

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten. Das Grundprinzip der PCR besteht in der enzymatischen Duplikation einer spezifischen DNA-Sequenz. In sich wiederholenden Zyklen der Hitzedenaturierung der DNA, der Hybridisierung Sequenz-spezifischer Oligonukleotid-Primer und der Synthese der DNA, wird der zwischen den Primern liegende Sequenzbereich amplifiziert. In dieser Arbeit ermöglichte die PCR-Methode nicht nur der Amplifikation spezifischer DNA-Genfragmente für die Klonierung in bestimmte Plasmide, sondern auch die Typisierung genomischer DNA von potentiellen transgenen Mäusen und die Expressionsanalysen verschiedener Gene in spezifischen Organen und Zellen nach cDNA Synthese durch reverse Transkription (RT-PCR).

3.1.1.1 Amplifikation spezifischer DNA Genfragmente mittels Pfu- oder Turbo Pfu Polymerase

Die Erhaltung der Wildtypsequenz von DNA-Fragmenten ist ein wichtiges Kriterium während der Amplifikation, insbesondere für die Nutzung der DNA zur Subklonierung in entsprechende Plasmide. Sowohl die Pfu- als auch die Turbo-Pfu- Polymerase zeigen eine 3'- zu 5'- Exonuklease Aktivität, welches die Polymerasen dazu befähigt, falsch eingebaute Nukleotide, während der Synthese zu entfernen und durch die Richtige der Sequenz entsprechende Nukleotide zu ersetzen. Im Vergleich zur Taq-Polymerase ist die Mutationsrate der Pfu-Polymerasen durch falsch eingebaute Nukleotide sehr gering. Dennoch ist die Extensionszeit der Pfu-Polymerasen wesentlich höher als bei der Taq-Polymerase.

Die mRNA von LPS- bzw. IFN γ -aktivierten Makrophagen wurde in cDNA durch Reverse Transkription umgeschrieben und für die Amplifikation der verschiedenen Slfn-Gene verwendet. 2 μ l dieser cDNA wurde mit 1 μ l dNTP-Mix (10mM von jedem Nukleotid dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 2,5 μ l von jedem Primer (10 μ M Lösung), 5 μ l 10x Pfu-Polymerase-Puffer, 36 μ l destilliertes H₂O und 1 μ l Turbo-Pfu- bzw. Pfu-Polymerase versetzt und folgendem Amplifikationsprogramm unterzogen:

| Anzahl der Zyklen | Schritt | Temperatur | Dauer |
|-------------------|---------------------------|------------|--|
| 1x | Anfangsdenaturierung | 94°C | 5 min |
| 25 -30 x | Denaturierung | 94°C | 30 sec |
| | Oligonukleotid-Anlagerung | Tm | 1 min |
| | Elongation | 72°C | Pfu 2-4 min für 1000 bp Turbo-Pfu 1-2 min für 1000 bp |
| 1x | Abschluss-Extension | 72°C | 10-20 min |

3.1.1.2 PCR-Analyse von Bakterien mit rekombinanter Plasmid-DNA (Kolonie-PCR)

Von den Agarplatten wurde eine Bakterien-Einzelkolonie mittels einer Pipettenspitze abgenommen und in einem PCR-Reaktionsgefäß abgestrichen. Die Pipettenspitze mit den Resten der Bakterienkolonie wurde gleichzeitig zum Animpfen einer Bakterienkultur genutzt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 3 µl Taq-Polymerase Puffer, 2 µl dNTPs (2,5mM von jedem Nukleotid dATP; dCTP; dTTP; dGTP), 1 µl von jedem Primer; 0,5 µl Taq Polymerase (500 U/µl) und 22 µl destilliertes H₂O. Die Amplifikation erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

| Anzahl der Zyklen | Schritt | Temperatur | Dauer |
|-------------------|---------------------------|------------|-----------------------|
| 1x | Anfangsdenaturierung | 94°C | 5 min |
| 25 -30 x | Denaturierung | 94°C | 30 sec |
| | Oligonukleotid-Anlagerung | Tm | 30 - 40 sec |
| | Elongation | 72°C | 45 sec - 1 min 30 sec |
| 1x | Abschluss-Extension | 72°C | 7-12 min |

Die Analyse über die erfolgreiche Amplifikation der Genprodukte erfolgte über Agarose-Gelelektrophorese

3.1.1.3 PCR-Analyse von genomischer DNA zur Typisierung von potentiellen Sifn-transgenen Mäusen

Nach der Präparation der genomischen DNA aus Mausschwänzen wurde von der DNA-Suspension eine 1:10 bzw. 1:20 Verdünnung hergestellt. Von diesen verdünnten DNA-Suspensionen wurden 1-2µl für die PCR-Analyse genutzt. Zur Analyse wurde der gleiche Ansatz und das gleiche Amplifikationsprogramm, wie unter 3.1.1.2. beschrieben, verwendet.

3.1.1.4 Real-Time-PCR (RT-PCR) für quantitative Gen-Expressions-Analyse

Die mRNA von folgenden Zellen wurde präpariert und in cDNA umgeschrieben: 1.) von transduzierten und sortierten GFP positiven NIH3T3 Fibroblasten (pMSCV, pMSCV-slf1 24h, 36h, 48h), 2.) von aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen aus Wildtyp bzw. aus Slfn1-transgenen Mäusen und 3.) von Thymozyten in verschiedenen Phasen der Entwicklung. 4 µl der verdünnten cDNA und variable Primerpaare wurden für die Quantifizierung der Expression verschiedener Gene in den quantitativen Analysen genutzt. Für die quantitative Analyse wurden die OneStep RT-PCR Kits (Qiagen, GmbH, Deutschland) genutzt, wobei Primer für β-Aktin und GAPDH für der qualitativen und quantitativen Kontrolle der cDNA dienten. Der Gesamtansatz von 30 µl enthielt 4 µl verdünnte cDNA (ca.10 ng/µl), 1,5 µl der jeweils zu verwendenden Primer, 8 µl H₂O und 15 µl Sybr[®]Green-Mix. Die Amplifikation wurde nach folgendem PCR-Programm durchgeführt: 40 Zyklen, Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, Synthese bei 60°C für 1 Minute. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem ABI-Prism7000 Programm.

3.1.2 DNA –Präparationen

3.1.2.1 Plasmid-Präparation

Die Mini-, Midi- und Maxi-Plasmid-Präparation aus verschiedenen transformierten Bakterienstämmen erfolgte mit Hilfe der jeweiligen Kits der Firma QIAGEN und wurde nach deren Anleitung durchgeführt.

3.1.2.2 Präparation genomischer DNA aus Mausschwänzen

Von den jeweiligen zu untersuchenden Mäusen wurde ein ca. 1 cm langes Schwanzstück abgeschnitten, in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben, mit 700 µl Lysis-Puffer und 35 µl Proteinase K (10mg/ml) versetzt und über Nacht bei 55°C verdaut. Die Suspension wurde am nächsten Tag abzentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die genomische DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Die präzipitierte genomische DNA wurde 2 min bei 12000 rpm abzentrifugiert, 2x mit 70igem Ethanol gewaschen und 100 µl destilliertem H₂O versetzt. Die genomische DNA wurde über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelöst. Von der gelösten genomischen DNA wurden wahlweise eine 1:10 bzw. eine 1:20 Verdünnung hergestellt und der PCR Analyse unterzogen.

3.1.2.3 Präparation genomischer DNA aus Suspensions-Zellen (Aussalzmethode)

$2\text{-}6 \times 10^6$ Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden 200 μl 5x Lysis-Puffer, 50 μl 20x SDS und 10 μl Proteinase K (10mg/ml) gegeben und zunächst für 30 min bei 65 °C und im Anschluss über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 400 μl 5 M NaCl hinzugefügt, 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Nach der Zugabe von 5 ml absoluten Ethanols wurde die präzipitierte DNA für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA 3x mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wird in 50 μl H₂O aufgenommen und mit RNase A (0,1 mg/ml) für 1 h bei 37 °C behandelt. Die Auftrennung der genomischen DNA erfolgte in einem 1,4 %igen Agarose-Gel.

