

VII Material und Methoden

7.1. Materialien

7.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von AppliChem (Deutschland), Calbiochem (Deutschland), Hartenstein (Deutschland), ICN (Deutschland), Merck (Deutschland), Roche (Deutschland), Roth (Deutschland) oder Sigma (Deutschland), bezogen.

7.1.2. Zellkulturmaterialien

Alle Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Corning (Niederlande), Falcon (Deutschland) und Sarstedt (Deutschland) bezogen. Diese waren sterile Einmalartikel oder wurden im Labor durch Autoklavieren sterilisiert.

7.1.3. Enzyme

Restriktionsenzyme wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Fermentas (Deutschland) bezogen. Verwendete Polymerasen und die T4-Ligase waren von der Firma Invitrogen (Niederlande).

7.1.4. Oligonucleotide

Alle Oligonucleotide wurden von MWG Biotech (Deutschland) bezogen. Die Oligonucleotidsequenzen sind in einer Tabelle im Anhang zusammengefaßt.

7.1.5. Antikörper

α -Penta-His	(Mouse IgG1, # ¹ 34660)	1:2.000	QIAGEN (Deutschland)
α -GST	(Rabbit IgG, #A7340)	1:2.000	
	Peroxidase konjugiert		Sigma
α -RAM	(Rat Anti-Mouse IgG, # 415-035-166)	1:5.000	
	Peroxidase konjugiert		Jackson ImmunoResearch (Großbritannien)

¹ Bestellnummer

Material und Methoden

7.1.6. Lektine

VVA (<i>Vicia villosa</i> agglutinin), FITC konjugiert	EY Laboratories (USA)
LFA (<i>Limax flavus</i> agglutinin), FITC konjugiert	EY Laboratories (USA)

7.1.7. Kits

QIAprep® Spin Miniprep (#27106)	QIAGEN
NucleoSpin® Plasmid (#740588.250)	Macherey-Nagel (Deutschland)
NucleoSpin® Extract II (#740609.250)	Macherey-Nagel (Deutschland)
AccuPrime™ Pfx SuperMix (#12344-040)	Invitrogen
Zero Blunt® PCR Cloning (#44-0302)	Invitrogen
TOPO TA Cloning® (#45-0641)	Invitrogen
pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA (#45-0005)	Invitrogen
Thermo Sequenase™ Sequencing (#25-2538-01)	GE Healthcare (Deutschland)
RNeasy® Mini (#74104)	QIAGEN
SuperScript™ III First-Strand (#18080-051)	Invitrogen
Cell Line Nucleofektor™ V	Amaxa (Deutschland)
MicroSpin GST Purification Module (#27-4570-03)	GE Healthcare

7.1.8. Vektoren

Der pCR®-Blunt- und der pCR®2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen, Niederlande) wurden bei Zwischenschritten der Klonierung eingesetzt. PCR-Produkte oder kurze DNA-Fragmente mit glatten Enden (blunt ends) wurden in den pCR®-Blunt-, mit überhängenden A-Enden (sticky ends) in den pCR®2.1-TOPO-Vektor inseriert. Desweiteren wurde der pFASTBAC™ 1-Vektor (Invitrogen, Niederlande) für die Proteinexpression in Insektenzellen und der pGEX™-4T-1-Vektor (Amersham, Großbritannien) für die Expression in *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen verwendet. Der pUMVC3- (Aldevron, USA) bzw. pcDNA3.1/V5-His-TOPO®-Vektor (Invitrogen, Niederlande) wurde für die transiente bzw. stabile Proteinexpression in Säugerzellen eingesetzt.

