.1 Ligation von DNA-Fragmenten

50ng linearisierter Vektor wurde mit 50ng DNA-Fragment zusammengegeben und in einem Gesamtansatz von $10\mu\text{l}$ mit $1\mu\text{l}$ des mitgelieferten 10x Puffers und mit 0,5U T4-DNA-Ligase mindestens 2h bei 16°C inkubiert.

3.18.2 Präparation transformationskompetenter Bakterien

50ml steriles LB-Medium wurde mit *E.coli* Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 280 Upm inkubiert (Kap. 3.1.3). Anschließend wurden 20ml der Übernachtskultur mit LB-Medium auf 1l verdünnt und bei 37°C und 280 Upm für 2 bis 3h inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5 bis 0,6 wurde die Zellsuspension für 30min in einem Eisbad abgekühlt und in zwei 500ml Zentrifugenröhrchen für 15min bei $2000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die beiden Zellpellets wurden auf Eis in 500ml und anschließend in 250ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert und jeweils für 15min bei $2000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Danach wurden die beiden Zellpellets in jeweils 20ml einer eiskalten 10%-igen Glycerinlösung resuspendiert und in zwei 50ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15min bei $4000 \times g$ und 4°C wurden beide Zellpellets in 1ml einer eiskalten 10%-igen Glycerinlösung resuspendiert und vereinigt. Schließlich wurden von den elektrokompetenten Zellen $80\mu\text{l}$ Aliquots in Eppendorff-Reagenzgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.18.3 Transformation durch Elektroporation

$3\mu\text{l}$ eines Ligationsansatzes (Kap. 3.18.1) wurden mit $80\mu\text{l}$ elektrokompetenter Bakterien vermischt (Kap. 3.18.2) und für 1min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine vorgekühlte Küvette mit 2mm Elektrodenabstand pipettiert und bei 2,5kV und 200Ω sowie $25\mu\text{F}$ elektroporiert. Die Halbwertszeit der Entladung lag dabei zwischen 4,7 und 5,2ms. Danach ist die Zellsuspension schnell in $450\mu\text{l}$ SOC-Medium überführt und für 30 bis 60min

bei 37°C geschüttelt worden. 50µl sowie der Rest der Zellsuspension sind auf zwei getrennten Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen worden (Kap. 3.1.2).

SOB-Medium: 0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 0,05% Natriumchlorid, 2,5mM Kaliumchlorid, 10mM Magnesiumchlorid

SOC-Medium: 20mM Glucose in SOB-Medium

3.19 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham). Dabei wird das Prinzip einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Kap. 3.10.2) mit einer zufälligen Abbruchreaktion durch Einbau eines spezifischen Didesoxynukleotids verfolgt. Bei dem verwendeten System sind die eingesetzten Primer 5'-fluoreszenzmarkiert und können nach Laseranregung auf dem Sequenzgel detektiert werden. Durch die Verwendung von 7-deaza-dGTP in den Ansätzen werden Kompressionsartefakte während der Auftrennung über Polyacrylamid-Harnstoffgele (Kap. 3.11.2) weitestgehend eliminiert.

2pmol 5'-fluoreszenzmarkierter Primer und 3µg Plasmid-DNA wurden in 19,6µl Wasser gelöst. Nach Zugabe von 1,4µl DMSO ist der Ansatz auf vier 4,5µl Aliquots verteilt und jeweils 1,5µl der mitgelieferten Reagenzien A, C, G und T zugegeben worden, in denen sich neben der Thermo Sequenase DNA Polymerase auch die Desoxynukleotide und jeweils eines der Didesoxynukleotide ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP befanden. Die Ansätze sind dann mit etwa 30µl Mineralöl überschichtet und die PCR mit folgendem Programm gestartet worden: (1) 2min, 94°C; (2) 15sek, 94°C; (3) 15sek, 50°C; (4) 30sek, 72°C; 30 Zyklen (2-4). Nach der PCR wurden zu jedem Ansatz 3µl Probenpuffer gegeben und anschließend die Gelelektrophorese über ein denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoffgel gestartet (Kap. 3.11.2).

3.20 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie wurde angewendet, um die Expression von Proteinen auf und in Säugerzellen nachweisen zu können.

3.20.1 Fixierung und Permeabilisierung

Um Proteine innerhalb von Säugerzellen nachweisen zu können, mußten sie fixiert und permeabilisiert werden. Die Fixierung erfolgte auf Eis durch Zugabe von 1 Volumen 5%

frisch angesetzten Paraformaldehyds zur Zellsuspension. Nach 15min Inkubation wurden die Zellen bei 600 x g für 1,5min zentrifugiert und in 900 μ l PBS-d (Kap. 3.2.2) resuspendiert. Die Permeabilisierung erfolgte für 5min durch Zugabe von 100 μ l 0,025% Digitonin. Nach Zentrifugation für 1,5min bei 600 x g wurden die Zellen in PBS-d aufgenommen und auf eine Microtiterplatte verteilt.