3.1.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der DNA-, RNA-Konzentration wurden 1:70; 1:100; 1:200 bzw. 1:500 Verdünnungen mit den jeweiligen Lösungsmitteln hergestellt. Die Messung erfolgte im Spektralphotometer bei den Wellenlängen 260, 280 und 320 nm. Die Konzentration ergibt sich wie folgt:

$$\text{RNA: } \text{OD}_{260} * 40 * \text{Verdünnung}/1000 = \text{RNA oder ssDNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

$$\text{DNA: } \text{OD}_{260} * 50 * \text{Verdünnung}/1000 = \text{DNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

3.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren haben aufgrund der negativen Nettoladung der Phosphatgruppen die Fähigkeit im elektrischen Feld zur Anode zu wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Größe der Nukleinsäuren.

Zur Herstellung von Agarose-Gelen wurde Agarose in benötigtem Volumen TAE Puffer aufgeköcht, auf 55°C abgekühlt, mit Ethidiumbromid versetzt und in entsprechende Gelkammern gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer vermischt, in die Geltaschen pipettiert und mit einer angelegten Spannung von 5-10 V/cm² Gelfläche elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größe der DNA-Fragmente wurde mit einem Größenstandard verglichen.

3.1.4 Subklonierung von DNA-Genfragmenten in Plasmide

3.1.4.1 Enzymkatalysierte Reaktionen an DNA

3.1.4.1.1 Enzymatische Restriktionsspaltung

Zur Spaltung von Plasmid-DNA wurden je 1-4µg DNA mit den entsprechenden Restriktionspuffern und Restriktionenzymen (1-5 U) der Firma NEB in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt und für 1-2 h bei 37°C (bzw. im Fall von Sma I bei 28 °C) inkubiert. Die Auftrennung der Genfragmente erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel.

3.1.4.1.2 Auffüllreaktion überstehender 5'-Enden mit der Klenow-Polymerase

Die DNA-Polymerase I von *E.coli* ist in der Lage, an freie 3'-OH-Enden zum anderen Strang komplementäre Nukleotide anzufügen, so dass man glatte DNA-Enden (blunt-ends) erhält. Da die Klenow-Polymerase in praktisch allen Reaktionspuffern aktiv ist, kann die DNA aus Restriktionsverdau-Ansätzen direkt für die Auffüllreaktion eingesetzt werden.

Zum Reaktionsansatz wurden 3 µl dNTPs (330µM), 1-4 µl Klenow-Polymerase (1U/µl) und 6-3 µl H₂O hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 10 minütige Inkubation bei 75 °C abgebrochen.

3.1.4.1.3 Dephosphorylierung kohäsiver Restriktionsenzymchnittstellen

Um eine Religation oder Konkatemerbildung der kohäsiven Enden von DNA-Vektoren nach dem Restriktionsverdau zu verhindern, werden deren 5'-Enden dephosphoryliert.

Die Plasmid-DNA wurde mit 1x Dephosphorylierungspuffer und 1-2 µl Alkalischer Phosphatase (CIP: 1 U/µl) für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.4.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von spezifischen DNA-Fragmenten aus heterogenen Restriktionsansätzen oder Dephosphorylierungsreaktionen wurden die DNA-Fragmente zur Entfernung von Enzymen und Salzen auf ein Agarose-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die entsprechenden herausgeschnittenen DNA Banden wurden mittels des QiaEx II Gelextraktionskit nach Angaben des Herstellers isoliert.

3.1.4.3 Ligation

Für die Ligation wurden Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 vermischt. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl. In diesem Reaktionsansatz befanden sich 1x Ligationspuffer mit ATP und 1 µl T4-Ligase (1U/µl). Die Ligation erfolgte bei 14°C wahlweise für 2-3 h bei „sticky end“ Klonierungen bzw. über Nacht bei „blunt end“ Klonierungen.

3.1.4.4 Transformation von *E. coli*

Zum gesamten Ligationsansatz wurden 50 µl kompetente *E.coli*-Zellsuspension gegeben (DH5α, TOP10F') und für 30 min auf Eis belassen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 1 min bei 42°C inkubiert, mit 600 µl Medium (ohne Antibiotikum) versetzt und für 30 min bei 37°C vorsichtig geschüttelt. Verschiedene Mengen der Zellsuspension wurden auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht für mindestens 14h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.1.4.5 Southern-Blot-Analysen

Die Southern-Blot-Analyse dient dem Nachweis spezifischer DNA-Moleküle nach Auftrennung eines heterogenen DNA-Gemischs durch Agarose-Gelelektrophorese.

Die zu analysierende DNA wurde zunächst auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch getrennt und im Gel denaturiert. Dazu wurde das Gel zunächst 15 min in 0,25 M HCl inkubiert und im Anschluss 2x 20 min in der Denaturierungslösung (0,5 N NaOH; 0,6 M NaCl) geschwenkt. Die Neutralisierung erfolgte durch eine 2x 20 minütigen Inkubation in 1.0 M Tris, pH 7,5 ; 1,5 M NaCl. Die denaturierte DNA wurde durch Kapillartransfer mit 20x SSC auf eine Nylonmembran transferiert und durch UV-Strahlung (Stratalinker) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde im Anschluss mit 10-20 ml Hybridisierungslösung bei 65 °C in rotierenden Röhren im Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiven denaturierten DNA-Sonde erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei einer Temperatur zwischen 60-65°C. Am darauffolgenden Tag wurde die hybridisierte Membran 2x 10 min mit 2x SSC; 1,0 % SDS bei RT und 1x 15-30 min mit 0,5x SSC; 1,0 % SDS bei 65 °C gewaschen. Die Signale wurden durch Autoradiographie detektiert.

3.1.4.6 Radioaktive Markierung von DNA

Doppelsträngige DNA wurde nach der Methode von Feinberg und Vogelstein radioaktiv markiert. Dazu wurde die DNA (ca. 30 ng) in einem Gesamtvolumen von 23 μl und 10 μl Random Primer 9mer bei 95-99 °C für 5 min denaturiert. Nach Zugabe von 10 μl dCTP-Puffer, 5 μl radioaktivem dCTP und 1 μl Klenow -Polymerase wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Nicht eingebaute radioaktiv-markierte Nukleotide wurden über die Sephadex G50 Säulen (spin columns) abgetrennt. Vor der Hybridisierung wurde die markierte DNA-Sonde für 5-10 Minuten bei 95-99 °C denaturiert.

3.1.4.7 Endmarkierung von DNA mit der T4-Polynukleotidkinase

Zur radioaktiven Markierung kurzer Oligonukleotide kann das γ -ständige Phosphat des $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP auf die dephosphorylierte 5'-OH Gruppe der Oligonukleotide übertragen werden.

Zur radioaktiven Markierung wurden 5 μl 10 μM Oligonukleotide, 5 μl 10x T4 PNK-Puffer, 33 μl H₂O, 5 μl ^{32}P - γ ATP und 2 μl T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μl) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 20 minütige Inkubation bei 65°C abgebrochen. Nicht eingebaute radioaktiv-markierte Nukleotide wurden über die Sephadex G50 Säulen abgetrennt.

3.1.5 RNA-Präparation

5-10 $\times 10^6$ Zellen wurden in 1 ml Trizol aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde bei -80 °C weggefroren. Die Suspension wurde mit 200 μl Chloroform vermischt, für 15 sek. geschüttelt, 2-3 min bei 15-30°C inkubiert und mit 12000 rpm für 15 min bei 2-8°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zur Präzipitation der RNA mit 500 μl Isopropanol vermischt. Der Ansatz wurde nach 10 minütiger Inkubation bei 15-30 °C bei 12000 rpm zentrifugiert (10 min bei 2-8°C). Die pelletierte RNA wurde 2x mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20-50 μl DEPC behandeltem Wasser gelöst und die RNA-Konzentration spektralphotometrisch gemessen.