7.1.9. *E.coli*-Bakterienstämme

TOP10	Invitrogen (Niederlande)
DH10BAC™	Invitrogen (Niederlande)
BL21 Star™ (DE3)pLysS	Invitrogen (Niederlande)

7.1.10. Insekten-Zelllinien

Sf9/Sf900	GibcoBRL (USA)
High Five	GibcoBRL (USA)

7.1.11. Säuger-Zelllinien

BJA-B K88 (Humane Burkitt's Lymphom B-Lymphocyten Zelllinie)	Keppler <i>et al.</i> , 1994
BJA-B K20 (Humane Burkitt's Lymphom B-Lymphocyten Zelllinie)	Keppler <i>et al.</i> , 1994
Jurkat (Humane CD4-T-Zelllinie)	ATCC (USA)
HEK (human embryonic kidney)	ATCC (USA)
TE671(Rhabdomyosarkom-Zelllinie)	ATCC (USA)
CHO Lec3 (chinese hamster ovary)	Stanley <i>et al.</i> , 1981

7.1.12. Zellkultur

Medien und Zusätze wurden von den Firmen GibcoBRL (USA), PAN Biotech GmbH (Deutschland) und Biowest (Frankreich) bezogen. Zum Ansetzen von Lösungen und Medien wurde entionisiertes und destilliertes Wasser verwendet. Stammlösungen und Flüssigmedien für die sterile Anzucht wurden 20 Minuten bei 200 kPa autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert (Membranfilter, Porengröße 0,2 µm; Satorius, Deutschland).

7.1.12.1. Bakterien

Bakterien wurden bei 37 °C im Schüttelinkubator (220 rpm; Novotron, Infors, Schweiz) oder im Brutschrank (Memmert, Deutschland) kultiviert.

Bakterien können bei -80 °C eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür wurden Kulturen bis zur Sättigung angezogen, Glycerin bis zu einer Konzentration von 20% (v/v) zugegeben und die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren, bevor sie bei -80 °C gelagert wurden. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie auf Eis aufgetaut und in Medium resuspendiert werden.

LB-Medium:	10 g/l	Pepton (Roth, Deutschland)
	5 g/l	Hefeextrakt (AppliChem, Deutschland)
	10 g/l	NaCl
	15 g/l	Agar (nur bei Festmedien)

Material und Methoden

Bei Festmedien für die DH10BAC™-Zellen werden 12 g/l statt 15 g/l Agar zugegeben.

SOC-Medium:	20 g/l	Pepton	5 g/l	Hefeextrakt
	4 g/l	MgCl ₂	0,5 g/l	NaCl
	186 mg/l	KCl	3,6 g/l	Glucose

Nach dem Autoklavieren wurden bei Selektivmedien noch entsprechende Antibiotika

zugegeben:	50 mg/ml	Ampicillin
	25 mg/ml	Chloramphenicol
	50 mg/ml	Kanamycin
	10 mg/ml	Tetracyclin
	7 mg/ml	Gentamycin

Für die Blau-Weiß-Selektion wurden zusätzlich noch folgende Substanzen zugegeben:

40 mg/ml	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid (IPTG)	1:1000 in H ₂ O
200 mg/ml	Bluo-Gal	1:2000 in DMSO

7.1.12.2. Insektenzellen

Insektenzellen wurden bei 27 °C als Suspensionskultur im Schüttelinkubator (115 rpm; Multitron; Infors, Schweiz) oder adhärent als Monolayer im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) kultiviert. Insektenzellen können in flüssigem Stickstoff eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür werden Zellen als Suspension oder Monolayer angezogen, 5 Minuten bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert und mit einer Dichte von mindestens 2×10^6 Zellen/ml in 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wird mit 1 °C pro Minute langsam auf -80 °C abgekühlt und die Zellen anschließend zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie bei 37 °C aufgetaut und in Medium resuspendiert werden. Aufgetaute Zellen werden zunächst adhärent kultiviert. Nach 4-6 Stunden und nach weiteren 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel, um tote Zellen zu entfernen.

