

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien

4.1.1. Bakterienstämme

DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ -(<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>), ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galK</i> , λ^- , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Invitrogen)
SCS-pSE111	<i>Rec A1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_{Km_K}^+$), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> (Stratagene) enthält Plasmid pSE111 mit <i>lacI^q</i> Repressorgen und <i>argU</i> Gen für die seltene Arginin-tRNA (Buessow et al., 1998)

4.1.2. Zelllinien

COS-1	Fibroblasten-ähnliche Zellen, die in adhärennten Monolayern wachsen; Nierenzellen des afrikanischen grünen Affen, transformiert mit einer Replikationsursprungs-defekten Mutante von SV-40, Wirtszelle für die Vermehrung von rekombinanten SV-Viren (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)
-------	--

4.1.3. Plasmidvektoren

pBluescript	Klonierungsvektor der Firma Stratagene mit ColE1 Replikationsursprung zur Replikation in <i>E. coli</i> ; β -Lactamasegen, T7- und T3-Promotoren sowie <i>lacZ</i> -Gen zum Durchmustern von Transformanten nach Blau/Weiß-Kriterium; auch als Träger-DNA bei der Transfektion von Säugetierzellen verwendet
-------------	--

pTL-HA (1, 2, 3)	Derivat des Vektors pSG5 mit einem frühen SV 40 Promotor für die Proteinexpression <i>in vivo</i> und einem T7 Promotor für die <i>in vitro</i> Expression (Stratagene). Veränderung durch Einführung einer größeren multiplen Klonierungstelle mit Erkennungsstellen für <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> , <i>HindIII</i> , <i>XhoI</i> , <i>NotI</i> , <i>SmaI</i> , <i>PstI</i> , <i>SacI</i> , <i>KpnI</i> und <i>BglII</i> . Aufwärts von der Klonierungstelle (MCS) wurde die Kodierungssequenz für das HA-Epitop eingefügt. Dies erlaubt die Detektion von exprimierten HA-Fusionsproteinen in drei verschiedenen Leserahmen HA 1, 2, 3 mit dem monoklonalen HA-Antikörper.
pQE 30, 31, 32	Auf pBR322 basierende Expressionsvektoren mit starken Phagen T5 Promotor und zwei <i>lac</i> -Operatorsequenzen für IPTG-induzierbare Expression rekombinanter Proteine mit N-terminalen His ₆ -Epitop (Qiagen) in allen drei Leserahmen.
pGEX-6P-1, 2, 3	Glutathion S-Transferase (GST) Fusionsvektoren mit synthetischem <i>tac</i> -Promotor für die IPTG-induzierbare Expression von GST-Fusionsproteinen; enthalten ist ein internes <i>lacI</i> ^q Repressorgen für die Repression der Expression in jedem <i>E. coli</i> Stamm. Fusionsproteine enthalten nach der GST-Proteinsequenz eine Erkennungsstelle für die <i>PreSission</i> \hat{O} Protease, die die Abspaltung des GST-Epitops ermöglicht (Amersham Pharmacia Biotech-Europe GmbH).
pEGFP-C1, pYEGFP-C1	Green Fluorescence Protein (GFP) Fusionsvektor für Expression und Lokalisation von Proteinen in Säugetierzellen. Die zu exprimierende Sequenz wird in die multiple Klonierungsstelle dieser Vektoren stromaufwärts der GFP-Sequenz inseriert und als C-terminales GFP Fusionsprotein exprimiert. Der Promotor ist CMV IE, mit pUC ori als Replikationsursprung zur Replikation in <i>E. coli</i> und SV40 ori Replikationsursprung zur Replikation in Säugetierzellen. Die Selektion in Prokaryonten ist mit Kanamycin, die in Eukaryonten mit Neomycin (G418) möglich. (Clontech)

pUC 19	Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenz, <i>lac Z</i> , und Polylinker, High copy origin 867
--------	---

4.1.4. Medien und Puffer

4.1.4.1. Mikrobiologische Medien und Standardpuffer

0,5x TBE	0,001 M EDTA, 0,045 M Tris-Borat pH 8.0
10x DNA-Probenpuffer	0,42% Bromphenolblau, 0,42% Xylencyanol, 25% Ficoll Typ 400, in aqua bidest, lagern bei 4 °C
10x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l aqua bidest
10x PCR-Puffer	2 M KCl, 10% TWEEN 20, 1 M MgCl ₂ , 0,1 M Cresolrot, 1 M Tris-base pH 10,4, 1 M Tris-HCl pH 4.8
10x <i>PreSission</i> TM Protease-Puffer	0,5 M Tris-HCl pH 7,0, 1.5 M NaCl, 10 mM EDTA, autoklaviert
2% Paraformaldehyd	2% Paraformaldehyd in PBS bei 60 °C lösen, steril filtrieren und begrenzt bei -20 °C lagern
25x Proteaseinhibitoren	C@plete TM mini EDTA-free, 1 Tablette in 2 ml aqua bidest
2M CaCl ₂ für die Transfektion	Steril filtriert
2x HBS für die Transfektion	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,1, steril filtriert
Coomassie-Blau-Färbelösung	50% Methanol, 9,2% Essigsäure, 0,179% Coomassie Brilliant Blau G250, 2h gerührt und durch einen Faltenfilter filtriert, bei Raumtemperatur zu lagern, wieder verwertbar
Entfärbelösung für Coomassie-Blau-gefärbte SDS-Gele	7% Essigsäure, 20% Methanol
Fixierer für SDS-Gele	10% Essigsäure und 45% Methanol

GST-P1-Puffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 5 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefe Extrakt, 10 g NaCl, ad 1 l aqua bidest, für Agarplatten 2% Agar zusetzen
Lysispuffer für Säugetierzellen	50 mM Tris-HCl pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,5% NP-40, 1 mM EDTA
Montagemedium	5% Propylgallat, 25% Glycerin (für Mikroskope), in PBS
SOB ⁻ -Medium	20 g Trypton, 5 g Hefe Extrakt, 0,584 g NaCl, 0,186 g KCl, ad 1 l aqua bidest
T-PBS	PBS mit 0,05% Triton X-100
TBS	20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl
TBS-T	20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,01% Triton
TE	10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA
TE für die Transfektion	1 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM EDTA, steril filtriert
TY-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefe Extrakt, 5 g NaCl, ad 1 l aqua bidest
Westernblot-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 8,0, 192 mM Glycin, 20% Methanol

4.1.4.2. Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), mit Natriumpyruvat und Pyridoxin (Life Technologies);

Fötales Kälberserum aus Südamerika (Life Technologies);

PBS (Life Technologies);

10000 Einheiten/ml Penicillin G und 10000 µg/ml Streptomycinsulfat in 0,85% Saline (Life Technologies);

0,25% (w/v) Trypsin/ 1 mM EDTA in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Life Technologies).