3.1.6 Northern-Blot-Analysen

3.1.6.1 Agarose-Gelelektrophorese von RNA in denaturierenden Formaldehydgelen

Im Vergleich zur DNA kann die RNA unter verschiedenen Umständen Sekundärstrukturen bilden, die bei nicht denaturierenden Laufbedingungen, zu Fehlern bei der Größenbestimmung der RNA führen. Zur Aufhebung der Sekundärstruktur und zur Hemmung von RNase-Aktivitäten wurden für die elektrophoretische Trennung denaturierende Bedingungen gewählt. Die Denaturierung der RNA erfolgte unter Zugabe von Formamid und Formaldehyd in den Proben und durch die 5 minütige Inkubation bei 56°C. Formaldehyd wurde auch in die Agaroselösung gegeben, um eine Renaturierung der RNA im Gel zu vermeiden.

10 µg RNA wurden in insgesamt 11µl DEPC behandeltem Wasser gelöst. Die RNA-Suspension wurde mit 9 µl Formaldehyd, 25 µl Formamid und 5 µl 10x MOPS vermischt, für 15 min bei 65 °C inkubiert und nach Zugabe von 10 µl Formaldehyd-Ladepuffer der gelelektrophoretischen Trennung (5V/cm) unterzogen. Die denaturierte RNA wurde durch Kapillartransfer (12x SSC) auf eine Nylonmembran (Hybond-N) transferiert und durch UV Strahlung (Stratalinker) auf der Membran fixiert. Die Membran wurde im Anschluss mit 10-20 ml Hybridisierungslösung bei 58-65 °C im rotierenden Hybridisierungsofen vorhybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiven denaturierten DNA-Sonde erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei einer Temperatur zwischen 60-65°C. Am darauffolgenden Tag wurde die hybridisierte Membran 2x 20 min mit 1x SSC; 0,5 % SDS bei 58-65 °C gewaschen. Die Signale wurden durch Autoradiographie detektiert.

3.1.7 Synthese von Einzelstrang-DNA aus RNA („complementary“ DNA, cDNA)

Die cDNA ist die zur RNA komplementäre, einzelsträngige DNA. Die Synthese der cDNA erfolgte durch das Enzym Reverse Transkriptase. Vor der reversen Transkription empfiehlt sich ein DNase-Verdau. Dies verhindert eine mögliche Kontamination der cDNA mit genomischer DNA aus der RNA-Präparation. Die gesamte RNA-Suspension wurde mit 10x DNase-Puffer und 2 µl DNase (10 U/µl) versetzt, für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl EDTA (100µM) wurde die Reaktion für 10 min bei 65 °C abgebrochen.

Für die Reverse Transkription wurden 1-5 µg gesamt zelluläre RNA zusammen mit 1µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Random Primer (50 ng Random Primer / µg RNA) und 1 µl dNTP Mix (10mM je Nukleotid) in einem Gesamtvolumen von 12 µl für 5 min bei 65° C denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis wurden 4 µl des 5x Reaktionspuffers, 2 µl DTT (100 mM), 1 µl RNase-

Inhibitor (40 U/ μ l) und 1 μ l Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/ μ l) zugesetzt. Der Ansatz wurde 50 min bei 42°C inkubiert und anschliessend für 15 min bei 75 °C abgestoppt. Die cDNA wurde dann entweder direkt für PCR-Analysen verwendet oder bei –20 °C verwahrt.

3.1.8 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten wurde von der Firma AGOWA durchgeführt.

3.1.9 Microarray Transkriptom-Analysen

Die gesamte RNA von NIH3T3 Fibroblasten wurde nach 24h und 48h nach retroviraler Transduktion mit pMSCV-Slfn1 oder mit pMSCV2.2-IRES-GFP als Kontrolle unter Verwendung von TRIZOL (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde weiter mit dem RNeasy-Kit (Quiagen) aufgereinigt, quantifiziert und hinsichtlich der Integrität im 2100 Bioanalyzer-System (Agilent Technologies) analysiert. Danach wurden 4 μ g der gesamten RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der cRNA und deren Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen erfolgten unter Verwendung von Oligo-dT-T7-Promotor-Primer in eine fluoreszenten linearen Amplifikationsreaktion (Agilent Technologies). Die cRNA wurde entweder mit Cyanin 3-CTP (Cy3) oder Cyanin 5-CTP (Cy5) (NEB Life Science Products) in einer T7-Polymerase Amplifikationsreaktion nach den Protokollen des Herstellers markiert. Um farbspezifische Effekte, wie z. B. durch differentiellen Farbstoff-Einbau, auszuschliessen und um eine statistisch relevante Datenanalyse durchführen zu können, wurde ein Farbaustausch durchgeführt. Dazu wurden die präparierte RNA von einem Ansatz separat mit den beiden Farbstoffen markiert. Nach Präzipitation, Aufreinigung und Quantifikation wurden 1,25 μ g der jeweils markierten cRNA gemischt (1. pMSCV-cRNA-Cy5 vs. Slfn1-cRNA-Cy3, 2. pMSCV-cRNA-Cy3 vs. Slfn1-cRNA-Cy5), fragmentiert und auf einem „8.4 custom `in situ` Maus-Array“ unter Angaben des Herstellers (Agilent Technologies) hybridisiert. Das Scannen der Microarrays erfolgte in einer Auflösung von 5 μ m unter Verwendung eines DNA-Microarray-Laser-Scanner (Agilent Technologies). Die Resultate wurden mit einem Image-Analyse-Programm (Version A4.045; Agilent Technologies) extrahiert. Die Daten-Analyse wurde auf der Rosetta Inpharmatics Plattform (Resolver Built 3.0.0.3.22.) durchgeführt.

3.1.10 Methoden zur Analyse von Proteinen

3.1.10.1 Herstellung von Proteinlysaten für die Western-Blot-Analysen

Transduzierte und/oder sortierte NIH3T3 Fibroblasten wurden geerntet, abzentrifugiert und mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation pelletiert und anschliessend in 150 µl 2x SDS-Lysis-Puffer aufgenommen. Die Proteinsuspension wurde für 5-10 min bei 95°C denaturiert und anschliessend entweder für die elektrophoretische Auftrennung verwendet oder bei –20°C bis zur Elektrophorese gelagert.

3.1.10.2 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels denaturierenden Polyacrylamid-Gelen

10-20 µl des Proteinlysats und 5 µl des Molekulargewichtmarkers wurden je auf einer Bahn eines 10%igen Gels aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 3h bei einer Stromstärke von 30 mA/Gel. Der Transfer der Proteine von Acrylamid-Gel auf die Nylonmembran erfolgte für 90 min bei 500 mA mit 1xBlotpuffer auf Eis.

3.1.10.3 Western-Blot-Analysen

Für die Western-Blot-Analysen wurde ein Proteingemisch zunächst in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (3.1.10.2.) und durch eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Nitrocellulosemembran mit den transferierten Proteinen wurde über Nacht mit Blockpuffer bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine 1stündige Inkubation mit dem primären Antikörper, welches gegen das Zielprotein gerichtet war. Nach 1,5 h Inkubation wurde der Blot mit 1x TBS_T für weitere 1,5 h gewaschen und mit einem sekundären Enzym-markierten Antikörper inkubiert, der spezifisch an den ersten Antikörper bindet. Nach einem weiteren 1,5 stündigen Waschschrift konnte die Position der immobilisierten Proteine auf der Membran durch Nutzung des ECL-Detektions-Systems (Enhanced Chemilumineszenz) nachgewiesen werden.