Sf9-Zellen: Sf-900 II Medium (GibcoBRL, USA)
10 ml/l 200 mM Glutamin (GibcoBRL, USA)
50 ml/l FCS (GibcoBRL, USA)

Sf900-Zellen: Sf-900 II Medium
10 ml/l 200 mM Glutamin

7.1.12.3. Säugerzellen

Je nach Zelllinie wurden Säugerzellen bei 37 °C und 5% CO₂ als Suspensionskultur oder adhärent als Monolayer im Brutschrank (Forma Scientific, Deutschland) kultiviert. Säugerzellen können in flüssigem Stickstoff eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür werden Zellen als Suspension oder Monolayer bis zu einer Konfluenz von 80-90% (T75-Flasche) angezogen, 5 Minuten bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert und in 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wird mit 1 °C pro Minute langsam auf -80 °C abgekühlt und die Zellen anschließend zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie bei 37 °C aufgetaut und in Medium resuspendiert werden. Nach 4-6 Stunden und nach weiteren 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel, um tote Zellen zu entfernen.

BJA-B-, Jurkat-Zellen:

RPMI 1640 Medium PAN Biotech GmbH (Deutschland)

HEK-, TE671-Zellen:

D-MEM Medium PAN Biotech GmbH (Deutschland)

CHO (Lec3)-Zellen:

MEM alpha Medium Biowest (Frankreich)

Dulbecco's PBS (1x) PAN Biotech GmbH (Deutschland)

Medienzusätze:	L-Glutamin	PAN Biotech GmbH (Deutschland)
	FCS	PAN Biotech GmbH (Deutschland)
	Pen/Strep	PAN Biotech GmbH (Deutschland)
	G418 (Geneticin)	Biochrom (Deutschland)
	HEPES	PAN Biotech GmbH (Deutschland)
	Na-Pyruvat	PAN Biotech GmbH (Deutschland)

Material und Methoden

Adenosin	Sigma (Deutschland)
Guanosin	Sigma (Deutschland)
Uridin	Sigma (Deutschland)
Cytidin	Sigma (Deutschland)
Thymidin	Sigma (Deutschland)

7.2. Geräte

Cleanbench FASTER 1	BioFlow-Technik
HERA safe	Thermo Electron Corporation
SAFE 2010 1.8	Holten LaminAir
Schüttelinkubator Novotron	Infors
Schüttelinkubator IH50	Incutec GmbH
Schüttelinkubator Multitron	Infors,
STERI-CULT 200 Inkubator	Forma Scientific
Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus
Multifuge 1 L-R	Heraeus
One Shot Cell Disruption	Constant Systems
iCycler	BIO-RAD
Mastercycler ep gradient S	Eppendorf
Power-Supply Power-Pac 1000	BIO-RAD
Flachbettgelelektrophoresekammer B1A, B2	MWG-Biotech
Gel-Dokumentationsapparatur Gel-Print 2000i	MWG-Biotech
SDS-PAGE-System Mini-Protean III	BIO-RAD
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Spektralphotometer Ultrospec 500 <i>pro</i>	Amersham Biosciences
Thermoblock Thermomixer Compact	Eppendorf
Flüssigszintillationszähler Tri-Carb 1900 CA	Packard
FACScan	Becton Dickinson

7.3. Methoden

7.3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

7.3.1.1. Bioinformatik

Die Internet-basierte Suche in der NCBI Genbank nach genomischen und cDNA-Sequenzen verschiedener Spezies wurde mit dem BLAST-Programm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) durchgeführt. Für die Suche auf dem UCSC Genomserver wurde das Programm Blat (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) verwendet. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm MacMolly (Softgene, Deutschland) benutzt.

7.3.1.2. Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien

Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers (QIAGEN-RNeasy-Protokoll) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten konfluente (80-90%) Zellen einer 10 cm Schale oder T75-Flasche. Das nach einer Zentrifugation (5 Minuten, 900 rpm; Megafuge 1.0, Heraeus) erhaltene Zellpellet wurde in 600 µl RLT-Puffer, versetzt mit 10 µl β-Mercaptoethanol auf 1 ml, resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mittels einer Spritze lysiert. Das Zelllysate wurde 1 Minute gevortext. Nach Zugabe von 600 µl 70%igem Ethanol wurde mit der Pipette gemischt. Danach wurden die ersten 600 µl des Gemisches auf eine Spin-Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die zweiten 600 µl des Gemisches wurden auf die gleiche Säule aufgetragen. Die Säule wurde unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Anschließend wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben, erneut zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Puffer (enthält 4 Volumen Ethanol) erfolgte der Waschvorgang durch eine weitere Zentrifugation. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurde die Säule zum Trocknen für 2 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 40 µl RNase-freiem Wasser wurde die RNA durch Zentrifugation (1 Minute, 10.000 rpm) eluiert. Wird eine große RNA-Menge erwartet, kann noch mal mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluiert werden. Abschließend wurde die RNA 1:50 photometrisch vermessen. Für die cDNA-Synthese werden 10 µg RNA eingesetzt.