4.1.5. Oligonukleotide

Name:	5'-Sequenz-3':	Funktion:
PGEX5-forward	TATAGCATGGCCTTTGCAGG	Sequenzierprimer für alle pGEX-Vektoren, forward
PGEX5-reverse	TGTCAGAGGTTTTACCGTC	Sequenzierprimer für alle pGEX-Vektoren, reverse
PSG5-forward -90	TCTGCTAACCATGTTTCATGCC	Sequenzierprimer für pTL-Vektoren, forward, 90 Basen vor der MCS
PSG5-reverse -90	GGACAAACCACAACCTAGAATG	Sequenzierprimer für pTL-Vektoren, reverse, 90 Basen nach der MCS
N-OCT 3- <i>KpnI</i>	CCGCATGGGGTCACTGGACGG GCGTCTGCA	3'Primer zur Aufamplifizierung von N-OCT3 mit <i>KpnI</i> -Restriktionsschnittstelle
<i>SalI</i> -N-OCT3	GGACGCGTCGACCATGGCGAC CG	5'Primer zur Aufamplifizierung von N-OCT3 mit <i>SalI</i> -Restriktionsschnittstelle
<i>SalI</i> -PQBP 1	GGACGCGTCGACCATGCCGCT GC	5'Primer zur Aufamplifizierung von PQBP-1 mit <i>SalI</i> -Restriktionsschnittstelle
PQBP 1- <i>NotI</i>	ATAGTTAGCGGCCGCTCAATC CTGCTGCTTGGT	3'Primer zur Aufamplifizierung von PQBP-1 mit <i>NotI</i> -Restriktionsschnittstelle
PEGFP-C1 Sequenzier- primer	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGGT G	Sequenzierprimer für pEGFP-C1-Vektoren, forward

FLAG-Sense	GATCACATATGGACTACAAGG ACGACGATGACAAGTCGGGAT CCGG	Adapter zur Einführung FLAG-Epitops in pGEX-6P-1
FLAG-Antisense	AATTCCGGATCCCGACTTGTC TCGTCGTCCTTGTAGTCCATAT GT	Adapter zur Einführung FLAG-Epitops in pGEX-6P-1
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierprimer für T7 Promotor
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	Sequenzierprimer für T3 Promotor

Die aufgelisteten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der MPI Servicegruppe synthetisiert.

4.1.6. Antikörper

Primäre Antikörper:	Spezies:	Herkunft:
Anti-RGS-His	Maus	Qiagen
Anti-Huntingtin (CAG53b), Anti-CAG-Antikörper, (gegen GST-Hdex1 53CAG), polyklonaler Antikörper	Kaninchen	Eigene Herstellung, E. Scherzinger
Anti-Huntingtin (AGG), Anti-AGG-Antikörper, (gegen GST-Hdex1 53CAG Aggregate), polyklonaler Antikörper	Kaninchen	Eigene Herstellung, E. Scherzinger
Anti-Huntingtin (HD1), Anti-HD1-Antikörper, (gegen His-Hdex1 53CAG), polyklonaler Antikörper	Kaninchen	Eigene Herstellung, Dr. Scherzinger
Anti-FLAG, monoklonaler Antikörper	Maus	Sigma-Aldrich
Anti-FLAG, polyklonaler Antikörper	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Anti- <i>myc</i> , monoklonaler Antikörper	Maus	Roche
Anti- <i>myc</i> , monoklonaler Antikörper	Maus	Babco
Anti- <i>myc</i> , polyklonaler Antikörper	Kaninchen	Clontech
Anti-Brn-2, polyklonaler Antikörper	Ziege	Santa Cruz

Anti-PQBP 1, polyklonaler Antikörper	Kaninchen	Geschenk von S. Okazawa
Anti-HA, Monoclonal HA 11 MMS-101R (benutzt bei der Immunofluoreszenz und im Westernblot), monoklonaler Antikörper	Maus	Babco
Anti-HA, Monoclonal HA 12CA5 (benutzt beim Filtertest und im Westernblot), monoklonaler Antikörper	Maus	Roche Diagnostics GmbH
Anti-GFP, polyklonaler Antikörper	Kaninchen	Clontech

Sekundäre Antikörper	Konjugat	Spezies	Herkunft
Anti-Kaninchen IgG	Cy3 oder FITC	Esel	Jackson ImmunoResearch
Anti-Kaninchen IgG	Peroxidase	Fab 2 Fragmente	Roche Diagnostics GmbH
Anti-Kaninchen IgG	Kolloidales Gold, 5 oder 10 nm	Ziege	British BioCell
Anti-Maus IgG	Cy3 oder FITC	Esel	Jackson ImmunoResearch
Anti-Maus IgG	Peroxidase	Fab 2 Fragmente	Roche Diagnostics GmbH
Anti-Maus IgG	Kolloidales Gold, 5 oder 10 nm	Ziege	British BioCell
Monoklonaler Anti-Ziege/Schaf IgG Klon GT-34	Peroxidase	Maus	Sigma-Aldrich

4.1.7. Enzyme, Proteine, und DNA

1kb DNA Marker	Invitrogen
Albumin aus Rinderserum, Fraktion V, BSA	Sigma-Aldrich
AmpliTaq DNA-Polymerase FS zur Sequenzierung	Perkin Elmer
Benzonase	Merck Eurolab GmbH
Broad Molekular Weight Marker	Roche Diagnostics GmbH
Calpain Inhibitor I (N-Acetyl-Leu-Leu-norleucinal), ALLN	Roche Diagnostics GmbH
CIP (calf instestine phosphatase)	NEB
Expand TM Long Template PCR System, Mischung aus thermostabilen Taq und Pwo DNA-Polymerasen für die Amplifizierung von DNA-Sequenzen mit hohem GC-Anteil	Roche Diagnostics GmbH
Heringssperm-DNA	Clontech
Lysozym	Sigma-Aldrich
pBluescript	Stratagene
pGEX	Amersham Pharmacia Biotech
pQE	Qiagen
Alle Restriktionsenzyme, bis auf <i>XhoI</i>	New England Biolab
T4-DNA-Ligase	New England Biolab
Trypsin	Invitrogen
<i>XhoI</i>	Roche Diagnostics GmbH

4.1.8. Chemikalien und Säulenmaterialien

2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma- Aldrich
2-Propanol	Merck Eurolab GmbH
3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure (MOPS)	Sigma- Aldrich
30% Acrylamid, 0,8%Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
Agarose	Invitrogen

