

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungs-Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Alle Materialien für die Zellkultur waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung in einem Autoklaven bei 120 °C mit Wasserdampf sterilisiert.

3.1.2 Kultivierung von HEK293 und SW480 Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte in DMEM-Medium (DMEM High Glucose (4,5 g/l), 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 % (v/v) Glutamax) auf Zellkulturplatten.

3.1.3 Kultivierung von HT29 Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte in RPMI 1640-Medium (RPMI 1640-Basismedium, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 % (v/v) Glutamax) auf Zellkulturplatten.

3.1.4 Passagieren der Zellen

Zum Passagieren wurden die konfluent gewachsenen Zellen zweimal mit Dulbecco's-PBS gewaschen und für ca. 2 bis 5 min mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Nach Absaugen der Trypsinlösung wurden die Zellen durch leichtes Klopfen von der Zellkulturschale gelöst und durch mehrfaches Pipettieren mit frischem Medium vereinzelt. Zur vollständigen Entfernung der Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen schonend zentrifugiert (4 min, 310 × g, RT), in frischem Medium aufgenommen und in der Regel in einer 1:10 Verdünnung ausgesät. Das

Passagieren der Zellen erfolgte alle 3-5 Tage.

Um Zellen in einer definierten Dichte auszusäen, wurde die Zellzahl der abgelösten Zellen, nach Färbung mit Trypanblau, in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zelldichte durch Zugabe von Medium eingestellt.

3.1.5 Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Trypanblau-Lösung: 0,5 % (w/v) Trypanblau in PBS

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden diese mit Trypanblau versetzt. Während vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und sind tiefblau gefärbt.

20 μ l einer Zellsuspension wurden mit 20 μ l Trypanblau-Lösung gemischt, etwa 5 min bei RT inkubiert und zum Füllen einer Neubauer-Zählkammer verwendet. Grundsätzlich wurden mindestens zwei Großquadrate ausgezählt. Die Zelldichte berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}$$

3.1.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung wurden von den Zellen Gefrierkulturen in Gefriermedium angelegt, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

Gefriermedium: DMEM- bzw. RPMI 1640-Medium, 10 % (v/v) DMSO, 20 % (v/v) FKS

Einfrieren der Zellen:

Nach Ablösen der Zellen einer konfluent gewachsenen Zellkulturschale (ca. 1×10^7 Zellen), wurden diese zentrifugiert (4 min, $310 \times g$, RT) und in 1 ml Gefriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Kryoröhrchen überführt und mit Hilfe des Zelleinfriergeräts Nicool LM10 (30 min Stufe 3, 10 min Stufe 10) in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend sofort in einen Stickstofflagertank überführt.

Auftauen der Zellen:

Um gelagerte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut und die Zellen sofort mit 10 ml vorgewärmten Kulturmedium gemischt. Zur Entfernung des Gefriermediums wurden die Zellen anschließend zentrifugiert (4 min, 310 × g, RT), in frischem Kulturmedium resuspendiert und in Kulturschalen überführt.

3.1.7 Transfektion von Zellen

Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Transfektionsmethode transient transfiziert.

2× HBS-Puffer (HEPES-buffered saline): 55 mM HEPES/NaOH pH 7,00-7,06, 274 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄

CaCl₂-Lösung: 2,5 M

Bei dieser Transfektionsmethode wird die in 250 mM CaCl₂-Lösung gelöste DNA langsam, unter ständigem Mischen in das gleiche Volumen einer 2× HBS Pufferlösung einpipettiert, so dass möglichst homogene DNA-Calciumphosphat-Copräzipitate entstehen. Diese werden nach Inkubation gleichmäßig und unter leichtem Schwenken in das Zellkulturmedium getropft. Die DNA-Calciumphosphat-Copräzipitate adsorbieren auf der Zelloberfläche und werden durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Für die Transfektionen wurden generell jeweils $7,5 \times 10^5$ Zellen in ein Well einer 6 Well-Platte ausgesät und für ca. 20 h kultiviert. 225 µl autoklaviertes, Millipore H₂O, 25 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung sowie die zu transfizierende DNA wurden zusammenpipettiert und mit 250 µl 2× HBS-Puffer versetzt. Es folgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die gebildeten DNA-Calciumphosphat-Copräzipitate wurden in das Kulturmedium der Zellen gegeben und im Begasungs-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach 7 h wurden die Zellen zweimal mit mit Dulbecco's-PBS gewaschen, mit frischem Medium versetzt und für weitere 40-42 h im Begasungs-Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Lyse der Zellen (s. 3.2.10, 3.3.12).

3.2 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.2.1 Proteinbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit der BCA-Methode bestimmt. Diese Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{1+} -Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung und der anschließend kolorimetrischen Bestimmung der Cu^{1+} -Ionen nach Komplexbildung mit Bicinchoninsäure (BCA) (Smith *et al.*, 1985). Der Bicinchoninsäure/ Cu^{1+} -Komplex ist violett gefärbt und zeigt ein Absorptionsmaximum bei 562 nm.

Jeweils 20 μl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 200 μl BCA-Reagenz versetzt und für 30 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Absorptionmessung erfolgte in einem Multiplate Reader gegen den verwendeten Puffer als Leerwert. Für die Erstellung einer Eichkurve wurde BSA in einem Konzentrationsbereich von 0,05-0,5 mg/ml in entsprechendem Puffer eingesetzt.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Elektrophoresepuffer: 24,8 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01 % (w/v) SDS

2x SDS-Probenpuffer: 65 mM Tris/HCl pH 6,8, 3 % (w/v) SDS, 30 % (w/v) Glycerin, 5 % (w/v) 2-Mercaptoethanol, 4 mg/ml Bromphenolblau, 4 mg/ml Pyronin G

Die Trennung von Proteingemischen erfolgte mit der von Laemmli (1970) beschriebenen diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Für die Elektrophorese wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem der Firma C.B.S für Gele der Größe 80 x 85 x 0,75 mm verwendet.

Die Acrylamidkonzentration des Sammelgels (Höhe ca. 2 cm) betrug 5,0 % und die des Trenngels (Höhe ca. 6 cm) 7,5 oder 10 %.

Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele:			
Lösungen	<u>Sammelgel 5,0 %</u>	<u>Trenngel 7,5 %</u>	<u>Trenngel 10 %</u>
30 % Acrylamid	0,50 ml	2,50 ml	3,33 ml
0,8 % Bisacrylamid			
1,5 M Tris/HCl pH 8,8		2,50 ml	2,50 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,83 ml		
10 % SDS	33,30 µl	100,00 µl	100,00 µl
ddH ₂ O	1,60 ml	4,79 ml	3,96 ml
10 % APS	33,30 µl	100,00 µl	100,00µl
TEMED	6,70 µl	13,40 µl	13,40 µl
Gesamtvolumen	3,00 ml	10,00 ml	10,00 ml
Anmerkung: Die angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf 2 Sammel- bzw. Trenngele.			

Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit 2× SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese wurde bei 13 mA gestartet, so dass die Proben langsam in das Sammelgel einwandern konnten und konzentriert wurden. Im Trenngel erfolgte die Elektrophorese bei einer Stromstärke von 20 mA bis die durch den Farbstoff Pyronin G definierte Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt war.

3.2.3 Proteinnachweis in SDS-Gelen durch Coomassie Brillant Blau-Färbung

Färbelösung: 30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ethanol, 0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R-250

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Essigsäure 96%, 40 % (v/v) Ethanol

Proteine können nach der Elektrophorese direkt im Polyacrylamid-Gel mit Coomassie Brillant Blau angefärbt werden. Coomassie Brillant Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Die

Nachweisgrenze für die Färbung liegt im Bereich von 0,1–2 µg Protein pro Bande. Zur Detektion der Proteine wurde das Gel für 30-60 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend so lange in Entfärberlösung geschüttelt, bis die proteinfreie Gelmatrix weitgehend entfärbt war. Die Entfärberlösung wurde dazu zwei- bis dreimal durch frische Lösung ersetzt.

3.2.4 Proteintransfer auf PVDF Membran

Transferpuffer:	Anodenpuffer 1:	300 mM Tris/HCl pH 9,4
	Anodenpuffer 2:	30 mM Tris/HCl pH 9,4
	Kathodenpuffer:	25 mM Tris/HCl, 40 mM Aminocaprinsäure, 0,1 % (w/v) SDS

Mit der von Towbin *et al.* (1979) eingeführten Methode des Elektrotransfers können gelelektrophoretisch getrennte Proteine auf Membranträger (z. B. Nitrocellulose, PVDF) übertragen werden. Die Proteine werden so weiteren Untersuchungen zugänglich gemacht.

Der Elektrotransfer erfolgte in einer Trans-Blot Semi Dry-Apparatur in einem diskontinuierlichen Puffersystem über einen Zeitraum von 15-25 min bei 2.8 mA/cm². Der Aufbau eines derartigen Blotsystems ist in Abbildung 3.1 dargestellt:

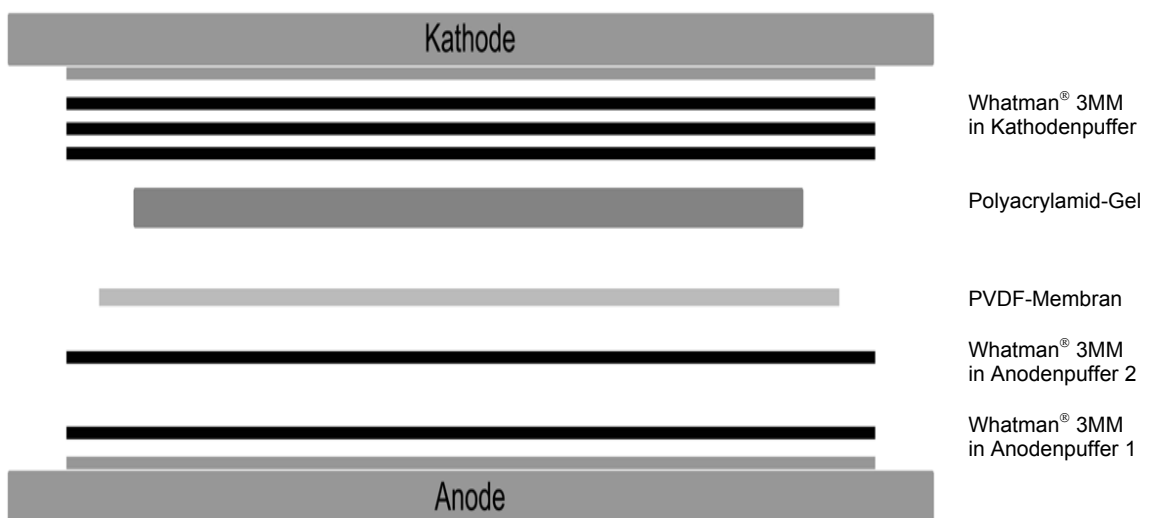


Abb. 3.1: Schema zum Aufbau eines Blotting-Sandwich im Semi-Dry Verfahren.

(Anmerkung: Whatman® 3MM = Filterpapier)

3.2.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF Membran (Western Blot)

TST-Puffer (Tris-Saline-Tween): 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20, 10 mM Tris/HCl pH 7,5

Nach dem Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran, können diese mit einem spezifischen Primärantikörper markiert und über einen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper mittels der enzymatischen Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrats nachgewiesen werden.

Um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen, wurde die PVDF-Membran in TST-Puffer 1 h lang blockiert. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit in TST-Puffer verdünnten Primärantikörper. Nach dreimaligem Waschen mit TST-Puffer für je 5 min, wurde die Membran weitere 30 min mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten, Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert, der ebenfalls in TST-Puffer verdünnt wurde. Im Anschluss folgten wiederum drei Waschschritte mit TST-Puffer für je 5 min.

Die Detektion der entstandenen Immunkomplexe erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers durch Behandlung mit einem Chemolumineszenz-Substrat (Lumi-Light Western Blotting Substrate) der Peroxidase. Das bei der enzymatischen Umsetzung des Substrats entstehende Lumineszenzsignal wurde mit Hilfe eines Lumineszenz-Imager oder Röntgenfilms detektiert. Die Expositionszeiten im Lumineszenz-Imager bzw. auf einem Röntgenfilm variierten je nach Signalstärke zwischen 30 s und 30 min.