Material und Methoden

7.3.1.3. Synthese komplementärer DNA (cDNA) aus mRNA

Die mRNA kann in DNA umgeschrieben werden, indem man die komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) synthetisiert. Die Reverse Transkriptase ist ein Enzym, welches an der Replikation mehrerer Viren beteiligt ist. Sie hat die Eigenschaft mRNA als Matrize zu benutzen. Ist der cDNA-Strang synthetisiert, kann man den RNA-Anteil des Hybridmoleküls durch Behandlung mit Ribonuclease H abbauen.

Verwendet wurde dazu der „SuperScript™ III First-Strand Synthesis“-Kit (Invitrogen, Niederlande) und es wurde sich an die Vorgaben des Herstellers gehalten. Ein Ansatz sah dabei wie folgt aus:

5 µl Total-RNA (10 µg)
1 µl dNTPs (10 mM)
1 µl Oligo(dT)₂₀ (50 µM)
3 µl DEPC-behandeltes H₂O

10 µl

Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei 65 °C und anschließend für eine Minute auf Eis. In der Zwischenzeit wurde der cDNA-Synthese-Mix pipettiert:

2 µl RT-Puffer (10X)
4 µl MgCl₂ (25 mM)
2 µl DTT (100 mM)
1 µl RNaseOUT Inhibitor (40 U/µl)

Zu einem RNA-Ansatz wurden 9 µl des cDNA-Synthese-Mix pipettiert und für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden zu dem RNA/Primer-Mix 1 µl SuperScript™ III RT (200 U/µl) dazugegeben und 50 Minuten bei 50 °C inkubiert. Durch eine weitere Inkubation für 15 Minuten bei 70 °C wurde die Reaktion beendet. Nach Zugabe von 1 µl RNase H erfolgte eine abschließende Inkubation für 20 Minuten bei 37 °C. Die cDNA-Synthese-Reaktion kann bei -20 °C gelagert werden.

7.3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können ausgesuchte DNA-Sequenzen *in vitro* exponentiell amplifiziert werden. Zur Synthese werden Ausgangs-DNA (*template*), zwei Oligonucleotidprimer, die die zu amplifizierende Region flankieren, eine thermostabile DNA-Polymerase, Nucleotide und Puffer benötigt.

Material und Methoden

Verwendet wurde eine „proofreading“-Polymerase, die zusätzlich eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität besitzt und eine Korrekturaktivität erlaubt. Die Standard-PCR wurde mit dem „AccuPrime™ Pfx SuperMix“-Kit (Invitrogen, Niederlande) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der Ansatz für die PCR sah dabei wie folgt aus:

1 µl	Template-DNA (100 ng)
0,5 µl	Forward-Primer (100 µM)
0,5 µl	Reverse-Primer (100 µM)
45 µl	AccuPrime™ Pfx SuperMix
3 µl	H ₂ O (bidest.)

50 µl	

Die Reaktion wurde in einem Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) mit folgendem Programm durchgeführt:

5 min 95 °C / 30 x (30 sec 95 °C / 30 sec 60 °C / 2 min 30 sec 68 °C) / 5 min 68 °C.