Ammoniumpersulfat	BioRad
Ampicillin-Trihydrat	Sigma-Aldrich
<i>Bis</i> -Benzimid (DAPI)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck Eurolab GmbH
Calciumchlorid Dihydrat	Merck Eurolab GmbH
Chloroform	Merck Eurolab GmbH
Cresolrot (<i>m</i> -Cresolsulfonphthalein)	Sigma
Cyan Blau	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Essigsäure	Merck Eurolab GmbH
Ethanol, absolut	Merck Eurolab GmbH
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck Eurolab GmbH
Glutathion-Agarose	Sigma-Aldrich
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich
Glycerin, wasserfrei	Merck Eurolab GmbH
Imidazol	Sigma-Aldrich
Isoamylalkohol	Merck Eurolab GmbH
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Sigma-Aldrich
Kanamycin A Monosulfat	Sigma-Aldrich
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
Natriumazid	Merck Eurolab GmbH
Natriumfluorid	Merck Eurolab GmbH
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
<i>p-t</i> -Octylphenyl-polyoxyethylen (Triton X-100)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat (TWEEN 20)	Sigma-Aldrich
Ponceau S Lösung	Merck Eurolab GmbH

Propylgallat	Sigma-Aldrich
Serva Blau G	Serva
TEMED	Life Technologies
Thiamin, Vitamin B1	Sigma-Aldrich
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
TWEEN 20 (Polyethylene-Sorbitan Monolaureat	Sigma-Aldrich
Xylencyanol FF	Serva

Alle anorganischen Salze, Säuren, Basen, Lösungsmittel und Alkohole waren "pro analysis" Qualität von Merck Eurolab GmbH.

4.1.9. Kits

ABI PRISM™ Dye Terminator, Cycle Sequencing Ready reaction Kit	Perkin Elmer
Bradford Proteinassay Kit	BioRad
Expand™ Long Template PCR System	Roche Diagnostics GmbH
Lipofectin® Reagenz	Gibco BRL, Life Technologies
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Western Blot Chemiluminescence Reagenz Plus	NEN™ Life Science Products

4.1.10. Laborausstattung, Geräte und Zubehör

Agarosegelkammer (Flachbett)	Amersham Pharmacia Biotech-Europe GmbH und Eigenbau der MPI Werkstätten
Airfuge	Beckmann

Analysenwaage AT 250	Mettler Analytik
Ausstattung für SDS-Gelelektrophorese und Blotten von Gelen	Protean II System von BioRad
Autoklav GE 666 AC-1	Getinge
Beckmann J6-HC (Rotor: JS-4.2)	Beckmann
Biacore 2000	Biacore AB
Brutschränke	Heraeus
CD Spektren	Jasco J715 Spectropolarimeter, water jacketed
Celluloseacetatmembran (0,2 µM)	Schleicher und Schüll
Dialysefilter (0,025 mM)	Millipore
Dialyseschläuche, Molekulargewichtsausschlussgröße 3500 DA	Spectra/Por
Durchlichtscanner, Epson GT-700 Photo	Seiko Epson Corporation
Einmal-Impfösen	Nunc
Einweg-Säulen, 1,6 cm im Durchmesser	Qiagen
Einweg-Skalpell	Braun
Elektroporationskuvetten	BioRad
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa
Flourenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss
Glasplatten	Eigenbau der MPI Werkstätten
Heizblock	Eppendorf
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific
Kanülen, 20G	Becton-Dickinson
Kryo Einfrierkontainer	Nalgene
Kunststoffküvetten	Sarstedt
Laborhandschuhe	Latech

Magnetrührer	IKA-Combimag-REO
Mikrotiterplatten	Genetix
Mikrowelle	AEG
Nitrocellulose Membran (0,2 µM)	Schleicher und Schüll
Objekträger, Deckgläschen	Brand
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Maschine PTC-200	MJ Research
Petrischalen (Ø 60, 100, 145 mM) für Mikrobiologie	Nerbe plus GmbH
Petrischalen (Ø 60, 100, 145 mM) für Zellkultur	Greiner bio-one
PH-Meter	Radiometer Kopenhagen
Pipetboy	Hirschmann
Pipetten, einstellbar	Gilson
Pipettenspitzen	Gilson
Plastikplättchen (Ø 13 mM)	Thermanox
Power Supply	Pharmacia Biotech und Werkstätten des MPI
Präzisionswaage PM 3000	Mettler
Quarzglasküvetten	Hellmer
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme X-OMAT AR	Kodak
Saran Verpackungsfolie Schüttler (Rocky)	The Dow Chemical CTF Labortechnik Scientific
Sorvall Super T21	Sorvall
Sorvall Superspeed RC2-b (Rotoren: GSA, SS34)	Sorvall
SpeedVac SC110	Savant
Spektral Photometer Ultraspec 3000	Amersham Pharmacia Biotech-Europe GmbH
Spritzen 1, 5, 50 ml	Once

Sterile Pipetten	Beckton-Dickmann
Thermocycler für Sequenzierung	ABI
Tiefkühler, -20 °C	Bosch
Tiefkühler, -80 °C	ReCon
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Tischzentrifuge Z361	Hermle
Ultrastab Homogenisierer W250	Branson
UV-Tisch (365 nm)	Vilbert Lourmant
UV-Transilluminator mit Videokamera	Herolab
Vortex	Scientific Industries
Wasserbad	Haake S
Wasserbadschüttler	New Brunswick
Whatman Papier, 3 MM Chr	Whatman
Zellelektroporator Gene Pulser II	BioRad
Zellenkratzer	Costar
Zellkulturflaschen 75 mm ²	Biochrom

4.1.11. Computerprogramme

AIDA 1.0, (AIDA, Deutschland)

Corel Draw (PC, Corel Cooperation, USA)

Endnote 4.0 (ISI ResearchSoft)

Microsoft Office (PC, Microsoft Deutschland)

Photoshop 7.0 (Windows, Adobe Systems, USA)

4.1.12. Benutzte Internetadressen

Primerdesign:	http://alces.med.umn.edu/rawprimer.html
	http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/manip/index.html
	http://srs.ebi.ac.uk/
	http://www.invitrogen.com/catalog_project/cat_primer.html
	http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/Blast/blast.html
Berechnung der Proteinparameter:	http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam
Translation von DNA-Sequenz in die Proteinsequenz:	http://www.expasy.ch/tools/dna.html
	http://www2.ebi.ac.uk/translate/
Allgemeine Adresse für Molekularbiologische Seiten:	http://alces.med.umn.edu/VGC.html
Vergleich von DNA-bzw. Proteinsequenzen:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
	http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/
Proteinstrukturanalyse:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/
	http://gdbwww.gdb.org/
	http://www.uib.no/aasland/SeqTools.html
Allgemein Proteindatenbank:	http://www.expasy.ch/
Literatursuche:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/
Analyse von Restriktionserkennungsstellen:	http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html
	http://www.expasy.ch/cgi-bin/sprot-search-ful
Literaturmeldeservice	http://molbiol.edu.ru/cgi-bin/biomail/users.pl

4.2. Methoden

Sofern nicht explizit erwähnt, wurden alle experimentellen Techniken gemäß den Ausführungen von Sambrook et al. (1998) durchgeführt.