3.2 Zellbiologische Methoden: Zellkultur

3.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen erfolgte nach Standardmethoden. Die verwendeten Zellen wurden als Adhäsions- oder Suspensionskulturen auf Polystyren-Zellkulturschalen bzw. in Zellkulturflaschen (Becton Dickenson) kultiviert. Die Zellen wurden in Begasungsbrutschränken (NUAIRE US outflow CO₂ Inkubator) bei 37°C, 96 % relativer Feuchte und 5 % (7-8%) CO₂ inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus Laminair HB2448) durchgeführt.

3.2.2 Passagieren von Zellen

Zur kontinuierlichen Kultivierung wurden die Zellen in Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit alle 2-4 Tage zwischen 1:4 und 1:20 verdünnt. Die Zellen wurden zum Ablösen von der Kulturschale bzw. -flasche mit Trypsin/EDTA Lösung behandelt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von Trypsin/EDTA und 5-15 min Inkubation bei 37°C von der Kulturschale abgelöst. In Abhängigkeit von der gewünschten Zellzahl wurden die Zellen in eine frische Kulturschale mit Medium gegeben.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst in Suspension gebracht. Durch Zentrifugation (5 min, 1200 rpm, Heraeus Minifuge RF) wurden die Zellen pelletiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium (FCS + 10% DMSO) zur Vermeidung von Eiskristallen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Nunc Cryovials (2ml) gefüllt und anschließend in einem vorgekühlten Einfrierbehälter gestellt. Schliesslich wurden die Zellen für 1 Tag bei -80°C und danach in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen von Zellen wurden die gefrorenen Zellaliquots in einem 37°C Wasserbad erwärmt. Die Zellsuspension wurde mit 10 ml Vollmedium vermischt. Durch Zentrifugation (5 min, 1200 rpm, Heraeus Minifuge RF) wurden die Zellen pelletiert und erneut in Vollmedium aufgenommen. Je nach Zelldichte wurden die Zellen auf 10 cm Kulturschalen oder 75 cm Kulturflaschen ausgesät.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl mit dem Hämocytometer nach Neubauer

Die Zellen wurden trypsinisiert und in 10 ml DMEM + 10% FCS aufgenommen. 180 µl Trypanblau wurden mit 20 µl der Zellsuspension versetzt, gut gemischt und für ca. 5 min bei RT inkubiert. Auf das Hämocytometer wurde ein Deckgläschen aufgelegt und die beiden Kammern mit dem Farbstoff-Zellgemisch befüllt. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während der Farbstoff durch die nicht mehr intakte Plasmamembran toter Zellen eindringen kann. Die Zellen in den vier Eckquadraten jeder Kammer wurden unter dem Mikroskop ausgezählt.

3.2.5 Methoden zur genetischen Veränderung von Zellen

3.2.5.1 Transiente Transfektion von Eukaryontenzellen durch Calciumphosphat-präzipitation

Säugerzellen in Zellkultur können durch Aufnahme von Expressionsplasmiden, welche den offenen Leserahmen für ein Protein enthalten, zur Synthese des exogenen Proteins veranlasst werden.

Am Tag vor der Transfektion wurde von der gewünschten Zelllinie $3-4 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Kulturschalen plattiert. 30 min – 2h vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1xPBS vorsichtig gewaschen und mit 6 ml Chloroquin-versetztem Medium behandelt. Während der Inkubation erfolgt die Herstellung des Calciumphosphat-DNA-Präzipitates durch das von Clontech angebotenen Calciumphosphat-Transfektions Kits. 20µg der jeweiligen retroviralen Sln-Plasmid-DNA wurden zusammen mit 10 µg vom pM13-Plasmid, welcher die Expression der retroviralen gag-pol-Genen reguliert mit 37 µl CaCl_2 gemischt und anschliessend mit Wasser auf 300 µl aufgefüllt. Dieses DNA-Plasmid-Calciumchlorid-Gemisch wurde tropfenweise zu 2x HBS Puffer dazugegeben. Durch permanentes Einblasen von steriler Luft in die 2xHBS Lösung und der tropfenweisen Zugabe des DNA-Plasmid-Calciumchlorid-Gemisches kann ein feines DNA-Calciumphosphat-Präzipitat hergestellt werden, welches von den Zielzellen besser aufgenommen wird und damit die Transfektionrate erhöht. Nach 20minütiger Inkubation wurde das entstandene Präzipitat vorsichtig resuspendiert und tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Die Zellen wurde zwischen 8-12 Stunden auf der Schale belassen, anschliessend einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen und mit frischem Kulturmedium versorgt. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert und dann für den jeweiligen Verwendungszweck bereitgestellt.

3.2.5.2 Lipofektamin vermittelte Transfektion von Eukaryontenzellen

Adhärente Zellen lassen sich effizient durch Liposomen transfizieren. Dabei entstehen mit DNA beladene Phospholipid-Partikel, deren Inhalt durch Endozytose aufgenommen wird. Für die Transfektion wurden am Tag zuvor Zellen in einer Dichte von 4×10^5 pro 6 cm Kulturplatte (Falcon[®], Heidelberg) in 4 ml DMEM-Medium ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die NIH3T3 Zellen wurden am Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass auf der Kulturplatte am folgenden Tag eine Zelldichte von 50%-80% erreicht wurde. Für die Transfektion wurde das DMEM-Medium zunächst abgezogen und die Zellen 1h mit 1 ml OPTIMEM (Gibco BRL) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde der Transfektions-Mix pipettiert. 5 µg DNA (pCMV-Slfn-cDNAs) und 6 µl Lipofektamin/µg DNA wurden getrennt mit OPTIMEM-Medium in einem Volumen von je 250 µl verdünnt. Anschliessend wurden die beiden Lösungen vorsichtig miteinander gemischt und zur Ausbildung von DNA-beladenen Phospholipid-Partikel für 30 min bei RT inkubiert. Von den Zellen wurden 500 µl OPTIMEM abgezogen und durch den Transfektions-Mix ersetzt. Nach 6stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die transfizierten NIH3T3 Zellen mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst, mit Medium resuspendiert, für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und in DMEM-Medium aufgenommen. $1-2 \times 10^4$ der transfizierten Zellen wurden auf einem 8-Kammer Objektträgers ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die auf dem 8-Kammerobjektträger befindlichen transfizierten Zellen wurden im Anschluss für die immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen und entsprechenden Färbungen bereitgestellt.

3.2.5.3 Generierung rekombinanter Retroviren

Für die Generierung rekombinanter Retroviren wurden Phoenix eco Verpackungszelllinien verwendet. Die retroviralen gag-, pol- und env-Gene sind stabil in das Genom der Verpackungszellen integriert, wobei das Verpackungssignal für diese Gene deletiert ist.

Am Tag vor der Transfektion wurden $3-4 \times 10^6$ Phoenix eco Zellen auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Phoenix eco Zellen mit verschiedenen retroviralen Plasmide (pMSCV2.2-IRES-GFP bzw. pMSCV mit variablen Slfn-cDNAs) und zusammen mit dem pM13-Plasmid, welches die Expression von exogenen gag-pol-Gene reguliert, mittels Calciumphosphat-Transfektion für 8-12h bei 37°C und 5-7% CO₂ kotransfiziert. Im Anschluss wurde das DMEM-Medium gewechselt. 24h nach Transfektion wurde das DMEM-Medium abgenommen und die Phoenix-Zellen erneut mit 6 ml DMEM-Medium versetzt. 48 h und 72 h nach Transfektion wurde der retrovirale Überstand mit einer

10 ml Kanüle abgenommen und durch ein 0,45µm Filter (Schleicher&Schuell) gedrückt. Der virale Überstand wurde entweder direkt für die Transduktion der Zielzellen verwendet oder für spätere Anwendungen zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.5.4 Retrovirale Transduktion von NIH3T3 Fibroblasten

Am Tag vor der Transduktion wurden 2×10^5 , in machen Fällen auch 4×10^5 , NIH3T3 Fibroblasten auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät. Am Tag der Transduktion wurde entweder der retrovirale Titer direkt von den transfizierten Phoenix eco Zellen oder der eingefrorene retrovirale Überstand verwendet. Der retrovirale Überstand wurde mit Polybrene (1:1000; 4-8 µg/ml) vermischt und im Anschluss auf die NIH3T3 Fibroblasten Zellen geben. Die Transduktion erfolgte für 6-8 h unter normalen Zellkulturbedingungen. Der retrovirale Überstand wurde nach der Inkubation abgenommen und durch frisches DMEM-Medium ersetzt. Nach verschiedenen Zeitpunkten der Transduktion (24 h, 36 h, 48 h, 72 h) wurden die Fibroblasten für verschiedene weitere Analysen (Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie, Herstellung von Zelllysaten, usw.) zur Verfügung gestellt.