Ein Aliquot von 5 µl wurde mit Loading-Dye-Solution (6x) versetzt und zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

Bei der Kolonie-PCR soll nachgewiesen werden, ob das gewünschte DNA-Fragment (Insert) mit dem Plasmid sich in einer Einzelkolonie befindet. Es wird ein Primer verwendet der im Vektor (M13-For; Invitrogen, Niederlande) und ein Primer der im Insert (hGNEA-Rev bzw. mGNEA-Rev) bindet. Verwendet wurden eine *Taq*-DNA-Polymerase und die dazugehörigen Puffer (Fermentas, Deutschland). Mittels einer Impfnadel wurde etwas von der Einzelkolonie abgenommen und direkt in das PCR-Tube gegeben. Der Ansatz für die Kolonie-PCR sah dabei wie folgt aus:

5 µl	PCR Buffer (10 x)
3,8 µl	dNTP (4 mM)
2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,5 µl	M13-For (100 µM)
0,5 µl	hGNEA-Rev bzw. mGNEA-Rev (100 µM)
1 µl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
37,2 µl	H ₂ O (bidest.)

50 µl	

Material und Methoden

Die Reaktion wurde in einem Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) mit folgendem Programm durchgeführt:

5 min 95 °C / 25 x (30 sec 95 °C / 30 sec 55 °C / 1 min 30 sec 72 °C).

Ein Aliquot von 10 µl wurde mit Loading-Dye-Solution (6x) versetzt und zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

Für die Mutagenese-PCR wurde der „AccuPrime™ Pfx SuperMix“-Kit (Invitrogen, Niederlande) verwendet. Bei der Mutagenese soll zielgerichtet eine Mutation in eine bereits existierende cDNA eingeführt werden (*Site-Directed Mutagenesis*). Die Mutation wird über den Primer in die cDNA eingeführt. Der Ansatz für die PCR sah dabei wie folgt aus:

1 µl	Template-DNA (100 ng)
0,5 µl	Primer 1 (125 ng)
0,5 µl	Primer 2 (125 ng)
45 µl	AccuPrime™ Pfx SuperMix
3 µl	H ₂ O (bidest.)

50 µl	

Die Reaktion wurde in einem Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) mit folgendem Programm durchgeführt:

5 min 95 °C / 18 x (30 sec 95 °C / 1 min 55 °C / 14 min 68 °C).

Anschließend erfolgte für eine Stunde bei 37 °C der DpnI-Verdau. Dpn I schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte, nicht aber unmethylierte DNA. Wurde die Plasmid-DNA aus Bakterienstämmen isoliert, ist sie methyliert. Deshalb wird der Template-DNA-Strang zerstört. Abschließend wurde die DNA, wie unter 7.3.1.11. beschrieben, aufgereinigt.

Bei der RT-PCR wird aus einer beliebigen RNA cDNA synthetisiert und diese anschließend als Template für eine PCR verwendet. Bei dieser RT-PCR wurden kommerzielle QUICK-Clone™-cDNA (BD Biosciences Clontech, USA) und ein humanes und murines „PCR Ready First Strand“ cDNA-Panel aus verschiedenen Geweben (BioCat, Deutschland) eingesetzt. Verwendet wurden eine Pfx-DNA-Polymerase und die dazugehörigen Puffer (Fermentas, Deutschland). Der Ansatz für die RT-PCR sah dabei wie folgt aus:

1 µl	cDNA (50 ng)
5 µl	PCR Buffer (10 x)
3,8 µl	dNTP (4 mM)
2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
0,5 µl	Forward-Primer (100 µM)
0,5 µl	Reverse-Primer (100 µM)
1 µl	<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase
36,2 µl	H ₂ O (bidest.)

50 µl	

Die Reaktion wurde in einem Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) mit folgendem Programm durchgeführt:

5 min 95 °C / 25 x (30 sec 95 °C / 30 sec 55 °C / 1 min 30 sec 72 °C).

Ein Aliquot von 10 µl wurde mit Loading-Dye-Solution (6x) versetzt und zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

7.3.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Moleküle ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Bei ringförmiger DNA können auch *coiled* und *supercoiled*-Strukturen auftreten, welche aufgrund ihrer höheren Kompaktheit schneller wandern und in den Gelen deshalb bei scheinbar kleineren Molekulargewichten detektiert werden. Mit Agarosegelen können DNA-Moleküle im Bereich von 0,25 - 25 kbp identifiziert werden.