4.2.1. Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1. DNA-Plasmidproduktion und -präparation

Die Plasmidpräparation erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit bzw. dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit entsprechend der Vorschrift des Herstellers. Die Zellen wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die DNA über Absorptionschromatographie an einer Silicamembran (QIAprep Spin Miniprep Kit) bzw. Anionenaustauscherchromatographie (QIAfilter Plasmid Maxi Kit) gereinigt. Für die Plasmidproduktion wurden die entsprechenden Kolonien auf 5 ml bzw. 250 ml LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C bei 100 rpm inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 14000g für 1 min bzw. 4000g für 15 min geerntet und die Plasmid-DNA entsprechend der Vorschrift des Herstellers gereinigt. Mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit wurden Plasmid-Präparationen mit einer Konzentration von 0,2 mg/ml DNA gereinigt. Maxi Plasmid-Präparationen wurden auf eine DNA-Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

4.2.1.2. Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration wäßriger DNA-Lösungen wurde photometrisch durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Basen der Nukleinsäuren haben bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum. Eine Absorption (A_{260}) von 1,0 entsprach einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA. Ist der Quotient $A_{260}/A_{280} = 2$ gilt die DNA-Lösung als rein.

4.2.1.3. Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsenzyme wurden in den Reaktionspuffern und in der Konzentration nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden 1-2h inkubiert. Die Reaktion wurde gegebenenfalls durch Zugabe von 10x DNA-Probenpuffer gestoppt und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

4.2.1.4. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Um die Religation eines Vektors zu verhindern, wurden die DNA 5'-Phosphatester hydrolysiert. Der Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 10 µl 10x CIP-Puffer, 1U Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) und 5-10 µg DNA. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz durch Erhitzen auf 65-70 °C für 10-15 min inaktiviert oder sofort mit dem QIAquick PCR Purification Kit gereinigt.

4.2.1.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Beim QIAquick PCR Purification Kit kann Einzel- und Doppelstrang-DNA von 100 bp-10 kb von Nukleotiden, Enzymen und Salzen getrennt werden. Der Reaktionsansatz wurde nach Anweisung des Herstellers gereinigt und mit 50 µl 10 mM Tris pH 8.0 eluiert.

4.2.1.6. DNA-Agarose-Gelelektrophorese

In einem horizontalen Agarosegel konnten DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Agarose-Konzentration variierte nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0,8-1,5% (w/v). Die Gele enthielten 0,5 g/ml Ethidiumbromid zur Anfärbung der DNA. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet.

4.2.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor mit identischen kohäsiven Enden zu ligieren, wurden Fragment und Vektor in einem molaren Verhältnis von ungefähr 3:1 gemischt. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 400U *T4-Ligase*, einmal Ligasepuffer und insgesamt 1 µg DNA. Zur Kontrolle wurde der Vektor ohne Insert ligiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C, oder bei Raumtemperatur für 45 min. Die Ligationsansätze wurden 30-60 min auf Dialysefilter (0,025 µm Porengröße), gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Von beiden Ansätzen wurden je 0,3 µg DNA elektrisch in *E. coli* Zellen transformiert.

4.2.1.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR) wurde die DNA, die als Vorlage dient, das sogenannte „template“, bei hoher Temperatur 0,5-5 min denaturiert, so dass die DNA einzelsträngig vorliegt. Synthetische Oligonukleotide, deren Sequenzen komplementär zur Vorlage waren konnten dann an das „template“ binden und

so einen Startpunkt für eine temperaturstabile *DNA*-Polymerase bilden, die einen komplementären *DNA*-Strang synthetisiert. Dabei wurden die Oligonukleotide so entworfen, dass sie durch ein 25 bis 40 maliges Wiederholen dieses Vorganges den gewünschten *DNA*-Abschnitt exponentiell amplifizierten. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurde *ampliTaq*-Polymerase *FS* (Perkin Elmer) oder das ExpandTM Long Template PCR System nach Anweisungen des Herstellers benutzt. Eine typische PCR enthielt 0,25 µM von jedem Primer, 65 µM dNTP, einmal PCR Puffer, 1-100 ng template *DNA*, 0,02 U/µl *Taq DNA*-Polymerase. Ein typisches PCR-Programm war z.B. 2 min bei 94 °C, gefolgt von 30 Zyklen 10 sec bei 94 °C, 10 sec bei 65 °C, 2 min bei 72 °C und abgeschlossen durch 5 min bei 72 °C. Für die Amplifizierung von *DNA*-Fragmenten zur Klonierung wurde folgendes Programm benutzt: 5 min bei 96 °C, gefolgt von 5 Zyklen 20 sec bei 96 °C, 30 sec bei 56 °C, 2 min bei 72 °C, gefolgt von 20 Zyklen 45 sec bei 96 °C, 2 min bei 72 °C und abgeschlossen durch 5 min bei 72 °C.

4.2.1.9. Berechnung der Schmelztemperaturen von Primern

Für Standard-PCRs wurde die Schmelztemperatur der Primer mit $T_m [^{\circ}\text{C}] = 2x(A + T) + 4x(G + C)$ berechnet. Zur Sequenzierung wurde die Schmelztemperatur der Primer mit $T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 \text{ }^{\circ}\text{C} + 0,41x (G\% + C\%) - 650/N$ berechnet.

4.2.1.10. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger mit dem ABI PRISMTM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. Die Didesoxy-Analoga der 4 verschiedenen Desoxyribonukleotide (dNTP) waren jeweils mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff kovalent verbunden. Die Strangverlängerung konnte somit in einem einzigen Reaktionsgefäß mit allen vier ddNTPs durchgeführt werden und in einer einzigen Laufspur auf einem Sequenziergel, oder in einer einzigen Kapillare elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die dadurch entstehenden aufeinanderfolgenden Fluoreszenzspektren entsprachen der Basenfolge der zu sequenzierenden *DNA*.

4.2.1.11. DNA-Fällung

Zur Aufkonzentrierung wurden die *DNA*-Lösungen mit Natriumacetat und Ethanol gefällt. Dazu wurden die Proben mit 1/10 des Probenvolumens 3 M Natriumacetat pH 5,6 und dem 2,5 fachen Probenvolumen an eiskaltem Ethanol gemischt und 20 min bei

-80 °C inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA für 20 min bei 20000g pelletiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% Ethanol überschichtet und die DNA für 20 min bei 20000g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet getrocknet und in H₂O oder einmal TE aufgenommen.