5% Paraformaldehyd: 1g Paraformaldehyd bei 60°C in 20ml PBS-d (Kap. 3.2.2) unter mehrmaligem Schwenken lösen (etwa 30min)

3.20.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde grundsätzlich in Microtiterplatten durchgeführt. Nach Zentrifugation der intakten (Kap. 3.2.2) oder permeabilisierten (Kap. 3.20.1) Zellen für 5min bei 300 x g und 4°C sind sie in 25 μ l Antikörperlösung (Kap. 2.10) für 30 bis 60min auf Eis inkubiert worden und nach Zugabe von 175 μ l PBS-d für 5min bei 300 x g und 4°C zentrifugiert worden. Nach einem weiteren Waschschrift mit 200 μ l PBS-d ist die Prozedur gegebenenfalls mit einem zweiten Antikörper (fluoreszenzmarkierter anti-Immunglobulin Antikörper) oder einer dritten Färbelösung (Biotin-markierter anti-Immunglobulin Antikörper und fluoreszenzmarkiertes Streptavidin) wiederholt worden. Zur Analyse sind die Zellen in 50 μ l PBS-d aufgenommen und in 1,3ml Röhrchen überführt worden.

3.20.3 Propidiumiodid-Färbung toter Zellen

Zur Gegenfärbung toter Zellen wurde unmittelbar vor der FACS-Analyse 1 μ g/ml Propidiumiodid zu der nicht fixierten Zellsuspension gegeben und die Zellen auf Eis gelagert. Tote Zellen zeigten anschließend in der FACS-Analyse eine erhöhte Fluoreszenz 3 im „FACScan“ (Becton-Dickinson).

3.20.4 Analyse

Die markierten Zellen wurden mit dem Durchflußzytometer „FACScan“ (Becton-Dickinson) gemessen und mit der PC-Version 3.0 des Programms „Winlist“ (Verity) analysiert.

3.21 Immunfluoreszenzfärbung von Säugetierzellen

3.21.1 Kultivierung

Die Zellen wurden wie in Kap. 3.2.2 beschrieben kultiviert und einen Tag vor der Immunfluoreszenzfärbung mit sehr geringer Konzentration in 6-Lochplatten auf Deckgläsern ausgesät. Die Deckgläser wurden zuvor auf der Oberseite mehrmals mit einem Fettstift umrandet.

3.21.2 Fixierung

Das Medium in den 6-Lochplatten wurde abgesaugt und die auf Deckgläsern adhärent gewachsenen Zellen dreimal mit PBS-d gewaschen (Kap. 3.2.2). Anschließend sind je Loch 1ml 5% Paraformaldehyd (Kap. 3.20.1) zugegeben und die Zellen für 15min auf Eis inkubiert worden, bevor sie dreimal mit PBS-d gewaschen wurden.

3.21.3 Permeabilisierung

Um intrazelluläre Proteine nachweisen zu können, sind die Zellen nach der Fixierung (Kap. 3.21.2) permeabilisiert worden. Dazu sind je Loch einer 6-Lochplatte 1ml 0,025% Digitonin oder 0,5% Triton-X-100 zugegeben und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert worden. Anschließend sind die Zellen dreimal mit PBS-d (Kap. 3.2.2) gewaschen worden.

3.21.4 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung fand nach Fixierung (Kap. 3.21.2) und gegebenenfalls Permeabilisierung (Kap. 3.21.3) in 6-Lochplatten statt. Dazu wurden nach Inkubation der Zellen für 1h in 1ml 5% Magermilchpulver in PBS-d (Kap. 3.2.2) 100 μ l Antikörperlösung (Kap. 2.10) auf die mit dem Fettstift umrandeten Deckgläser gegeben und für 1h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS-d gewaschen und die Prozedur mit einer zweiten Antikörperlösung (fluoreszenzmarkierter anti-Immunglobulin Antikörper) oder dritten Färbelösung (Biotin-markierter anti-Immunglobulin Antikörper und fluoreszenzmarkiertes Streptavidin) wiederholt.

3.21.5 Mikroskopie

Die Deckgläser sind nach der Immunfluoreszenzfärbung (Kap. 3.21.4) mit der Oberseite auf einen Objektträger mit 30 μ l Moviollösung fixiert und bei 37°C für mindestens 2h inkubiert worden. Anschließend fand die Auswertung an dem konfokalen Mikroskop DM IRBE (Leica) statt.