Agarose-Gelelektrophoresen werden zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Restriktionsspaltung, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Qualitätskontrolle von DNA verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in horizontalen 0,8 bis 1,5%igen (w/v) Agarose-Gelen. Die Agarose wurde durch Kochen in TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl / 5 mM Natriumacetat / 1 mM EDTA, pH 7,9) gelöst und in die entsprechenden Gelschlitzen gegossen. Nach dem Abkühlen und Erstarren der Agarose wurde das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Loading-Dye-Solution (6x) versetzt. Das Auftragsvolumen betrug etwa 5 - 20 µl pro Probentasche. Als Größenstandard dienten 10 µl des GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Deutschland). Die Elektrophorese wurde anschließend bei 0,5 V / cm²

Material und Methoden

durchgeführt, bis der Farbmaler die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hatte. Das Gel wurde dann für 5 - 10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) inkubiert und die DNA dann unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

7.3.1.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR oder präparativen Restriktionsverdauungen wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einem TAE-gepufferten Gel wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und mittels des „NucleoSpin® Extract II-Kit“ nach dem Standardprotokoll des Herstellers Macherey-Nagel gereinigt.

Das Prinzip der Reinigung beruht darauf, daß Silica-Material, z. B. Glas, DNA in der Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze (Natriumjodid, Guanidin-isothiocyanat) bindet und nach einem Waschschriff mit einem Salz-Ethanol-Puffer, durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden kann. Die zu isolierende DNA wurde jeweils mit 30 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 / 1 mM EDTA) eluiert.

7.3.1.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mittels einer Ligase wird als Ligation bezeichnet. Bei der Standardligation wird durch Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen linearisierter Vektor mit isolierten DNA-Fragmenten verknüpft, die über eine PCR hergestellt wurden oder die durch Restriktionsspaltung und anschließender Gelextraktion isoliert worden sind. Bei der PCR wurde eine „proofreading“-Polymerase benutzt, wodurch das amplifizierte Produkt glatte Enden besitzt. Deshalb wurde für die Ligation der „Zero Blunt® PCR Cloning“-Kit verwendet. Vektor und Insert wurden im Verhältnis von mindestens 1:10 eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 1 µl T4-DNA Ligase (4 U) pro 10 µl Ansatz bei 16 °C über Nacht inkubiert. Der halbe Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien eingesetzt.

7.3.1.8. Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen

Kompetente Zellen sind Zellen, die fähig sind, freie, zirkuläre DNA aufzunehmen. Durch Behandlung mit CaCl₂ wird die Zellmembran für DNA-Moleküle durchlässig.

Für die Transformation der Plasmid-DNA in TOP10- oder BL21 (DE3)-Zellen wurden kommerzielle kompetente Zellen (Invitrogen, Niederlande) verwendet. Für die Transposition in die Bacmid-DNA wurden bei der Transformation mit dem pFASTBAC™ 1-Vektor die DH10BAC™-Zellen selbst kompetent gemacht. Dazu wurde der Roti®-Transform-Kit von Roth (Deutschland) verwendet. Bei der Herstellung der kompetenten Zellen wurde sich an das Protokoll des Herstellers gehalten.

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

Unter Transformation versteht man einen Mechanismus des Gentransfers und somit die genetische Veränderung von Bakterien. Dabei wird gereinigte DNA von Zellen aufgenommen.

Zu 50 µl kompetenten Zellen wurde der halbe Ligationsansatz oder etwa 100 ng Plasmid-DNA pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Proben wurden anschließend 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden nochmals für 2 Minuten auf Eis und danach in 250 µl LB-Medium oder alternativ SOC-Medium für 1 Stunde schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Aliquots von 50 bis 200 µl wurden auf vorgewärmten Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.3.1.10. Mini-Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Alle Plasmidpräparationen wurden entweder mit dem „NucleoSpin® Plasmid“-Kit oder mit dem „QIAprep® Spin Miniprep“-Kit durchgeführt. Die DNA-Mini-Präparation erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse. Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert und die bakterielle DNA denaturiert. Anschließend hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA unter neutralen Bedingungen wieder, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den Proteinen präzipitiert.