4.2.1.12. Plasmidkonstruktionen

4.2.1.12.1. pGEX-FLAG

Das Plasmid pGEX-6P-1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI geöffnet. Die Oligonukleotide FLAG forward und FLAG reverse wurden in TE gelöst und zu je 100 ng in einem Reaktionsgefäß gemischt. Dieses wurde in 500 ml Wasser auf 98 °C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. So entstand ein doppelsträngiger Adapter der in das Plasmid eingeführt werden konnte. Der Adapter zerstört die ursprüngliche *Bam*HI Restriktionserkennungsstelle, führt eine neue *Nde*I Restriktionserkennungsstelle ein, gefolgt von der DNA-Sequenz, die für das FLAG-Epitop kodiert und einer neuen *Bam*HI Restriktionserkennungsstelle im Leserahmen wie pGEX-6P-1. Der Adapter wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut mit QIAquick PCR Purification Kit nach Anweisung des Herstellers gereinigt. Adapter und Plasmid wurden ligiert und transformiert.

4.2.1.12.2. pGEX-FLAG-HD-Exon 1(Q)n

HD Exon 1 Fragmente mit 20, 32, 37, 39, 40, 45, 51 und 55 CAG Wiederholungen wurden aus den Plasmiden wie sie bei Sittler et al. (1999) beschrieben mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I ausgeschnitten und gereinigt. Der Vektor pGEX-FLAG wurde mit den Restriktionsenzymen *Eco*RI und *Not*I geöffnet, gereinigt und mit den gereinigten Fragmenten ligiert.

4.2.1.12.3. pEGFP-HD 72Q und pYEGFP-HD 17Q

pEGFP-HD 72Q und pYEGFP-HD 17Q wurden vorher als pEGFP-CAG 72, pYEGFP CAG 17 bezeichnet. Sie wurden wie von Sittler et al., 2001 beschrieben kloniert.

4.2.1.12.4. pTL-HA-N-OCT3, pTL-HA-TBP, pTL-HA-PQBP1

Für pTL-HA-N-OCT3 wurde aus dem Plasmid pGEX-FLAG-N-OCT3 mit *Bam*HI und *Xho*I geschnitten. Ein 1,26 kb großes Fragment wurde aufgereinigt. pTL-HA2 wurde mit

BamHI und *XhoI* geöffnet und gereinigt. Fragment und Vektor wurden ligiert und transformiert.

pTL-HA-PQBP1 wurde aus dem Plasmid pGEX-FLAG-PQBP1 mit *EcoRI* und *NotI* geschnitten und ein 0,8 kb großes Fragment wurde aufgereinigt. pTL-HA2 wurde mit *EcoRI* und *NotI* geöffnet und gereinigt. Fragment und Vektor wurden ligiert und transformiert.

pTL-HA-TBP wurde von A. Sittler aus pBS2-KSP-TBP kloniert. pBS2-KSP-TBP ist ein pBluescript Vektor. Die TBP cDNA wurde in Leserahmen zwischen *BamHI*- und *EcoRI*-Schnittstellen inkloniert (von Leslie Thompson, Irvine, USA)

4.2.1.12.5. pGEX-FLAG-N-OCT3, pGEX-FLAG-TBP, pGEX-FLAG-PQBP1

Für pGEX-FLAG-TBP wurde ein 1 kb großes Fragment aus pTL-HA-TBP (A. Sittler) mit *EcoRI* ausgeschnitten und gereinigt. Der Vektor pGEX-FLAG wurde mit *EcoRI* geöffnet, mit CIP dephosphoryliert, gereinigt und mit dem TBP cDNA Fragment ligiert.

Für pGEX-FLAG-N-OCT3 wurde N-OCT3 mit den Primern *SalI*-N-OCT3 und N-OCT3-*KpnI* aus dem Vektor pBS + SK-N-OCT (A. Fonatana) durch PCR amplifiziert. Das erhaltene 1,25 kb große Fragment wurde mit den Enzymen *SalI* und *KpnI* geschnitten und gereinigt. Der Vektor pGEX-FLAG wurde mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *KpnI* geöffnet, gereinigt und mit der N-OCT3 cDNA ligiert.

Für pGEX-FLAG-PQBP1 wurde PQBP1 mit den Primern *SalI*-PQBP1 und PQBP1-*NotI* aus dem Vektor pBS + SK-PQBP1 (H. Okazawa) mit PCR amplifiziert. Das erhaltene 0,8 kb große Fragment wurde mit den Enzymen *SalI* und *NotI* geschnitten und gereinigt. Der Vektor pGEX-FLAG wurde mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *NotI* geöffnet, gereinigt und mit der PQBP1 cDNA ligiert.

4.2.2. Mikrobiologische Methoden

4.2.2.1. Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Präparation elektrisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte durch das Waschen von Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase in eiskalten 10%igen Glycerin. Dabei wurden die bei der Elektroporation störenden Elektrolyte aus dem Medium entfernt.

Mit 1 ml einer Übernachtskultur *E. coli* Zellen in SOB-Medium wurde 11 SOB-Medium angeimpft. Bei 37 °C und 100 rpm wurde die Kultur bis zu einer optischen Dichte bei

600 nm von 0,6-0,8 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4000g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert, im gleichen Volumen eiskalten 10%igen Glycerin gewaschen und erneut bei 4000g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch dreimal wiederholt, wobei die Pellets zu je 500 ml, 100 ml, und 10 ml resuspendiert und abzentrifugiert wurden. Nach erneuter Zentrifugation wurde das letzte Pellet in 1-2 ml eiskalten 10%igem Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden dann zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Elektrisch kompetente Zellen wurden, wie bei Sambrook beschrieben, vor der Benutzung immer durch Transformation mit pUC (NEB) und Wasser auf Kompetenz und Kontaminationen untersucht (Sambrook et al., 1989).

4.2.2.2. Transformation in elektrisch kompetente *E. coli* Zellen

Die Transformation von DNA in elektrisch kompetente *E. coli* Zellen erfolgte durch einen kurzen Impuls von hoher Feldstärke, wodurch die Bakterienzellwand durchlässig für die hochmolekularen DNA Moleküle wurde.

Der Genepulser von BioRad wurde auf 200 Ω, 25 mF und 1,68 kV eingestellt. In einer Genpulserküvette mit 0,5 mm Durchmesser wurde 30 µl elektrisch kompetenter Zellsuspension mit 3 µl Ligationsansatz vermischt und elektroporiert. Die Zellen wurden schnell in eiskalten SOB⁻-Medium oder LB-Medium resuspendiert und bei 37 °C und 1h im Heizblock inkubiert. Je 100 µl und 900 µl Zellsuspensionen wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum bzw. Antibiotika (Konzentrationen wie bei Sambrook et al. (1989) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.2.3. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Präparation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte durch das Waschen von Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase in eiskaltem 0,1 M CaCl₂. Durch kurzes Erhitzen auf 42°C, dem sogenannten Hitzeschock, scheinen die Zellen den Zustand zu erreichen, bei dem sie DNA aufnehmen können.