3.2.6 Prokaryontische Expression von GST-LEF-1 Fusionsproteinen in *E. coli*

Die prokaryontische Expression von GST-LEF-1 Fusionsproteinen erfolgte mit Hilfe des pGEX-4T1 Vektors. In diesem Vektor wird die Expression über einen tac-Promotor reguliert, wodurch die Expression über Zugabe von IPTG induziert werden kann.

Die insertierten cDNAs werden dabei im Leseraster 3' zu der cDNA der Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* als Fusionsproteine exprimiert. Für die Reinigung der entsprechenden GST-LEF-1 Fusionsproteine wird die hochaffine Bindung der Glutathion-S-Transferase an Glutathion in Form einer Glutathion-Affinitätschromatographie ausgenutzt.

3.2.6.1 Induktion der Proteinexpression durch IPTG

LB-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Tryptone, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl

Expressionsmedium: LB-Medium, 1 % (w/v) Glucose, 50 µg/ml Ampicillin, 75 µg/ml Kanamycin

Die entsprechenden Expressionsplasmide wurden in *E. coli* BL21 (RE4) transformiert.

50 ml LB-Medium wurden mit Bakterien einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 500 ml Expressionsmedium wurden mit 5 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln (210 Upm) bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,7 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Stammlösung: 1 M) induziert und erfolgte für 1 h unter weiterem Schütteln bei 30 °C.

3.2.6.2 Aufschluss der Bakterien durch Ultraschallbehandlung

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10 min, 6000 x g, 4 °C) pelletiert, in 20 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 4,8 ml PBS unter Zugabe von 200 µl Complete™-EDTA Protease Inhibitor-Mix aufgenommen. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Ultraschallbehandlung (50 Pulse bei 40 W) mit einem Branson Sonifier. Der vollständige Aufschluss der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Unlösliche Zellfragmente wurden im Anschluss durch Zentrifugation abgetrennt (30 min, 20.800 x g, 4 °C) und verworfen. Aus dem Überstand wurde im weiteren Verlauf das Fusionsprotein über Affinitätschromatographie gereinigt. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt.

3.2.6.3 Affinitätschromatographische Reinigung des GST-LEF-1 Fusionsproteins

Elutionspuffer: 20 mM Glutathion in 0,1 M Tris/HCl pH 8,0

Zur Vorbereitung der affinitätschromatographischen Reinigung wurde eine Säule mit einem Gelbett von 1 ml Glutathion-Agarose Beads gegossen und zweimal mit 20 ml kaltem PBS äquiliert. Im Anschluss wurde der gewonnene Überstand des Bakterienlysats (s. 3.2.6.2) zweimal auf die Säule aufgetragen, um eine möglichst vollständige Bindung des exprimierten GST-Fusionsproteins zu erzielen. Nach drei Waschschritten mit je 10 ml kaltem PBS, wurde das Fusionsprotein in 0,5 ml Fraktionen mit 10 ml Elutionspuffer eluiert. Je 10 µl jeder Fraktion wurden entnommen und durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau Färbung analysiert. Fusionsprotein-haltige Fraktionen wurden vereinigt und gegen 10 mM Tris/HCl pH 8,0 dialysiert. Der Dialysepuffer wurde dreimal gewechselt. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt.

3.2.7 Pull-down von Kinasen aus HT29 Zellen

Zellysepuffer: 800 µl Lysepuffer, 64 µl Triton X-100 10 %, 36 µl Complete™ EDTA-free (Menge für eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 9 cm)

Lysepuffer: 0,1 M KCl, 0,3 M Sucrose, 10 mM Imidazol pH 6,8, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₂MbO₄, 1 mM NaVO₃, 0,2 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Triton X-100

Glutathione (GSH)-Agarose Beads: 50 % (w/v) in Lysepuffer

Kinasepuffer 1×: 40 mM Tris/HCl pH 8,0, 20 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,1 % (v/v) Triton X-100

Kinasepuffer 10×: 0,4 M Tris/HCl pH 8,0, 0,2 M MgCl₂, 20 mM DTT

Eine konfluent gewachsene Schale HT29 Zellen wurde in 900 µl Zellysepuffer lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (10 min, 20.800 × g, 4 °C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 5 µg GST-LEF-1 versetzt und unter konstanter Rotation bei 4 °C inkubiert. Nach 20 min wurden 40 µl einer GSH-Agarose Beads Suspension zugesetzt. Die Beads wurden nach 1 h Inkubation pelletiert (1 min, 2700 × g, 4 °C), dreimal mit je 400 µl Lysepuffer und anschließend zweimal mit je 400 µl 1× Kinasepuffer gewaschen. Die Elution der Kinasen von den Beads erfolgte in 30 µl 1× Kinasepuffer + 1 M NaCl. Die Beads wurden gemischt, zentrifugiert und der abgenommene Überstand 1:10 mit

27 μl 10 \times Kinasepuffer sowie 243 μl Millipore H₂O verdünnt.

Das verdünnte Eluat wurde in weitergehenden Experimenten eingesetzt (siehe 3.2.8 und 3.2.9).

3.2.8 Phosphoaminosäure-Analyse

Laufpuffer pH 1,9: 2,5 % (v/v) Ameisensäure, 7,8 % (v/v) Essigsäure 96 %

Laufpuffer pH 3,5: 5 % (v/v) Essigsäure 96 %, 0,5 % (v/v) Pyridin

Ninhydrin-Lösung: 0,25 % (w/v) in Aceton

Bei der Phosphoaminosäure-Analyse wird ein durch saure Proteinhydrolyse erzeugtes Aminosäuregemisch über eine zweidimensionale Elektrophorese auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte (DC-Platte) separiert. Die phosphorylierten Aminosäuren werden durch Autoradiographie detektiert und durch Vergleich der Lokalisation von Referenz-Phosphoaminosäuren identifiziert. Die Referenz-Phosphoaminosäuren werden über eine Ninhydrin-Färbung nachgewiesen.