3.2.6 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Verfahren, das eine schnelle Bestimmung zellspezifischer Parameter erlaubt. Dabei wird in einem hydrodynamischen System ein Flüssigkeitsstrom erzeugt, das die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Zellen separat an einem Beobachtungspunkt vorbeiführt. An diesem Beobachtungspunkt wird ein durch Laser oder Quecksilberlampen erzeugtes Licht eingestrahlt. Basierend auf Lichtstreuungseffekten und Fluoreszenzen werden die spezifischen Messgrößen einzelner Zellen erfasst und ermöglicht ebenfalls die Sortierung von Zellen eine spezifischen Phänotyps aus einer heterogenen Zellsuspension.

3.2.6.1 Sortierung von transduzierten GFP-exprimierenden NIH3T3 Fibroblasten mittels FACS

NIH3T3 Fibroblasten wurden zunächst mit verschiedenen Retroviren transduziert und nach variablen Zeitpunkten mittels Trypsin/EDTA von den Kulturplatten gelöst. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und die Zellen in 1 ml PBS/2%BSA aufgenommen. Die lebenden GFP-positiven Zellen wurden von den nicht-

transduzierten GFP-negativen NIH3T3 Fibroblasten mittels Durchflusszytometrie separiert. Die Sortierungen wurden von der Servicegruppe von Toralf Kaiser durchgeführt.

3.2.6.2 Sortierung von spezifischen T-Zell-Populationen aus dem Thymus

Der isolierte Thymus von Slfn1-transgenen Mäusen der Linie10 und 1 sowie von Wildtyp C57/Bl6-Mäusen wurde mit DMEM-Vollmedium durch ein Metallsieb gedrückt. Die Zellen wurden vorsichtig resuspendiert und für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Die Suspensionszellen wurden in DMEM-Vollmedium aufgenommen, mittels einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschliessend mit den jeweiligen Antikörpern, die mit variablen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, für 20-30 min bei 4°C inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden mit 1xPBS/2%BSA gewaschen, abzentrifugiert und in 1 ml 1xPBS/2%BSA aufgenommen. Die Sortierung von CD4⁺-, CD8⁺-, CD4⁺CD8⁺-, CD4⁻CD8⁻- und CD4⁻CD8⁻CD25⁺CD44⁻-T-Zellen wurde von der Servicegruppe von Toralf Kaiser durchgeführt. Die sortierten Thymozyten wurden in 1 ml Trizol aufgenommen und für die Isolierung der mRNA verwendet.

3.2.6.3 Analyse von Einzelzellsuspensionen mittels durchflusszytometrischer Analyse

Isolierte und aufgereinigte Zellen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt. Die gefärbten Zellsuspensionen wurden mit einem FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Mountain View, USA) analysiert. Die Zellsuspension wurde bis zum Einmessen bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Auswertung der FACS-Analysen wurde die Cell Quest Software benutzt.

3.2.6.4 MACS-Zellsortierung (magnetic associated cell sorting)

Die Sortierung von Zellen mit dem MACS-Separationskit wurde nach den Protokollen des Herstellers durchgeführt. Die mit Mikrobeads-konjugierten Antikörper (Ak.) und das Equipment für die Zellsortierung (z. B. LS-Separationssäulen, Magnete usw.) wurde von der Firma Miltenyi Biotech verwendet.

Einzelzellsuspensionen von Lymphknoten oder Milz wurden entweder direkt mit einem Mikrobeads-konjugierten anti-CD4 und mit einem anti-CD8-Antikörper oder primär zunächst mit einem FITC-konjugierten anti-CD4- und mit einem anti-CD8-Antikörper und dann mit einem Mikrobeads-konjugierten anti-FITC-Antikörper behandelt und für 20 min bei 4°C inkubiert. Die MACS-Säulen wurden mit dem gleichen Puffer equilibriert und die Zellen

wurden mit PBS/ 2% BSA gewaschen. Die Zellen wurden auf MACS-Säulen gegeben, 3x mit PBS/ 2% BSA gewaschen und anschliessend mit dem gleichen Puffer eluiert. Die Zellen wurden entweder für Proliferationsanalysen oder für die RNA-Isolierung und damit für Expressionsanalysen verwendet.

3.3 Methoden zur Induktion, zum Nachweis und zur Inhibition von Apoptose

3.3.1 Apoptoseinduktion von NIH3T3 Fibroblasten mittels Staurosporine

1×10^6 NIH3T3 Fibroblasten wurden am Tag vor der Apoptoseinduktion auf eine 10 cm Zellkulturplatte ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde komplettes DMEM-Medium mit Staurosporine in einer Endkonzentration von 2 μM zu den Zellen gegeben. In Abhängigkeit von der experimentellen Fragestellung erfolgte die Apoptoseinduktion für 1-8 h. Die apoptotischen Zellen wurden mittel Trypsin/EDTA geerntet, mit 1 x PBS gewaschen und entweder in 2x SDS-Zelllysis-Puffer aufgenommen oder für Zellzyklus- oder FACS-Analysen verwendet.

3.3.2 Nachweis von Apoptose mittels Annexin V

In der frühen Phase der Apoptose erfolgt eine Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der Innen- zur Aussenseite der Zellmembran. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin (Vermees et al., 1995) und kann daher als Nachweismolekül für die Exposition von PS auf die Plasmamembranaussenseite apoptotischer Zellen dienen. In der späten Phase der Apoptose kommt es zum Verlust der Membranintegrität der sterbenden Zellen, wobei PS auch auf der Membraninnenseite für Annexin V zugänglich ist. Um die späte Phase von der frühen Phase der Apoptose zu unterscheiden, setzt man zur Färbungslösung Propidiumiodid (PI) hinzu. In der späten Phase der Apoptose können Propidiumiodid und Annexin V in die Zellen eindringen, wobei PI mit der genomischen DNA interkaliert und Annexin V mit der PS der Zellinnenmembran.

Transduzierte und sortierte GFP positive NIH3T3 Fibroblasten wurden in 200 μl AnnexinV-Bindungspuffer aufgenommen und mit 1 μl Annexin V-Cy5-Färbelösung versetzt. Nach einer 20minütigen Inkubation wurden die Zellen mit 1xAnnexin V-Bindungspuffer gewaschen und in 400 μl vom gleichen Puffer mit Propidiumiodid aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.3.3 Bestimmung des DNA -Gehaltes mittels Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts einer Zelle wurde der DNA-Farbstoff Propidiumjodid (Sigma) verwendet, das ähnlich wie Ethidiumbromid mit dem DNA-Doppelstrang interkaliert. Zur Analyse wurden NIH3T3 Fibroblasten mit verschiedenen rekombinanten SIfn-Retroviren transduziert. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Transduktion (24h, 48 h) wurden die gesamten Zellen mittels Trypsin/EDTA geerntet, mit 10 ml DMEM-Vollmedium vermischt, bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert und in 1 ml 1x PBS/2% BSA resuspendiert. Die transduzierten GFP positiven Zellen wurden von den nicht-transduzierten GFP negativen Fibroblasten mittels FACS sortiert. Die sortierten Fibroblasten wurden für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und in 100 µl 1x PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde tropfenweise zu 3 ml gekühltem 70 %igem Ethanol gegeben und für <2h bei 4°C fixiert. Die Fibroblasten wurden erneut bei 1200 rpm für 5 min abzentrifugiert, mit 3 ml 1x PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation mit 1 ml Propidiumjodid-Färbelösung resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei RT wurde die Zellsuspension erneut abzentrifugiert, mit 1x PBS gewaschen, in 1ml 1x PBS/2%BSA aufgenommen und der durchflusszytometrischen Analysen unterzogen.