100 ml LB-Medium wurden mit einer frischen Kolonie *E. coli* Zellen überimpft. Bei 37 °C und 100 rpm wurde die Kultur bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,3-0,6 inkubiert. Die Zellen wurden 20 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden mit 50 ml (entsprechend dem halben

Volumen der Ausgangskultur) eiskaltem sterilen 0,1 M CaCl₂ gewaschen und erneut bei 4000 g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend nochmals in 5 ml 0,1 M CaCl₂ gewaschen und bei 4000g und 4 °C für 20 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden dann in 1-2 ml eiskaltem sterilen 0,1 M CaCl₂ mit 10% Glycerin aufgenommen und die resuspendierten Zellen zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Chemisch kompetente Zellen wurden vor der Benutzung immer durch Transformation mit pUC Plasmid (NEB) und Wasser auf Kompetenz und Kontaminationen untersucht.

4.2.2.4. Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen erfolgte durch kurzes Erhitzen auf 42 °C, wodurch die Bakterienzellwand durchlässig für hochmolekulare DNA-Moleküle wird.

100 µl chemisch kompetente Zellen wurden mit 3 µl Ligationsansatz vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 45 sec auf 42 °C erhitzt und anschließend sofort für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz mit 1 ml eiskaltem SOB⁻-Medium oder LB-Medium versetzt und für 1h bei 37 °C und 800 rpm im Heizblock inkubiert. Je 100 µl und 900 µl wurden auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (Konzentrationen wie bei Sambrook et al., 1989) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.2.3. Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1. Expression von rekombinanten GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Das Glutathion S-Transferase (GST) Genfusionssystem diente zur Expression und Reinigung von Fusionsproteinen in *E. coli*. Die pGEX-6P Plasmide sind für die induzierbare, intrazelluläre Expression von Genen und Genfragmenten als Fusion mit dem GST-Gen aus *Schistosoma japonicum* entwickelt worden. Die Expression wird durch einen mit IPTG induzierbaren *tac*-Promotor kontrolliert, der im nicht induzierten Zustand durch das Genprodukt vom internen *lac P* Gen reprimiert wird. Die Fusionsproteine konnten aus bakteriellen Lysaten durch Affinitätschromatographie mit Glutathion-Agarose gereinigt werden und in Western Blots mit Anti-GST-Antikörpern nachgewiesen werden. Zwischen der MCS und der stromabwärts gelegenen cDNA kodierend für GST

befand sich eine Sequenz, die für eine spezifische Proteaseschnittstelle, für die *PreSission*^Ö Protease, kodiert. Dies erlaubte die Abspaltung des N-terminalen GST-Anteils von dem Fusionsprotein.

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden 200 ml LB (mit 20 mM MOPS/KOH pH 7.9, 0.2% Glucose, 20 µg/ml Thiamin, 100 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie, die das gewünschte Expressionsplasmid enthielt, inokuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Bei Benutzung des Bakterienstammes SCS1 wurde dem Medium 25 µg/ml Kanamycin für die Selektion auf das zusätzliche Plasmid pSE111 zugesetzt. Das Plasmid pSE111 enthält das *lacI*^q Repressorgen und das *argU* Gen für die seltene Arginin-tRNA. *LacI*^q verbessert die Repression des *tac*-Promotors und optimiert die Expression eukaryontischer Proteine (Buessow et al., 1998). Mit einer Übernachtskultur wurden 1,5 l LB (mit 20 mM MOPS/KOH pH 7.9, 0,2% Glucose, 20 µg/ml Thiamin, 100 µg/ml Ampicillin) mit einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,15 angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 weiter kultiviert. Die Proteinexpression wurde dann mit 1 mM IPTG für 3,5h bei 37 °C induziert. Die Zellen wurden bei 4000g für 20 min abzentrifugiert, das Pellet in Waschpuffer (50 mM Natriumphosphat pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnte bei – 80 °C gelagert werden.

4.2.3.2. Reinigung von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine können an immobilisierten Glutathion affinitätsgereinigt werden. Das gebundene Protein wird anschließend mit löslichem Glutathion eluiert, das die Bindung kompetitiert.

Die Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose zeigte dabei nicht so gute Resultate wie die Affinitätschromatographie mit Glutathion-Agarose. Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus 1,5 l Bakterienkultur wurde 200 mg Glutathion-Agarose eingewogen und in 30 ml 1 M NaCl über Nacht bei 4 °C gequollen. Die Glutathion-Agarose wurde bei 2000g für 10 min abzentrifugiert und mit 30 ml GST-P1-Puffer gewaschen. Das Waschen wurde zweimal wiederholt.

Die Bakterienzellen wurden in 25 ml GST-P1-Puffer mit Protease-Inhibitoren und 0,5 mg/ml Lysozym resuspendiert und 30-45 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde zweimal 45 sec auf Eis bei Stufe 3 sonifiziert. Dem Lysat wurde Triton X-100 in einer

Endkonzentration von 0,1% (v/v) zugesetzt und für mindestens 2 min inkubiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 30000g bei 4 °C für 30 min geklärt. Der Überstand wurde mit je 200 mg gequollener und gewaschener Glutathion-Agarose versetzt und für 1h bei 4 °C auf einem Rad rotiert. Diese Mischung wurde in eine 5 ml Säule gegossen und mit zweimal 30 ml GST-P1-Puffer mit 0,1% Triton X-100 und einmal mit GST-P1-Puffer gewaschen. Das Protein wurde mit GST-P1-Puffer mit 720 ng/ml Glutathion (reduziert) eluiert. Dazu wurde die fast ganz trockene Glutathion-Agarose mit gebundenen Protein mit 1 ml dieses Puffers für 5 min inkubiert und dann erst eluiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 280 nm bestimmt. Dieses schrittweise Verfahren von Inkubation und Elution wurde fortgesetzt bis die Konzentration geringer als 0,2 mg/ml war. Je 1.5 µg Gesamtprotein der verschiedenen eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-Gel analysiert. Anschließend wurden die saubersten Fraktionen vereinigt und über Nacht gegen den Dialysepuffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 8,7% Glycerin) dialysiert. Die Proteine wurden dann aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

4.2.3.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

4.2.3.3.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Bei der Bradford-Methode verändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G250 durch Bindung an Proteine von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (Bradford Proteinassay Kit, BioRad). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Dabei verhalten sich alpha- und beta-Sekundärstrukturen unterschiedlich. Als Standardreihe wurden BSA-Verdünnungen benutzt.