Die Phosphoaminosäure-Analyse wurde nach der von van der Geer *et al.* (1995) beschriebenen Methode durchgeführt. Im ersten Schritt wurde GST-LEF-1 mit den aus HT29 Lysat isolierten Kinasen in Gegenwart von ³²P γ ATP phosphoryliert. Anschließend wurde GST-LEF-1 nach SDS-PAGE auf PVDF-Membran geblottet und nach Anfärben der Membran mit Amidoschwarz die GST-LEF-1 Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Für die Hydrolyse wurde das Membranstück in 200 μl 6 M HCl überführt und für 1 h bei 110 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Säure im Vakuum über eine Speed-Vac abgezogen und der Rückstand in 5 μl Laufpuffer pH 1,9 aufgenommen.

Das Hydrolysat wurde im nächsten Schritt in 0,1 μl Portionen auf eine 10 \times 10 cm große, mit Celluloseacetat beschichtete Dünnschichtchromatographie-Platte unter sofortigem Trocknen mittels Kaltluft aufgetragen. Als Standard wurden jeweils 0,5 μl einer Phosphoserin-, Phosphotyrosin- und Phosphothreonin-haltigen Lösung (je 1 mg/ml) mit aufgetüpfelt. Um den Verlauf der zweidimensionalen Elektrophorese verfolgen zu können, wurden zusätzlich 0,5 μl des Farbmarkergemischs (5 mg/ml N ϵ -2,4-DNP-L-Lysine und 1 mg/ml Xylencyanol FF) aufgetragen.

Vor dem Start der 1. bzw. 2. Dimension wurde die DC-Platte mit dem entsprechenden Laufpuffer befeuchtet. Dies geschah mit Hilfe einer im jeweiligen Laufpuffer getränkten Filterpapiermaske (Whatman® 3MM), die im Falle der 1. Dimension konzentrische Aussparungen für die Auftragungspunkte von Probe und Farbmaler enthielt.

Die zweidimensionale Auftrennung der Aminosäuren wurde auf dem horizontalen Hochspannungselektrophorese-System Multiphor II durchgeführt. Die DC-Platte wurde auf die Kühlplatte des Multiphor II gelegt und auf Seite der Anode und Kathode mit 2 cm breiten im jeweiligen Puffer getränkten Filterpapierstreifen versehen. Die 1. bzw. 2. Dimension wurde bei einer konstanten Spannung von 600 V für jeweils 20-25 min durchgeführt.

Die Detektion der Referenz-Aminosäuren erfolgte durch Besprühen der Dünnschichtplatte mit einer Ninhydrin-Lösung und anschließendem Trocknen bei 65 °C für 15 min. Die Aminosäuren wurden als violette Spots auf der DC-Platte sichtbar. Die radioaktiven Aminosäuren wurden durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Die Abbildung 3.2 zeigt schematisch das Phosphoaminosäure-Muster nach zweidimensionaler Elektrophorese:

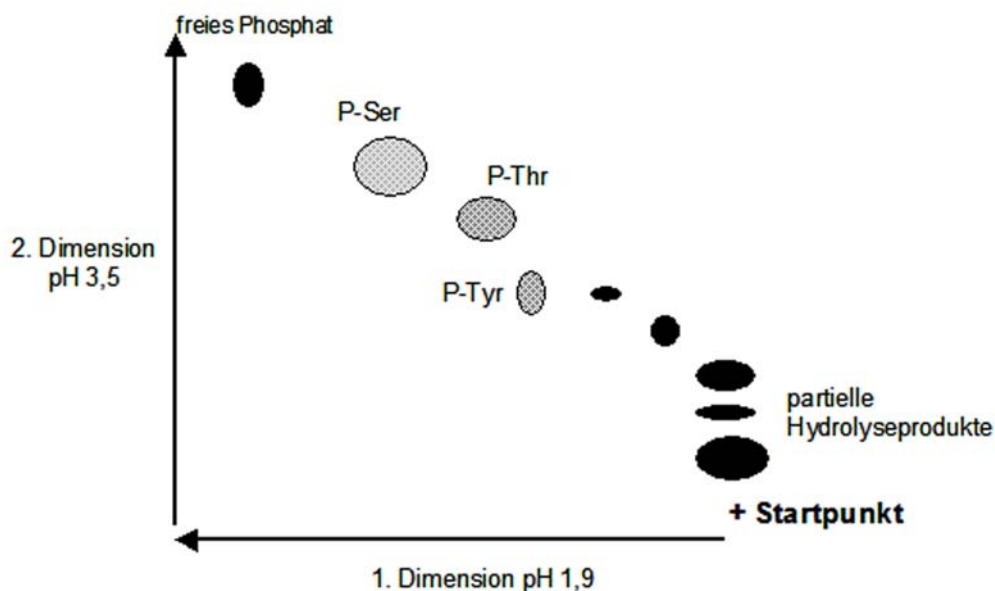


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Position der aufgetrennten Phospho-Aminosäuren nach zweidimensionaler Elektrophorese eines ^{32}P -gelabelten Phosphoproteins.

Neben den radioaktiv-markierten Phospho-Aminosäuren werden auch freies Phosphat sowie partielle Hydrolyseprodukte auf einem Röntgenfilm detektiert.

3.2.9 Kinasierungsassays

3.2.9.1 Kinasierung mit aus HT29 Zellen isolierten Kinasen

Kinasierungsmix: 2 μCi $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP}$ oder 2 μCi $^{32}\text{P}\gamma\text{GTP}$, 1 μl 10 \times Kinasepuffer (0,4 M Tris/HCl pH 8,0, 0,2 M MgCl_2 , 20 mM DTT) ad 10 μl H_2O (Menge für einen Ansatz)

Lysepuffer: 0,1 M KCl, 0,3 M Sucrose, 10 mM Imidazol pH 6,8, 2 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, 1 mM NaF, 1mM Na_2MnO_4 , 1mM NaVO_3 , 0,1 % (v/v) Triton X-100

Stop-Puffer: 0,1 M Na_2HPO_4 , 0,1 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 0,5 M EDTA pH 7,5

Glutathione (GSH)-Agarose Beads: 50 % (w/v) in Lysepuffer

100 μl des verdünnten Hochsalz-Eluats (siehe 3.2.7) wurden mit 1 μg GST-LEF-1 Fusionsprotein sowie 10 μl Kinasierungsmix versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Die Phosphorylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 50 μl Stop-Puffer beendet. Zur Isolierung der GST-LEF-1 Fusionsproteine wurden 200 μl Lysepuffer sowie 30 μl GSH-Agarose Beads zugegeben und der Ansatz 1 h bei 4 °C unter konstanter Rotation inkubiert. Die Beads wurden pelletiert (1 min, 2700 \times g, 4 °C) und dreimal mit je 400 μl Lysepuffer unter Zugabe von 0,2 % (w/v) BSA gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden durch 20 μl 2 \times SDS-Probenpuffer und 3 min erhitzen bei 95 °C von den Beads eluiert und über SDS-PAGE in einem 10 %igen Gel aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels erfolgte die Autoradiographie über Nacht.