3.3.4 Nachweis von Apoptose durch DNA-„Laddering“

Im Endstadium der Apoptose wird die mit Histonen zu Nukleosomen verpackte DNA in den internukleosomalen Regionen durch DNAsen, die während des programmierten Zelltods aktiviert werden, in 180bp-Fragmenten und ein vielfaches von diesen geschnitten. Die DNA-Fragmente werden aus dem Kern in das Zytoplasma der Zelle ausgeschleust und eignen sich daher für den Nachweis apoptotischer Zellen.

Die mit den verschiedenen rekombinanten Retroviren transduzierten NIH3T3 Fibroblasten wurden nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Die gesamte genomische DNA wurde mittels Aussalzmethode isoliert, in einem 0,8 %igem Agarose-Gel aufgetrennt und in der UV-Geldokumentation analysiert und dargestellt.

3.3.5 Nachweis von aktiven Caspasen durch den FITC-konjugierten Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK-FITC)

Am Tag vor der Transduktion wurden 4×10^5 NIH3T3 Fibroblasten auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät. Am Tag der Transduktion wurden die rekombinanten Retroviren (pMSCV, pMSCV-SIfn1) mit Polybrene (1:1000; 4-8µg/ml) vermischt, im Anschluss auf die

NIH3T3 Fibroblasten geben und für 8 h im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ auf den Zellen belassen. 24h, 36h oder 48h nach Beginn der Transduktion wurden die Zellen geerntet, mit 1xPBS gewaschen, in 500 µl komplettem DMEM-Medium aufgenommen und mit 1µl Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK-FITC; 100 µM Endkonzentration, Promega) versetzt. Nach 15minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen erneut in 1xPBS gewaschen und für die durchflusszytometrischen Analysen bereitgestellt.

3.3.6 Inhibition der Apoptose durch Verwendung von Caspase-Inhibitoren (Z-VAD-FMK) bzw. p38-MAPK-Inhibitoren (SB203580)

Am Tag vor der Transduktion wurden 4×10^5 NIH3T3 Fibroblasten auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät. Am Tag der Transduktion wurden die rekombinanten (pMSCV, pMSCV-Slfn1) mit Polybrene (1:1000; 4-8µg/ml) vermischt und für 8h auf den NIH3T3 Fibroblasten im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ auf den Zellen belassen. Nach der Inkubation wurde der retrovirale Überstand von den Zellen abgenommen. Komplettes DMEM-Medium wurde entweder mit dem p38-MAPK-Inhibitor (SB203580) in einer Endkonzentration von 5µM oder mit dem Caspase-Inhibitor (Z-VAD-FMK) in einer Endkonzentration von 20µM versetzt und im Verlauf von 64h auf den Zellen belassen. Aufgrund der Tatsache, dass beide Inhibitoren in DMSO gelöst sind, wurden äquivalente Mengen an DMSO auf kontroll-transduzierte NIH3T3-Fibroblasten gegeben. Sowohl die Zahl der lebenden als auch die Zahl der toten Zellen wurden 72h nach Transduktion bzw. 64h nach Zugabe der jeweiligen Inhibitoren unter Verwendung von Trypan-Blau bestimmt.

3.3.7 Nachweis und Induktion von Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER)

Am Tag vor der retroviralen Transduktion oder vor der ER-Stress-Induktion wurden 4×10^5 NIH3T3 Fibroblasten auf 10 cm Zellkulturplatten ausgesät. Für die ER-Stress-Induktion wurden die Zellen am darauffolgenden Tag zunächst auf den Platten gewaschen und anschliessend mit komplettem DMEM-Medium mit Thapsigargin in einer Endkonzentration von 2 µM versetzt und im Verlauf von 1h, 3h und 5h auf den Zellen belassen. Für die retrovirale Transduktion wurden rekombinante pMSCV und pMSCV-Slfn1 Retroviren mit Polybrene (1:1000; 4-8µg/ml) vermischt, auf die NIH3T3 Fibroblasten geben, für 8 h im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ auf den Zellen belassen und nach Beginn der Transduktion für weitere 24h, 36h oder 48h kultiviert. Die Zellen wurden nach den jeweiligen Inkubationszeiten geerntet und für die Präparation der mRNA in Trizol aufgenommen. Die

isolierte mRNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und für die PCR-Analysen zur Verfügung gestellt.

3.4 Präparation und Aufreinigung von Lymphozyten aus verschiedenen Organen

3.4.1 Präparation von Lymphozyten aus Lymphknoten, Thymus und Milz

Die apikalen und mesenterischen Lymphknoten, der Thymus und die Milz von Wildtyp (C57BL/6) bzw. transgenen Mäusen (CD2-Slfn1 Linie1 und Linie10, CD2-Slfn4 Linie 2 und Linie 11 und CD2-Slfn8) wurden separat isoliert und jeweils in 10 ml komplettem DMEM-Medium aufgenommen. Die Organe wurden im Anschluss vorsichtig durch ein Metallsieb aus Eisen gedrückt und die Zellen mittels einer Pipette resuspendiert. Die Einzelzellsuspensionen wurden zur Abtrennung von Zellklumpen durch ein 70 µm Filter pipettiert und für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml 1x PBS/4% BSA oder in 10 ml komplettem DMEM-Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde nach Methode 3.2.4. bestimmt.

3.4.1.1 Lyse von Erythrozyten aus Zellsuspensionen mit Ammoniumchloridpuffer

Erythrozyten sind ein großer Bestandteil der Milz und können sich störend auf die Bestimmung der absoluten Zellzahl und bei der Ausführung von durchflusszytometrischen Analysen auswirken. Dieser negative Aspekt macht es notwendig die Erythrozyten durch entsprechende Bedingungen von den Lymphozyten zu trennen, ohne dass dies einen Einfluss auf die Lymphozytenpopulation hat.

Die Einzelzellsuspension aus 3.4.1. wurde zunächst für 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert und in 1 ml Erythrozyten-Lysispuffer aufgenommen. Nach einer 2-5minütigen Inkubation wurde 10 ml komplettes DMEM-Medium dazugegeben, resuspendiert, erneut bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und in 10 ml komplettem DMEM-Medium aufgenommen.

3.4.1.2 Aufreinigung von Lymphozytenpopulationen mittels Lympholyte M

Lympholyte-M kann in einem einfachen Protokoll für die Eliminierung von Erythrozyten, toten Zellen und Zellrückständen von Lymphknoten-, Thymus- und Milzsuspensionen benutzt werden.

Die unter 3.4.1. gewonnene Einzelzellsuspension (max. 2×10^7 Zellen/ml Medium) wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette tropfenweise auf die 5 ml Lympholyte M Lösung gegeben. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 1000-1500xg bei RT wurde die Lymphozytenschicht in der Interphase vorsichtig abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Reduktion der Dichte wurden zu der Zellsuspension 10 ml Medium hinzugegeben. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 800xg wurde das Zellpellet 2x in 1x PBS resuspendiert und gewaschen.