4.2.3.3.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur schnellen Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Dabei entspricht eine OD_{280} von 1 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml.

Für eine genauere Konzentrationsbestimmung wurde der theoretische Extinktionskoeffizient ϵ bei pH 6.5 in 6,0 M Guanidiniumhydrochlorid und 0,02 M Phosphatpuffer (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) berechnet und so die

Proteinkonzentration über die Absorption bei 280 nm bestimmt. OD_{280} von 1 entspricht dann $1 \text{ mg/ml} = \epsilon / \text{Molekulargewicht}$ (Gill et al., 1989).

4.2.3.4. SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekularmasse erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Benutzt wurde dabei ein starkes Detergenz, SDS, das die Dissoziation der Proteine in die einzelnen Polypeptid-Untereinheiten und erlaubt. SDS lagerte sich dabei gleichmäßig an die Proteine. Proteine unterschiedlicher Masse werden unterschiedlich stark negativ geladen. Demzufolge werden die Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Die SDS-Polyacrylamidelektrophorese wurde gemäß den Ausführungen von Sambrook durchgeführt. Sofern nicht explizit erwähnt, wurde ein 12% Trenngel benutzt (Sambrook et al., 1998).

4.2.3.5. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit dem Farbstoff Coomassie brilliant blau G250 angefärbt. Die Proteine wurden mit 10% Essigsäure und 45% Methanol für 5 min im Gel fixiert und dem Gel dadurch Wasser entzogen. Das Gel wurde dann für 20 bis 60 min in der Färbelösung mit 50% Methanol, 9,2% Essigsäure und 0,179% Coomassie Brilliant Blau G250 geschüttelt und anschließend durch mehrmaliges Wechseln der Entfärberlösung aus 7% Essigsäure und 20% Methanol entfärbt.

4.2.3.6. Western Blotting

Nach der Auftrennung der Proteinen im SDS-Gel wurden sie durch Elektroblothing auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend konnten die immobilisierten Proteine immunologisch nachgewiesen werden.

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese blasenfrei auf eine, in Westernblot-Puffer befeuchtete Nitrocellulosemembran gelegt. Auf jeder Seite wurden je zwei mit Puffer befeuchtete Whatman 3 MM Filterpapiere und je ein Schwamm gelegt. Dieses "Blotsandwich" wurde fest in die Transferapparatur der Firma BioRad eingespannt. Nach Auffüllen des Blot-Tanks mit Puffer erfolgte der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran (1h bei 50 V). Anschließend wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt, das die Proteine zusätzlich durch die darin enthaltene Trichloressigsäure fixiert. Die Banden des Proteinstandards wurden auf der Membran markiert.

Für die Immunodetektion wurde die Membran nach 30 min in 3% Magermilchpulver in PBS für 1h oder über Nacht mit dem spezifischen, primären Antikörper in 3% Magermilchpulver in PBS inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal mit T-PBS und einmal mit PBS für je 5 min gewaschen und dann mit dem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (in einer Verdünnung 1: 2000) in 3% Magermilchpulver in PBS für 45 bis 60 min inkubiert und wie vorher gewaschen. Die Detektion der immunmarkierten Proteinbanden erfolgte mittels Chemolumineszenz (ECL Kit, NEN). Die Peroxidase, die am sekundären Antikörper konjugiert ist, katalysiert in Anwesenheit von H_2O_2 die Oxidation des Substrates Luminol. Dieses emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm. Dieses emittierte Licht kann mit lichtempfindlichen Filmen detektiert werden. Die Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers gemischt und mit der Membran inkubiert. Die Filme wurden in der Dunkelkammer auf die Membran aufgelegt und entwickelt. Die entstanden Färbungen wurden mit dem Durchlichtscanner Epson GT-700 Photo digitalisiert und mit dem Programm AIDA 1.0 quantifiziert

4.2.3.7. Filtertest

Zur Detektion von SDS-unlöslichen Aggregaten wurde der Filtertest eingesetzt (Scherzinger et al., 1997, Wanker et al., 1999).

Auf einer Celluloseacetatmembran (0,2% Porengröße) werden SDS-unlösliche Aggregate aus polymeren Huntingtin zurückgehalten, SDS-lösliche Huntingtin-Monomere dagegen werden durch die Membran gefiltert. Proteinextrakte wurden mit 2% SDS und 50 mM DTT für 5 min auf 95 °C erhitzt. Eine BRL Dot-Blot Filtrationseinheit wurde mit zwei mit SDS angefeuchteten Whatman 3 MM Filterpapieren und einer angefeuchteten Celluloseacetatmembran luftblasenfrei belegt und dicht verschlossen. Je 200 μ l 0,2% SDS wurden pro Loch vorgelegt und die abgekochten Proteinlösungen hinzu pipettiert. Die Proben wurden durch den Filter gesaugt und zweimal mit 200 μ l 0,2% SDS gewaschen. Der Filter wurde anschließend aus der BRL Dot-Blot Filtrationseinheit entfernt und dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Dann wurde die Membran wie bei der Immunodetektion eines Western Blots prozessiert.

4.2.3.8. Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Proteine können durch eine Präzipitation mit Trichloressigsäure (TCA) angereichert werden.

Dazu wurden bis zu 100 µg Protein auf 1 ml mit aqua bidest verdünnt und 5 µl Natriumoxycholat (20 ng/µl) als Detergenz zugegeben. Die Proben wurden auf Eis für 30 min inkubiert und dann mit frisch zubereiteter 20% TCA (w/v) für 1h auf Eis gefällt. Die Proben wurden mit 20000g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert und das Pellet zweimal mit eiskaltem Azeton gewaschen. Danach wurde wieder mit 20000g bei 4 °C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in der Vakuumzentrifuge für 30 min getrocknet und in 50% SDS-Ladepuffer und 50% 1 M Tris-HCl pH 8 gelöst. Anschließend wurden die Proben für das SDS-Gel eingesetzt.

4.2.3.9. *PreSission* Protease Verdau

Die *PreSission* Protease ist ein Fusionsprotein aus GST und der humanen Rhinovirus (HRV) Typ 14 3C Protease (Walker et al., 1994). Die Protease spaltet spezifisch die Sequenz Leu-Phe-Gln/ Gly-Pro.

Für einen *PreSission* Protease Verdau wurde der *PreSission* Protease-Puffer mit 1 mM frischem DTT, GST-Fusionsprotein in einer (Konz. 0,025-1 mg/ml) mit *PreSission* Protease gemischt. Für eine quantitative Spaltung wurden die Proteine für 2h bei 8 °C mit 0,1U *PreSission* Protease inkubiert.

4.2.3.10. Gewinnung von Aggregationskeimen

Aggregationskeime wurden durch Fragmentierung von Huntingtin Exon 1-Aggregaten durch Ultraschall gewonnen.