3.2.9.2 Kinasierung mit rekombinanter CK1 und CK2

Binde-Puffer: 0,1 M NaCl, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 % (v/v) Triton X-100

Stop-Puffer: 0,1 M Na_2HPO_4 , 0,1 M $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 0,5 M EDTA pH 7,5

10 \times CK1-Puffer: 0,5 M Tris/HCl, 0,1 M MgCl_2 , 50 mM DTT

10 \times CK2-Puffer: 0,2 M Tris/HCl, 0,5 M KCl, 0,1 M MgCl_2

Glutathione (GSH)-Agarose Beads: 50 % (w/v) in "Binde"-Puffer

Für die Phosphorylierung mit gereinigter, rekombinanter CK1 oder CK2 wurde 1 μg GST-LEF-1 Fusionsprotein in einem Reaktionsvolumen von 20 μl mit 2 μl 10 \times CK1- oder CK2-Puffer, 2 μCi $^{32}\text{P}\gamma\text{ATP/GTP}$ in Gegenwart von 25 U CK1 δ oder CK2 versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Die Phosphorylierung wurde durch Zugabe von 50 μl Stop-Puffer beendet. Zur Isolierung der GST-LEF-1 Fusionsproteine wurden 200 μl Binde-Puffer sowie 30 μl GSH-Agarose Beads

zugegeben und der Ansatz bei 4 °C unter konstanter Rotation inkubiert. Nach 1 h wurden die Beads pelletiert (1 min, 2700 × g, 4 °C) und dreimal mit je 400 µl Binde-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 20 µl 2× SDS-Probenpuffer und 3 min Erhitzen bei 95 °C, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Die Auswertung erfolgte nach Autoradiographie des getrockneten Gels über Nacht.

3.2.9.3 Kinasierung unter Zugabe spezifischer Proteinkinase-Inhibitoren

Als spezifischer Inhibitor der CK1 wurde CK1-7, ein Isoquinolinsulfonamid-Derivat, eingesetzt (Chijiwa *et al.*, 1989). Heparin, ein Mucopolysaccharid, und Apigenin, ein Trihydroxyflavon, dienten als spezifische Inhibitoren der CK2 (Critchfield *et al.*, 1997; Hathaway *et al.*, 1980). Folgende Stammlösungen wurden gemäß der Empfehlung der Hersteller angesetzt: 10 mM CK1-7 in DMSO; 1 M Heparin in H₂O; 0,1 M Apigenin in DMSO.

3.2.9.4 Kinasierung unter Zugabe spezifischer Substratpeptide

Casein Kinase 1 Phospho-Substratpeptid:	KRRRALS(P)VASLPGL
Casein Kinase 2 Substratpeptid:	RRREEETEEE

Die synthetisch hergestellten, spezifischen Substratpeptide von CK1 bzw. CK2 wurden als spezifische Kompetitoren den Phosphorylierungsansätzen zugegeben (Casnellie, 1991). Die Substratpeptide wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml in H₂O von der Firma New England Biolabs bezogen.

3.2.10 Co-Immunopräzipitation von LEF-1, CK1 und CK2 aus HEK293 Zellen

Protein A-Sepharose Beads: 50 % (w/v) in AP-Puffer
AP-Puffer: 0,1 M KCl, 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,1 % (v/v) Triton X-100

Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation (IP) können Proteine oder Protein-Komplexe gezielt mit Hilfe spezifischer Antikörper aus Zelllysaten isoliert werden.

HEK293 Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Transfektionsmethode (s. 3.1.7) und verschiedenen Kombinationen folgender Expressionsplasmide transient transfiziert: pFLAG/CMV-LEF-1, pCS2+CK1 ϵ -myc oder pRc/CMV-HA-CK2 α' + pRc/CMV-myc-CK2 β .

Nach Lyse der Zellen mit 400 μ l AP-Puffer wurden die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (10 min, 20.800 \times g, 4 °C) und der Überstand mit 30 μ l Protein A-Sepharose Beads vorinkubiert, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Nach 30 min wurden die Protein A-Sepharose Beads abzentrifugiert (1 min, 2700 \times g, 4°C) und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt.

Für die Immunpräzipitation wurden 3 μ g anti-FLAG M2 Antikörper an 30 μ l Protein A-Sepharose Beads in AP-Puffer vorgekoppelt, im nächsten Schritt mit dem Zellysat versetzt und bei 4 °C unter konstanter Rotation inkubiert. Nach 1 h wurden die Protein A-Sepharose Beads abzentrifugiert (1 min, 2700 \times g, 4°C) und dreimal mit je 400 μ l AP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteinkomplexe mit 20 μ l 2 \times SDS-Probenpuffer eluiert und 3 min bei 95°C erhitzt. Nach Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteinkomplexe im Western Blot analysiert.

3.2.11 Bandshift Analyse (EMSA)

Elektrophoretische-Mobilitätsshift-Assays dienen dem Nachweis und der Charakterisierung von Protein-DNA-Wechselwirkungen. Ein radioaktiv- bzw. fluoreszenzmarkiertes, spezifisches DNA-Fragment wird mit dem zu untersuchenden Protein oder Proteingemisch inkubiert. Die entstehenden Protein-DNA-Komplexe werden anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Bindung eines Proteins an das markierte DNA-Fragment wird eine Änderung im Laufverhalten hervorgerufen, die zu einer Gelretardation führt und als Mobilitätsshift auf dem Gel detektierbar wird.