3.4.1.3 Präparation von Intraepithelialen Lymphozyten (IELs) aus dem Dünndarm

Der Dünndarm einer Maus wird präparativ entfernt und der Länge nach aufgeschnitten. Der im Dünndarm befindliche Restkot wurde durch vorsichtiges Schütteln in 1xPBS entfernt. Im Anschluss wurde der gesamte Darm in 50 ml komplettem DMEM-Medium bei 150 rpm und bei 37°C für 30 min geschüttelt. Der Darm wurde anschliessend 2x15 Sekunden per Hand geschüttelt und danach aus der Suspension entfernt. Die Zellsuspension wurde vorsichtig homogenisiert und für 5 min bei 1200 rpm und bei Raumtemperatur durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde in 3 ml 40%igem Percoll resuspendiert und danach auf einer 70%igen Percolllösung überschichtet. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm und bei 4°C wurden die IELs aus der intermediären Phase abgenommen. Zur Beseitigung des restlichen Percolls wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und anschliessend in DMEM-Medium aufgenommen.

3.4.1.4 Präparation von Lymphozyten aus der Leber

Die gesamte Leber wurde zunächst perfundiert und aus der Maus entfernt. Aus der Leber wurde im Anschluss eine Einzelzellsuspension gefertigt. Das Zellpellet wurde nach 5minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm in 3 ml 40%igem Percoll resuspendiert. Die Percoll-Zellsuspension wurde auf eine 70%igen Percolllösung überschichtet und die intermediäre Phase nach 30minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm und bei 4°C abgenommen. Die Zellen wurden 2x mit 1xPBS gewaschen und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde zur Beseitigung der restlichen Erythrozyten mit dem entsprechenden Lysis-Puffer behandelt. Die Lymphozyten wurden nach erneuter Zentrifugation in Zellkulturmedium aufgenommen und für weitere Analysen bereitgestellt.

3.4.1.5 Aufreinigung von Lymphknoten-T-Zellen mittels Nylonwolle

Vor der Lymphknoten-Isolierung aus der Maus wurde eine Säule mit Nylonwolle mit 37°C warmem Medium in einem Inkubator bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 % für 45-60 min equilibriert. Aus den isolierten Lymphknoten der Maus wurden Einzellzellsuspensionen hergestellt und die Erythrozyten wie beschrieben durch Lyse aus der Suspension entfernt. Die Zellen wurden im Anschluss in 3-4 ml vorgewärmten Medium aufgenommen, auf die equilibrierte Säule gegeben und in die Säule defundieren gelassen. Die Zellen auf der Säule wurden anschliessend bei 37°C und 5 % CO₂ für 45 – 60 min im Inkubator belassen. Die nicht-adhärierenden T-Zellen wurden von der Säule mit 37°C vorgewärmtem Medium eluiert. Die aufgereinigten T-Zellen wurden gewaschen, zentrifugiert, in Medium resuspendiert, gezählt und für weitere Experimente zur Verfügung gestellt.

3.5 Proliferations-Experimente mit aufgereinigten Lymphknoten-T-Zellen

3.5.1 Stimulation von aufgereinigten Lymphknoten-T-Zellen durch immobilisierte Antikörper (anti-CD3)

Die Stimulation von C57BL/6 und von Slfn1-transgenen T-Zellen erfolgte entweder über CD3 alleine oder über CD3 in Kombination mit dem kostimulatorischen Molekül CD28 durch Bindung von monoklonalen Antikörpern an diesen Oberflächenmolekülen. Die Antikörper wurden in verschiedenen Konzentrationen entweder auf 96-Loch, 24-Loch oder 6-Loch Kunststoff-Mikrotiterplatten (NUNC) immobilisiert. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen von Maus-anti-CD3 Antikörper in 1x PBS hergestellt (0,03; 0,06; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8; 10 µg/ml). Für die Beschichtung der Platten wurden 200 µl der Antikörpersuspension/Loch über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Platten 2x mit 1x PBS gewaschen und die Zellen in Abhängigkeit vom Aktivierungstest in folgenden Konzentrationen auf den Platten verteilt (für 96-Loch Mikrotiterplatten: 4*10⁵ aufgereinigte T-Zellen/Loch; für 24-Loch Mikrotiterplatten: 2x10⁶ aufgereinigte T-Zellen/Loch und für 6-Loch Platten 1*10⁷ aufgereinigte T-Zellen/Loch). Bei Kostimulation über das CD28-Oberflächenmolekül wurde zur T-Zellsuspension anti-CD28 Antikörper in einer Konzentration von 10µg/ml dazugegeben.

Für die Untersuchungen der T-Zellproliferation im 96-Loch-Format wurden nach 72stündiger T-Zell-Stimulation 1µCi ³H-Thymidin dazugegeben. Die Inkubation erfolgte für 6-8h bei 37°C. Der Einbau von ³H-Thymidin in die aktivierten T-Zellen wurde im TopCount NXT™ β counter (Packard Instrument Co.) gemessen.

3.5.2 Stimulation von aufgereinigten Lymphknoten-T-Zellen mittels PMA/Ionomycin

4×10^5 aufgereinigte Lymphknoten-T-Zellen (C57BL/6 und Slfn8-transgenen Mäusen) wurden pro Loch einer 96 Loch-Platte ausgesät und mit PMA (Sigma) in einer Endkonzentration von 50 ng/ml und Ionomycin (Sigma) in einer Endkonzentration von 1 μ M für 72 h aktiviert. Durch Zugabe von 1 μ Ci 3 H-Thymidin/Loch wurde der Einbau von 3 H-Thymidin in den aktivierten T-Zellen nach 6-8stündiger Inkubation im TopCount NXT™ β counter (Packard Instrument Co.) gemessen.

3.6 Bestimmung der Menge an sekretierten IL-2 und IFN γ nach T-Zellaktivierung mittels ELISA

Aufgereinigte Lymphknoten-T-Zellen (4×10^5 Zellen/Loch einer 96-Lochplatte) wurden mit verschiedenen Mengen an immobilisierten anti-CD3-Antikörper (0; 0,06; 0,2; 0,8; 2; 4 μ g/ml) oder in Verbindung mit löslichen anti-CD28 Antikörper (10 μ g/ml) stimuliert. 24h bzw. 48h nach Aktivierung wurden 150 μ l des Kulturüberstandes abgenommen, wobei 50 μ l bzw. 100 μ l für die Bestimmung der IL-2- bzw. der IFN γ -Konzentration verwendet wurden. Partiiell wurden auch Verdünnungen von Kulturüberständen hergestellt. Die am Vortag mit 1 μ g/ml anti-IL2- bzw. anti-IFN γ -Antikörper markierten 96-Lochplatten wurden 3x gewaschen und zur Sättigung von unspezifischen Bindungsstellen auf den Platten mit 200 μ l/PBS, 1% BSA pro Loch für 1h bei 37°C behandelt. Nach jeder weiteren Inkubation erfolgt ein dreifacher Waschschrift mit 1xPBS, 0,05% Tween20. 50 μ l des Kulturüberstandes wurden auf die Platten gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zu den verschiedenen Ansätzen wurde ein mit Biotin-konjugierter anti-IL2- bzw. anti-IFN γ -Antikörpern (100 μ l/Loch), die ein anderes Epitop der sekretierten Zytokine erkennt, gegeben und für 1h bei 37°C auf den Platten belassen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe einer mit Streptavidin-konjugierten Alkalische Phosphatase (Dianove; Verdünnung 1:2000; 100 μ l/Loch). Nach 1stündiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von 50 μ l einer Substratlösung für die alkalische Phosphatase. Die Reaktion erfolgte unter Ausschluss von Licht für ca. 15 min bei RT. Die enzymatische Reaktion wird mit 50 μ l 0,5 M EDTA pH 8,0/Loch abgestoppt. Die Messung des umgesetzten Substrates wurde photometrisch bei 405 nm in einem ELISA-Reader (Spectra MAX 250; Molecular Devices, Dt) gemessen.