Moviollösung: 6g Glycerin, 2,4g Moviol, 12ml 0,2M Tris/HCl, pH 8,5, bei 50°C unter ständigem Rühren lösen

3.22 Migrationsexperimente

Migrationsexperimente wurden mit Jurkat-Zellen in Transwell-Migrationskammern (6,5mm Transwell-Einsätze mit 5µm Porendurchmesser, Costar) durchgeführt. Die Transwell-Einsätze wurden in 24-Lochplatten in 500µl Collagenlösung bei 4°C über Nacht inkubiert, am folgenden Tag zweimal mit 0,5ml PBS-d gewaschen (Kap. 3.2.2) und an der Luft getrocknet. Jurkat-Zellen wurden über Nacht in S-Medium (Kap. 3.2.2) mit 1% FKS gehalten. Anschließend wurden sie für 5min bei 300 x g zentrifugiert, in Migrationsmedium resuspendiert und gezählt (Kap. 3.2.8). Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml mit Resuspensionspuffer eingestellt. Der entsprechende Stimulus wurde in Migrationspuffer gelöst und 450µl je Loch einer 24-Lochplatte zugegeben. Die Transwell-Einsätze wurden dann eingehängt und unmittelbar danach 100µl Zellsuspension je Transwell-Einsatz zugegeben. Die Migration fand für 4h bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ statt. Schließlich wurden die Transwell-Einsätze ausgehängt, 400µl je Loch der 24-Lochplatte entnommen, für 1,5min bei 600 x g zentrifugiert und 350µl des Überstands verworfen. Die Zellen wurden in den restlichen 50µl resuspendiert, in 1,3ml Röhrchen überführt und am Durchflußzytometer „FACScan“ (Becton-Dickinson) für jeweils 1min ausgezählt.

Collagenlösung: 20µg/ml Collagen in 0,05M HCl

Migrationsmedium: 500ml RPMI 1640, 5ml 200mM L-Glutamin, 5ml 100x Stammlösung Penicillin/Streptomycin, 0,1% lipidfreies BSA, 25mM HEPES, pH 7,3

3.23 Luziferase-Assay

Für die Detektion der Elk-1-abhängigen Transkription wurde das „PathDetect *in vivo* signal transduction pathway reporting system“ (Stratagene) und das „Dual-Luciferase reporter assay system“ (Promega) verwendet. CHO-K1-Zellen wurden in 6-Lochplatten ausgesät (Kap. 3.2.2) und am folgenden Tag mit 50ng des Fusionsaktivatorplasmids pFA-Elk, 500ng des Firefly-Luziferase-Reporter-Vektors pFR-Luc, 100ng des *Renilla*-Luziferase-Kontroll-Reporter-Vektors und 50ng eines der Plasmide pcDNA3.1(+) oder pcDNA3.1(+) inklusive des inklonierten humanen EDG6-Rezeptors oder des humanen EDG1-Rezeptors kotransfiziert (Kap. 3.4.1). Nach 30

bis 40h wurden die Zellen mit PBS-d gewaschen und serumfreies Medium zugegeben (Kap. 3.2.2). Nach weiteren 2h wurden die Zellen stimuliert und für weitere 6h inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt, und die Zellen wurden in 300 μ l des passiven Lysepuffers für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lumineszenz von 20 μ l Aliquots wurde mit dem Luminat LB 9507 (Berthold) für 10sek nach Injektion von 50 μ l des Luziferase Assay Puffers II sowie des Stop & Glo Puffers gemessen.

3.24 Calcium-Assay

Die intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration wurde mit dem Calciumchelator „Fura 2/AM“ (Calbiochem) bestimmt, der membrangängig ist und in die Zellen eindringen kann, intrazellulär aber von Esterasen modifiziert wird und dadurch nicht mehr entweichen kann.

Die Zellen wurden geerntet (Kap. 3.2.2), zweimal mit HBSS gewaschen und für 5min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurden sie gezählt (Kap. 3.2.8) und mit HBSS auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Der Calciumchelator „Fura 2/AM“ ist in der Endkonzentration von 1 μ M zugegeben und die Zellen sind für 30min bei 37°C beladen worden. Danach wurden sie zweimal mit HBSS gewaschen und mit HBSS inklusive 1mM Calcium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Sie sind möglichst bald mit dem Spectrofluorophotometer RF-1502 (Shimadzu) bei 37°C in einer 3ml Quarzküvette vermessen worden, wobei sie zwischen den Messungen auf Eis gelagert und vor jeder Messung für 5min bei 37°C inkubiert wurden. Der Stimulus konnte dabei während der Messung mit Hilfe einer Hamilton-Spritze unter ständigem Rühren der Zellsuspension zugegeben werden. Während der Calciumchelator „Fura 2/AM“ mit Licht der Wellenlänge 510nm angeregt wurde, ist gleichzeitig die Extinktion bei 380nm (geringe Calciumkonzentration) und 340nm (hohe Calciumkonzentration) gemessen worden.

HBSS: 137mM Natriumchlorid, 5,4mM Kaliumchlorid, 0,4mM Kaliumdihydrogenphosphat, 0,3mM Natriumhydrogenphosphat, 4,2mM Natriumhydrogencarbonat, 0,5mM Magnesiumchlorid, 0,6mM Magnesiumsulfat, 5,6mM D-Glucose

3.25 Datenverarbeitung

Für Datenbank-Recherchen, Sequenzvergleiche und Strukturvorhersagen ist das HUSAR-Paket Version 6.0 des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg in Verbindung mit den jeweils aktuell verfügbaren Protein- und Nukleinsäuredatenbanken verwendet worden.