3.2.11.1 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Elektrophoresepuffer = 0,25× TBE-Puffer: 22,5 mM Tris/HCl pH 8,0, 22,25 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA

Zusammensetzung der nativen Polyacrylamidgele:

Lösungen	4 %iges Gel	8 %iges Gel
30 % Acrylamid	2,67 ml	5,34 ml
0,8 % Bisacrylamid		
10× TBE	0,50 ml	0,50 ml
10 % APS	0,20 ml	0,20 ml
ddH ₂ O	16,60 ml	13,96 ml
TEMED	32,50 µl	32,50 µl
Gesamtvolumen	20,00 ml	20,00 ml

Anmerkung:

Die angegebenen Volumina beziehen sich jeweils auf 2 Gele.

Nach einem 15-minütigem Vorlauf der Gele bei 60 V wurden die Protein-DNA-Komplexe auf das Gel geladen und anschließend in 4 %igen oder 8 %igen Gelen für 1 h bzw. 2 h bei 60 V elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.11.2 Herstellung des markierten LEF-DNA-Fragments

Als DNA-Fragment wurde in dieser Arbeit die LEF/TCF-Bindungsstelle 1 aus dem Promotor des T-Brachyury Gens der Maus verwendet (Arnold *et al.*, 2000) und in Form des nachfolgend genannten Oligonukleotidpaars eingesetzt. Das Sequenzmotiv der LEF/TCF-Bindungsstelle ist blau markiert.

Oligonukleotide: 5'-GGG CGG GAC ACC **CTT TGA** AGT ACC GAG CAG C-3' (sense)
 3'-CCC GCC CTG TGG **GAA ACT** TCA TGG CTC GTC G-5' (antisense)

a.) Radioaktive Markierung und Hybridisierung des LEF-DNA-Fragments

In zwei getrennten Ansätzen wurden 10 pmol (5 pmol/µl) sense bzw. antisense Oligonukleotid in 1 µl 10× Polynukleotidkinase-Puffer + 4 µl H₂O aufgenommen,

3 min bei 95 °C erhitzt und anschließend 5 min bei RT abgekühlt. Für die Markierung der Oligonukleotide wurden 2 µl (20 µCi) ³²PγATP zugegeben und die Kinasierungsreaktion durch Zugabe von 3 U T4-Polynukleotidkinase gestartet. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Erhitzen bei 95 °C für 5 min gestoppt. Die vereinigten Oligonukleotide wurden durch erneute 5-minütige Inkubation bei 95 °C in einem Wasserbad denaturiert und durch langsames Abkühlen des Wasserbades miteinander hybridisiert. Freie, nicht DNA-gebundene Radioaktivität wurde über „Push Columns“ der Firma Stratagene entfernt. Das radioaktiv-markierte LEF-DNA-Fragment wurde vor dem Einsatz im Shift-Assay 1:5 mit H₂O verdünnt.

b.) Hybridisierung des fluoreszenzmarkierten LEF-DNA-Fragments

Oligonukleotide: 5´-Cy5-GGG CGG GAC ACC CTT TGA AGT ACC GAG CAG C-3´ (sense)
 3´-CCC GCC CTG TGG GAA ACT TCA TGG CTC GTC G-Cy5-5´ (antisense)

Jeweils 2 µl (5 pmol/µl) des fluoreszenzmarkierten sense und antisense Oligonukleotids wurden in 8 µl H₂O aufgenommen, 5 min bei 95 °C inkubiert und dann vereinigt. Die Hybridisierung der vereinigten Oligonukleotide erfolgte nach 5-minütiger Inkubation bei 95 °C in einem Wasserbad unter langsamen Abkühlen des Wassers. Das fluoreszenzmarkierte LEF-DNA-Fragment wurde vor dem Einsatz im Shift-Assay 1:10 mit H₂O verdünnt.

3.2.11.3 LEF-1/DNA-Bindungsreaktion

10× EMSA-Puffer: 0,25 M Tris/HCl, 1,9 M Glycin, 55 mM EDTA

LEF-DNA-Fragment Mix: 1,4 µl H₂O

(Mengen für einen Probenansatz) 1,0 µl 10× EMSA-Puffer

1,0 µl dIdC (0,2 µg/µl)

1,0 µl BSA (10 mg/ml)

0,1 µl fluoreszenzmarkiertes bzw. ³²P-gelabeltes LEF-DNA-Fragment

⇒ Für mehrere Probenansätze wurde ein LEF-DNA-Fragment Mix für n + 1 Proben pipettiert (n = Anzahl der Proben)

6× DNA-Loading-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA

In einem Volumen von 5,5 µl wurde GST-LEF-1 (1,0 µg) entweder allein oder in Kombination mit gereinigter, rekombinanter CK1δ oder CK2 (25 U) in Gegenwart oder Abwesenheit von 2 mM ATP für 30 min bei RT inkubiert.

Für Untersuchungen des LEF/ β -Catenin Komplexes wurde 1,0 μ g rekombinant hergestelltes β -Catenin-His₆ Fusionsprotein zusätzlich dem Ansatz zugegeben. Bei Zugabe von anti-CK1 δ , anti-CK2, anti-LEF-1 oder anti- β -Catenin Antikörper wurde der Ansatz für weitere 30 min bei RT inkubiert. Dabei wurde 1,0 μ g des jeweiligen Antikörpers eingesetzt.

Im nächsten Schritt wurden 4,5 μ l des LEF-DNA-Fragment Mixes zugesetzt und nochmals für 30 min bei RT inkubiert, bevor 2 μ l 6 \times DNA-Loadingpuffer zugegeben wurden und die elektrophoretische Auftrennung über ein 4- oder 8 %iges natives Gel erfolgte.

Sofern ein radioaktiv-gelabeltes LEF-DNA-Fragment eingesetzt war, wurde das Gel nach Beenden der Elektrophorese 10 min in 10 %iger Essigsäure fixiert, getrocknet und nach Autoradiographie über Nacht ausgewertet. Beim Einsatz eines fluoreszenzmarkierten LEF-DNA-Fragments, erfolgte die Auswertung direkt nach Abschluss der Elektrophorese über einen Fluoreszenz-Imager.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

LB-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Tryptone, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl

P1-Puffer (Resuspension-Puffer): 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A

P2-Puffer (Lyse-Puffer): 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer (Neutralisations-Puffer): 3 M Kaliumacetat pH 5,5

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden die *E. coli* Stämme DH5 α oder XL1 blue verwendet, die mit der gewünschten Plasmid-DNA transformiert waren. Die Anzucht der Bakterien erfolgte in LB-Medium in Gegenwart eines selektionierenden Antibiotikums.