3.7 In vitro Überleben von Lymphknoten-T-Zellen ohne mitogene Stimulation

Die lateralen und mesenterischen Lymphknoten wurden aus 8-10 Wochen alten Wildtyp bzw. CD2-Slfn1-transgenen Mäusen der Linie 10 isoliert und mittels Nylonwolle, wie beschrieben, aufgereinigt. 1×10^6 aufgereinigte T-Zellen wurden in 200 μ l komplettem DMEM-Medium aufgenommen und in 1 Loch einer 96 Loch-Platte gegeben. Die Gesamtzahl an lebenden und toten T-Zellen wurde in dreifachen Ansätzen nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h unter Verwendung von Trypan-Blau mikroskopisch bestimmt.

3.8 Bakterielle Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes*

3.8.1 Bakterielle Infektion

Wildtyp-Mäuse und heterozygote Slfn1-transgene Mäuse der Linie 10 wurden am Tag 0 (d0) mit 5×10^3 OVA-exprimierenden Listerien (*Listeria monocytogenes*) infiziert. Die Bakterien wuchsen über Nacht in TSB-Medium und wurden am darauf folgenden Tag 2x mit PBS gewaschen. Die Bakterien wurden in PBS und 10% Glycerol aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die bakterielle Infektion wurden die Aliquots aufgetaut. Für die intravenöse Infektion (i.v.) wurden die entsprechenden Mengen an Bakterien in 200 μ l 1x PBS aufgenommen und im Anschluss den Mäusen lateral in die Mausschwanzvene injiziert. Nach entsprechenden Zeitpunkten (d0, d3, d5, d9, d15) wurden die zu analysierenden Organe isoliert und für die jeweiligen Experimente aufbereitet.

3.8.2 Bestimmung der CFU (colonie forming units) in der Milz und Leber von infizierten Mäusen

Zur Bestimmung der bakteriellen Belastung der Milz und der Leber wurden die Organe aus den infizierten und nicht-infizierten Mäusen präparativ entfernt, in einer reissfesten Kunststofftüte mit 1 ml 1xPBS überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Aus den Organen wurden homogene Suspensionen und serielle Verdünnungen (unv., 1:10, 1:100 und 1:1000) hergestellt. 50 μ l des unverdünnten und verdünnten Zellhomogenats wurden auf TSA-Agar-Platten (tryptic soy broth agar plates) gleichmäßig verteilt und für 24h in einem 37°C warmen Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zählung der Bakterienkolonien.

3.8.3 In vitro Restimulation von Milzzellen und die Bestimmung der Zytokin-Expression mittels durchflusszytometrischer Analyse

Zunächst wurde eine Einzelzellsuspension von den Milzen der Listerien-infizierten und nicht-infizierten Mäuse gefertigt. Die roten Blutzellen wurden wie beschrieben lysiert. Die Milzzellen wurden 2x mit komplettem RPMI-Medium 1640 gewaschen. Für die Bestimmung der Zytokinexpression wurden 4×10^6 Zellen in 1ml komplettem RPMI-Medium kultiviert. Die Zellen wurden für 5h entweder mit einem Listeriolysin-Peptid (Aminosäure 190-201; LLO₁₉₀₋₂₀₁; NEKYAQAYPNVS) in einer Konzentration 10^{-6} M oder mit einem Gemisch aus drei Formyl-Methionin-Peptiden, die von Listerien-Proteinen stammen (fMIGWII, fMIVIL und fMIVTLF) oder mit Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ (OVA₂₅₇₋₂₆₄, SIINFEKL) stimuliert. Während der letzten 4h der Stimulation wurden 10µg/ml Brefeldin A zugegeben. Die kultivierten Zellen wurden gewaschen und für 10 min mit einem anti-Ratten-IgG-Antikörper und einem anti-CD16/CD32 monoklonalen Antikörper (mAK) inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Die Zellen wurden mit einem Cy-5-konjugierten anti-CD4 mAk. oder einem anti-CD8 mAk für 30 min auf Eis gefärbt, mit 1xPBS gewaschen und für 20 min bei RT mit 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden gewaschen (PBS/0,1% BSA), permeabilisiert (1xPBS/0,1%BSA;/0,5% Saponin) und mit einem anti-rat-IgG-Antikörper und einem anti-CD16/CD32 monoklonalen Antikörper inkubiert. Nach 5 Minuten wurde ein FITC-konjugierter anti-INF γ -mAk. oder ein Antikörper des gleichen Isotyps als Kontrolle zum Farbanatz hinzugegeben. Nach weiteren 20min bei RT wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und mit PBS; 1 % Paraformaldehyd fixiert. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden 2×10^6 Zellen für 15 min bei 4°C mit einem rat-IgG-Antikörper, einem anti-CD16/CD32 mAk. und mit Streptavidin (Molecular Probes) in PBS; 0,5% BSA; 0,01% Natriumazid inkubiert. Die Zellen wurden für 1h bei 4°C mit einem Cy5-konjugierten anti-CD8 α mAk., einem FITC-konjugierten anti-CD62L mAk. und mit PE-konjugierten MHC-Klasse-I-OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetrameren gefärbt, im Anschluss mit 1xPBS; 0,5% BSA; 0,01% Natriumazid gewaschen und in 1xPBS verdünnt. H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetramere wurden von Dr. Miso Kursar bereitgestellt. Vor der Vier-Farben FACS-Analyse wurde zu den Tetramer-Färbungen Propidiumiodid hinzugegeben.

3.9 Immunfluoreszenzmikroskopie und Konfokale Mikroskopie

NIH3T3-Fibroblasten wurden mit verschiedenen Slfn-exprimierenden Expressionsvektoren (pCMV-Slfn1, pCMV-Slfn4, pCMV-Slfn5, pCMV-Slfn 8-10) unter Verwendung des

Lipofektamin 2000-Reagents transfiziert. Nach der Transfektion wurden $3-4 \times 10^4$ Zellen/Kammer auf ein Glasobjektträger mit 8 Kammer übertragen. Für die Adhäsion der Zellen auf den Glasobjektträger wurden diese über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen auf dem Objektträger mit 1xPBS gewaschen und zur Fixierung für 20-30 min bei RT mit 4 % PFA inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen durch eine 10minütige Inkubation mit 1xPBS/0,1% TritonX100 permeabilisiert. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden im Anschluss für 30 min mit 1xPBS/Tween/0,5 % BSA behandelt, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. Die exprimierten Slfn-Proteine enthalten ein amino-terminales Myc-Epitop, das vom anti-humanen myc monoklonalen Antikörper (1-9E10.2) (ATCC CRL-1729) detektiert werden kann. Dieser Antikörper wurde in 1xBlockpuffer 1:200 verdünnt und für 30 min auf die Zellen gegeben. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit dem sekundären FITC-konjugierten Ziege anti-Maus IgG Antikörper für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden 2x15 min bei RT mit 1xPBS gewaschen, nach dem Entfernen der Kammern mit einem Deckgläschen bedeckt und für die mikroskopischen Analysen bereitgestellt. Die Analysen erfolgten mit einem Leica TCS-SP konfokalen Laserscanner, ausgestattet mit einem DMIRB-Mikroskop oder mit einem Leica DMRIB Fluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit einer HV-204 Hitachi Video-Kamera und der DISKUS Software (Mikrovid). Die individuellen Scans wurden unter Verwendung der TCS-NT Software und Adobe Photoshop analysiert.

3.10 Generierung von slfn1-, slfn4- und slfn8-transgenen Mäusen

Die slfn1-, slfn4- und slfn8-cDNAs wurden in der VACD2-Kassette (Zhumbekov et al., 1995) kloniert, welche die transgene Expression hauptsächlich im T-Zellkompartiment und im frühen Stadium während der B-Zellentwicklung induziert (deBoer et al., 2003). Nach dem Entfernen der prokaryontischen Vektorsequenz wurden die VACD2- slfn1-, slfn4- und slfn8-Konstrukte in CBAxC57BL/ F2 Embryonen injiziert. Die Pronukleus-Injektion wurde von Karin Bordasch durchgeführt.