Dafür wurde, sofern nicht anders erwähnt, 0,4 mg/ml GST-M-HD-Q52 wie oben beschrieben mit 0,1 U der *PreSission* Protease verdaut. Nach zwanzig Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die Probe mit 40 Pulsen pro Minute für zweimal eine Minute sonifiziert. Die Aggregationskeime wurden bei -20 °C gelagert.

4.2.4. Zellbiologische Methoden

4.2.4.1. Auftauen von kryokonservierten Säugetierzellen

Die bei -80 °C gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut und mit entsprechend angewärmtem Kulturmedium in Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Kulturmedium gewechselt, um das DMSO zu entfernen und die Zellen wurden, wie unter 4.2.4.2. beschrieben kultiviert.

4.2.4.2. Kultivierung von Säugetierzellen

COS-1 Zellen wurden mit 5% FCS, 100 iE/ml Penicillin und $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Streptomycin bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80% geteilt und bis zu einer Konfluenz von 5% verdünnt. Dafür wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und mit $0,25\%$ (w/v) Trypsin/ 1 mM EDTA bei 37 °C für 5 min vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellen wurden dann in 10 ml Kulturmedium zu einer homogenen Lösung resuspendiert und entsprechend verdünnt in neue Kulturflaschen ausgesät.

4.2.4.3. Lagerung von Säugetierzellen

Für die langfristige Lagerung der Säugetierzellen wurden die Zellen in einer Kulturflasche mit 75 cm^2 Grundfläche bis zu einer 80% igen Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Trypsin abgelöst und bei $1000g$ für 10 min bei Raumtemperatur pelletiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml Kulturmedium mit 20% FCS resuspendiert. Dann wurde bis zu 10% DMSO zugegeben. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen langsam in einem Styroporbehälter auf -80 °C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.4.4. Calciumphosphat-Transfektion von Säugetierzellen

Die Calciumphosphat-Transfektion (Graham und van der Elb, 1973) beruht auf der Reaktion von Calciumchlorid mit Natriumphosphat, bei der ein wasserunlösliches Calciumphosphat-Präzipitat gebildet wird, das an DNA bindet. Dieses Präzipitat wird von den Zellen aufgenommen und die darin enthaltene DNA transkribiert.

Zellen wurden in $9,5\text{ cm}^2$ Gefäß zu ca. 30% konfluent ausgesät und für $3\text{-}5\text{ h}$ bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Für eine Flasche mit $3,5\text{ cm}^2$ Oberfläche wurden mit $2\text{ }\mu\text{g}$ DNA

und 4 µg Transport-DNA (pBluescript oder Heringsperma DNA) zu einem Endvolumen von 80 µl mit TE (Säugetierzellen) aufgefüllt. Dazu wurde 20 µl 2M CaCl₂ gegeben. Anschließend wurden 80 µl zweimal HBS unterschichtet und durch Pipettieren mit Luftblasen gemischt. Die Präzipitatbildung erfolgte durch Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Das Präzipitat wurde vorsichtig auf die Zellen getropft und mit dem Medium vermischt. Nach 12-16h wurden die Zellen für 5 min mit sterilem PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Nach 40-48 Stunden wurden die Zellen geerntet oder für die Immunofluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

4.2.4.5. Lipofectin®-Transfektion von Säugetierzellen

Lipofectin® Reagenz ist eine 1:1 (w/w) Liposomenlösung des Lipids N-[1-(2,3-Dioleoyloxypropyl)-n,n,n-Trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und Diolylphosphatidylethanolamin (DOPE) in Wasser. Es formt spontan einen Lipid-DNA Komplex. Die Fusion des Lipid-DNA-Komplexes mit Zellmembranen resultiert in einem effizienten Aufnahme von DNA. Die Zellen wurden entsprechend der Vorschrift des Herstellers mit je 1-2 µg DNA pro 3,5 cm² Gefäßoberfläche transfektiert.

4.2.4.6. Herstellung von Zelllysaten

Die transfektierten Zellen wurden in eiskaltem PBS gewaschen und mit Lysispuffer für Säugetierzellen mit Proteaseinhibitoren und 25 U/ml Benzonase überschichtet. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis zur vollständigen Lyse und zum DNA-Verdau inkubiert, dabei wurden die Zellen und Zellfragmente durch vorsichtiges Resuspendieren vom Gefäßboden gelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mit dem Bradford Proteinassay bestimmt.

4.2.4.7. Vorbereitung von Zellpräparaten für die Immunofluoreszenz

Bei der Immunofluoreszenz werden Zellproteine mit spezifischen Antikörper und fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Anschließend wurden sie im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht.

Zellen wurden in 3,5 cm² Gefäßen (6-well) auf deren Boden ein steriles Glasplättchen gelegt worden ist mit einer Konfluenz von 30-50% ausgesät und wie oben beschrieben transfektiert. Nach 40-48 h wurden die Zellen mit sterilen PBS gewaschen und mit 2%igen Paraformaldehyd für 15 min fixiert. Die Zellen wurden für zweimal 5 min mit T-

PBS und einmal mit PBS gewaschen und mit 3% BSA/PBS für 30 min blockiert. Die primären Antikörper wurden in 3% BSA/PBS verdünnt und die Glasplättchen damit überschichtet. Um ein Austrocknen der Proben zu verhindern wurde ein gleich großes Stück Parafilm auf die Lösung gelegt und die Schale in einer feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden für zweimal 5 min mit T-PBS und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 3% BSA/PBS mit einer Verdünnung eines spezifischen sekundären Antikörpers, der mit Cy3 bzw. FITC konjugiert war, inkubiert. Die Zellen wurden für zweimal 5 min mit T-PBS und einmal mit PBS gewaschen. Die Kerne der Zellen wurden mit 3 µg/ml DAPI für 15 sec gefärbt und die Zellen für zweimal 5 min mit T-PBS und einmal mit PBS gewaschen. Die Glasplättchen wurden aus den Kulturgefäßen genommen und mit der Zellseite nach unten mit einem kleinen Tropfen Montagemedium luftblasenfrei auf einen Objektträger montiert.

4.2.4.8. Proteasom-Inhibition mit ALLN

Für den Nachweis der Proteine HA-HD-Q 20, 32 und 37 mit Westernblots wurde zu den transfektierten Zellen der Proteasom-Inhibitor ALLN (N-Acetyl-Leu-Leu-Norleucinal) zugegeben. ALLN ist ein Calpain I Inhibitor, der auch das Proteasom hemmt. Nach Anweisung des Herstellers 100 mg/ml ALLN frisch in DMSO gelöst und den Zellen 8h vor Ernte der transfektierten Zellen dem Medium zugesetzt (Endkonzentration 17 µg/ml).