Je nach Menge der angezogenen Bakterien werden „Mini-“ (2 bis 10 ml), „Midi-“ (25 bis 100 ml) und „Maxi-“ (> 100 ml) Präparationen unterschieden.

Anhand einer „Mini-Präparation“, wird nachfolgend eine der gebräuchlichsten Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA beschrieben. Die Methode beruht auf dem alkalischen Lyse-Verfahren von Birnboim und Doly (1979). Sie erlaubt eine einfache und schnelle Präparation von Plasmiden aus einer großen Zahl an

Bakterienkulturansätzen und wurde daher vor allem zur Überprüfung von DNA-Klonierungen verwendet.

Eine 1,5 ml *E. coli*-Übernachtskultur wurde 5 min bei $2700 \times g$ zentrifugiert und das Bakteriensediment in 150 μ l P1-Puffer resuspendiert. Durch nachfolgende Zugabe von 150 μ l P2-Puffer wurden die Bakterien lysiert und anschließend das Lysat mit 150 μ l P3-Puffer neutralisiert. Unlösliche Komponenten, wie bakterielle Zellfragmente, denaturierte Proteine und bakterielle DNA, wurden abzentrifugiert (10 min, $20.800 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und die sich in Lösung befindende Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt und gewaschen.

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit Hilfe der Plasmid-Midi- bzw. -Maxi Kits von Qiagen, gemäß den Angaben des Herstellers, isoliert. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgt dabei über Anionenaustauscherchromatographie.

Menge und Reinheit der isolierten DNA wurden UV-spektrometrisch bestimmt (siehe 3.3.4).

3.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Proteine und andere Verunreinigungen können aus wässriger Nukleinsäure-Lösung durch Extraktion mit Phenol entfernt werden.

Dazu wurde die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt und durch Vortexen gut vermischt. Nach einem kurzen Anzentrifugieren zur Trennung der Phasen, wurde die wässrige Phase abgenommen und mit gleichem Volumen Chloroform nochmals auf gleiche Weise extrahiert. Die wässrige Phase wurde im Anschluss einer Ethanol-Präzipitation unterzogen.

3.3.3 Ethanol-Präzipitation

Durch Ethanol-Präzipitation wird DNA aus verdünnten Lösungen gefällt und kann somit aufkonzentriert werden.

Die DNA enthaltende Lösung wurde mit 0,1 VT 3 M Kaliumacetatlösung pH 5,5 sowie 2,5 VT 100 % Ethanol (-20°C) versetzt und im Anschluss durch Zentrifugation pelletiert (20 min, $20.800 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Die präzipitierte DNA wurde mit

150 μl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in TE-Puffer oder entionisiertem H_2O aufgenommen.

3.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

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

Die Konzentration und der Reinheitsgrad von Nukleinsäuren wurde UV-spektrometrisch bestimmt. Dabei wurde die Absorption gegen TE-Puffer bei 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen) gemessen. Eine Absorption von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ doppelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA und 37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ einzelsträngige DNA. Der Grad der Verunreinigung wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Reine DNA weist einen Quotienten $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ zwischen 1,8 und 1,9 auf.

3.3.5 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme katalysieren eine sequenzspezifische, endonukleolytische Spaltung des Desoxyribose-Phosphat-Rückrats der DNA. TypII Endonukleasen erkennen spezifische DNA Sequenzen aus 4-8 Nukleotiden und schneiden in Gegenwart von MgCl_2 die DNA innerhalb dieser Sequenz. Dabei entstehen in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms entweder einzelsträngig, überstehende „sticky“ oder glatte „blunt“ Enden. Die Reaktionsbedingungen für die jeweiligen Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers eingehalten. In einem Restriktionsverdau wurden zwischen 1-3 μg DNA in einem Reaktionsvolumen von 10-20 μl mit 1-5 U Enzym pro μg DNA gespalten. Die Analyse des Verdaus erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (siehe 3.3.6).

3.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

1 \times TBE-Puffer: 90 mM Tris/HCl pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

6 \times DNA-Loading-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA- und RNA-Moleküle entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und mit dem interkalierenden

Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid nachgewiesen. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente werden Gele unterschiedlicher Agarosekonzentration gegossen. Die entsprechende Menge an Agarose (0,8-1,2 % (w/v)) wurde durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst, auf 50-60 °C abgekühlt und nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) in eine horizontale Gelkammer mit Kamm ausgegossen und bei Raumtemperatur auspolymerisiert.

Die DNA-Proben wurden mit DNA-Loading-Puffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch Vergleich mit einer parallel aufgetragenen 1 kb DNA Leiter ermittelt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V. Das Trennergebnis wurde auf einem Transilluminator im UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) kontrolliert und zur Dokumentation fotografiert.

Bei präparativen Gelen wurde das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend gereinigt (siehe 3.3.7).

3.3.7 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

0,5x TE-Puffer: 5 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA

Die Reinigung der DNA erfolgte mit dem „Gene Clean II Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers. Die Methode beruht darauf, dass DNA in flüssiger Lösung an Silikapartikel („Glasmilch“) bindet. Nach Waschen der Silikapartikel wird die DNA mit entionisiertem H₂O oder TE-Puffer eluiert.

3.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit Hilfe des „DNA Rapid Ligation Kits“ der Firma Roche gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit entsprechend vorbereiteter Vektor-DNA wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Dabei wird unter Verbrauch von ATP eine Phosphodiester-Bindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-OH-Gruppe ausgebildet. Der Ligationsansatz wurde direkt für die Transformation von Bakterien eingesetzt (siehe 3.3.9).