Für eine Mini-Präparation (30 - 50 µg Plasmid-DNA) wurden 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Zellernte wurden 5 ml Kultur 5 Minuten bei Raumtemperatur und 13.000 rpm (Tischzentrifuge Biofuge fresco, Heraeus) zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in 250 µl Puffer 1, versetzt mit 100 µg/µl RNase A, unter leichtem Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 250 µl Puffer 2 dazugegeben, der Ansatz wurde vorsichtig geschwenkt und

Material und Methoden

5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 300 µl Puffer 3 hinzugegeben und die Suspension wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 10 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut 10 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals abgenommen und mit 450 µl Isopropanol versetzt. Die DNA wurde 30 Minuten bei -20 °C gefällt. Die Lösung wurde 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und um restliche Salze zu entfernen wurde das Pellet mit 500 µl kaltem Ethanol (80% v/v) gewaschen. Abschließend wurde nochmals 10 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert, das DNA-Pellet wurde in der Speed-Vac getrocknet und in 50 µl sterilem EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 / 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Zur Kontrolle der Präparation wurden ca. 500 ng DNA auf ein Agarosegel aufgetragen.

Um für Sequenzierungen einen höheren Reinheitsgrad der DNA zu erhalten, wurden ebenfalls *E.coli*-Übernachtskulturen angesetzt und das Plasmid nach den Angaben des Herstellers isoliert (Macherey-Nagel; QIAGEN, Deutschland). Anstatt der Isopropanolfällung wurde dann das Lysat über MicroSpin-Säulen aufgereinigt. Diese enthalten ein Anionenaustauscherharz, an das die Plasmid-DNA bei geringen Salzkonzentrationen und niedrigem pH-Wert bindet. Die Säule wurde mit 600 µl Waschpuffer gewaschen und abschließend getrocknet. Verunreinigungen, wie z. B. Proteine, werden bei mittleren Salzkonzentrationen entfernt. Mit 30 µl EB-Puffer wurde die Plasmid-DNA eluiert und quantifiziert bzw. analysiert.

7.3.1.11. Reinigung von DNA

Häufig sind DNA-Lösungen mit Proteinen verunreinigt. Ebenso können DNA-Lösungen von unerwünschten Oligonucleotidprimern und Verunreinigungen, wie Salzen, Enzymen, nicht inkorporierte Nucleotide, Agarose, Ethidiumbromid, Ölen oder Detergenzien gereinigt werden, indem die DNA-Probe über eine NucleoSpin®-Säule (Macherey-Nagel, Deutschland) gegeben wird. Diese Reinigung erfolgte ebenfalls nach Anweisungen des Herstellers.

7.3.1.12. Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die Konzentration von doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Dabei wurde die Extinktion der Probe ermittelt. Eine Extinktion von $E =$

1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger Plasmid-DNA. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm (E_{260}) und 280 nm (E_{280}), das ein Maß für die Reinheit der DNA darstellt, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Eine weitere Möglichkeit DNA-Mengen zu quantifizieren, bestand in der Abschätzung der Bandenintensität auf Agarosegelen im Vergleich zu bekannten DNA-Mengen.

7.3.1.13. DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen

Als Restriktionsverdau wird die *in vitro*-Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen bezeichnet. Für molekularbiologische Experimente werden Enzyme vom Typ II eingesetzt. Diese spalten an spezifischen Stellen innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz, wobei entweder glatte Enden (*blunt ends*) oder überhängende Enden (*sticky ends*) entstehen können.