3.3.9 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

LB-Medium: 1 % (w/v) Bacto-Tryptone, 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract, 86 mM NaCl

LB-Agar: 1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium

In Anlehnung an die von Hannahan (1983) beschriebene Methode erfolgte die Transformation eines Plasmids nach Hitzeschock in kompetente *E. coli* Zellen der Stämme DH5 α oder XL1 blue. Die ligierte DNA wurde dabei mit 50 μ l kompetenten Zellen 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 2 min (DH5 α) bzw. 1 min (XL1 blue) bei 42 °C erhitzt. Nach Zugabe von 300 μ l LB-Medium wurden die Bakterien 30 min bei 37 °C inkubiert, auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit selektionierendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

Der Erfolg einer Ligation wurde nach Mini-Präparation der Plasmid-DNA aus verschiedenen Einzelkolonien durch Restriktionsanalyse überprüft (siehe 3.3.1 bzw. 3.3.5).

3.3.10 Plasmidkonstruktionen

Für die eukaryontische Expression von LEF-1 mit einem N-terminalen FLAG-Tag wurde die LEF-1 cDNA aus pGEX-LEF-1 (Huber *et al.*, 1996) mit Hilfe des Restriktionsenzym BamHI herausgeschnitten und unter Erhalt des Leserasters in die entsprechende BamHI-Schnittstelle von pCMV4-FLAG ligiert.

Für die eukaryontische Expression von CK1 ϵ mit einem C-terminalen myc-Tag wurde CK1 ϵ durch PCR mit den Oligonukleotiden 5'-GCG AGA TCT GCC ACC ATG GAG CTA CGT GTG GGG-3' und 5'-ACG GCG AGA TCT CTT CCC GAG ATG GTC AAA-3' und pRSETB-CK1 ϵ als template amplifiziert. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit BglII geschnitten und in die BamHI-Schnittstelle von pCS2+myc ligiert.

Oligonukleotide wurden über die Firmen Gene Scan (Freiburg) oder Metabion (Martinsried) bezogen.

3.3.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung doppelsträngiger DNA erfolgte nach der Didesoxymethode von Sanger *et al.* (1992). Hierbei werden zusätzlich zu den 2'-Desoxynukleotiden 2', 3'-Didesoxynukleotide eingesetzt, die aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe keine weiteren Phosphodiesterbindungen ausbilden können und somit zu statistisch verteilten, vorzeitigen Kettenabbrüchen führen. Durch den Einsatz von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten 2', 3'-Didesoxynukleotiden können die so entstehenden, unterschiedlich langen DNA-Fragmente durch Kapillarelektrophorese in einem hochauflösenden Polymer aufgetrennt und basenspezifisch detektiert werden. Für die automatische Sequenzanalyse wurde der ABI Prism™ Genetic Analyzer 310 der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems eingesetzt.

Für eine Sequenzierreaktion wurden 1 µg DNA, 10 pmol Primer und 4 µl BigDye™ Terminator Sequenzier-Mix von PE Biosystems mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Die anschließende PCR-Reaktion wurde in dem Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) vorgenommen. Die Reaktionsbedingungen der PCR waren dabei wie folgt: 1 min, 94 °C, 25× (10 s, 96 °C; 5 s, 55 °C; 4 min, 60 °C), 15 °C. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltrationssäulchen der Firma Edge BioSystems nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die Proben wurden im Anschluss über eine Speed-Vac auf ca. 3 µl eingengt, mit 20 µl Template Suppression Reagenz versetzt und vor der Sequenzanalyse 3 min bei 95 °C denaturiert.

3.3.12 Reporteragen-Assays

Reporteragen-Assays dienen der funktionellen Analyse von Promotoren und der sie regulierenden Transkriptionsfaktoren in der Zelle. Durch Transfektion eukaryontischer Zellen mit Reporteragen-Konstrukten kann der Einfluß eines Transkriptionsfaktors und seiner Bindungspartner auf die Genexpression quantifiziert werden. Das Reporteragen-Konstrukt enthält dabei das zu analysierende Promotor-DNA-Fragment und nachgeschaltet ein Reporteragen, dessen Expression über seine enzymatische Aktivität quantifiziert wird. Auf diese Weise lässt sich die Aktivität des Promotors indirekt bestimmen.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Reporter-Gen-Assays wurde ein Siamois-Luciferase Reporter-Gen-Konstrukt verwendet. Siamois ist ein Wnt-reguliertes Gen, dessen Expression durch LEF-1 kontrolliert wird. Das Reporter-Gen-Konstrukt enthält die Promotorregion von Siamois mit 5 LEF-1-Bindungsstellen (Brannon *et al.*, 1997). Der Siamois Promotor reguliert dabei das Gen für die Firefly-Luciferase (*Photinus pyralis*). Die Assays wurden unter Verwendung des „Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems“ durchgeführt. Dieses System beruht auf der Co-Transfektion eines Kontroll-Reporterplasmids, dessen Reporter-Gen für Renilla-Luciferase (*Renilla reniformis*) codiert. Die Expression der Renilla-Luciferase steht unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors und dient der internen Standardisierung der Transfektion. Durch Ausnutzung unterschiedlicher Substratspezifitäten von Firefly- und Renilla-Luciferase kann die Aktivität beider Luciferasen in einem Ansatz gemessen werden. Infolge der enzymatischen Umsetzung des jeweiligen Lumineszenz-Substrats kommt es zur Lichtemission. Das ausgesendete Licht ist proportional zur Luciferasemenge und kann mit Hilfe eines Luminometers quantifiziert werden.

Die Assays wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. HEK293 Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Transfektionsmethode (siehe 3.1.7) und folgenden Expressionsplasmiden transient transfiziert: 0,2 µg Siamois Reporterkonstrukt, 0,1 µg pHRL-TK (Renilla-Luciferase) und unterschiedlichen Kombinationen von pFLAG-LEF-1 (0,2 µg), pCS2+CK1 ϵ -myc (0,4 µg), pRc/CMV-HA-CK2 α' (0,2 µg), pRc/CMV-CK2 β -myc (0,2 µg) und pCS2+ β -Catenin (1,0 µg). Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde durch Zugabe entsprechender Mengen des Leervektors pcDNA3 ausgeglichen.

Die Zellen wurden 48 h nach ihrer Transfektion lysiert und die Luciferase-Aktivität durch Zugabe des jeweiligen Substrats in einem Injektions-Luminometer gemessen.