Die Restriktion erfolgte unter den vom Hersteller der eingesetzten Restriktionsendonucleasen empfohlenen Bedingungen. Es wurden sowohl analytische als auch präparative Restriktionen durchgeführt, für die über Mini-Präparation gewonnene Plasmid-DNA eingesetzt wurde. Für einen präparativen Ansatz, bei dem die zu verdauende DNA mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig geschnitten werden sollte, wurde ein Doppelverdau durchgeführt. Je nach Restriktionsenzym wurde der Restriktionsansatz 3 Stunden oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden beide Enzyme gleichzeitig in den Ansatz gegeben und mit dem vom Hersteller für einen Doppelverdau angegebenen Puffer versetzt:

7 µl	DNA (~2 µg)
1 µl	Enzym I (10 U)
1 µl	Enzym II (10 U)
1 µl	Puffer Y ⁺ / Tango™ (10x; mit BSA)

10 µl	

7.3.1.14. Sequenzierungen

Zur Sequenzanalyse und zur Kontrolle von Klonierungsschritten werden Sequenzierungen durchgeführt. Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1992) durchgeführt. Bei der Sequenzierung mit Fluoreszenz-markierten Sequenzierprimern wurden 2 pmol Sequenzierprimer mit 1,3 µg DNA auf vier Nukleotidmische („Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing“-Kit) verteilt und die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 6 µl einem

Material und Methoden

Cycle-Sequencing mit 25 Zyklen (20 sec 95 °C / 20 sec 60 °C / 10 sec 72 °C) unterzogen. Anschließend wird 1 µl des zuvor mit 5 µl Gelladepuffer gestoppten Reaktionsmixes auf ein 6%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (LI-COR 4200 dual-dye; MWG-Biotech, Deutschland) analysiert.

7.3.2. Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen

Das Baculovirus-Genexpressions-System hat den Vorteil, daß durch hohe Transfektionsraten hohe Ausbeuten an biologisch aktiven rekombinanten Proteinen gewonnen werden können. Baculoviren sind eine Familie von DNA-Viren, die ausschließlich Invertebraten und bevorzugt Insekten infizieren. Während der Infektion produzieren sie ihr Hüllprotein, Polyhedrin, in außergewöhnlich großen Mengen. Das zu exprimierende Gen wird durch den Polyhedrinpromoter reguliert. Die Produktion startet 3 bis 4 Tage nach der Infektion und dauert 4 bis 5 Tage an, bis die befallenen Zellen lysieren.

Bei dem BAC-TO-BAC[®]-Baculovirus-Expressionssystem (Abb. 55) wird das Fremdgen (Insert) in den Transfer-Vektor kloniert und beinhaltet flankierende Sequenzen, welche homolog zu dem Baculovirus-Genom sind. Innerhalb der Zellen findet die Rekombination zwischen den homologen Bereichen statt. Rekombinante Viren produzieren rekombinantes Protein. Es werden weitere Zellen infiziert, daraus resultieren weitere rekombinante Viren. Die Überexpression von rekombinantem Protein erfolgt dabei nach den Anweisungen des Herstellers (GibcoBRL, USA).

7.3.2.1. Herstellung von rekombinanter Bacmid-DNA

Zunächst wird die zu untersuchende DNA-Sequenz mit den unter 7.3.1. beschriebenen Methoden in das pFASTBAC[™]-Donorplasmid kloniert. Für die anschließende Transposition in die Bacmid-DNA werden DH10BAC[™]-*E.coli*-Zellen mit dem pFASTBAC[™]-Donorplasmid transformiert.

100 µl kompetente DH10BAC[™]-Zellen wurden mit 1 µl (1 µg) Plasmid-DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 45 Sekunden Hitzeschock bei 42 °C wurden die Bakterien nochmals für 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 400 µl SOC-Medium zugegeben. Die Bakterien wurden zur Regeneration für 4 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend jeweils 100 µl auf LB-Kanamycin / Gentamycin / Tetracyclin-Platten ausplattiert und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Neben den Antibiotika für die Selektion enthalten die LB-Platten

Bluo-Gal und IPTG, um durch Blau-Weiß-Selektion die Klone zu identifizieren, bei denen homologe Rekombination zwischen Donorplasmid und Bacmid-DNA stattgefunden hat. Positive weiße Klone werden zur phänotypischen Überprüfung erneut auf LB-Kanamycin / Gentamycin / Tetracyclin-Platten ausgestrichen.

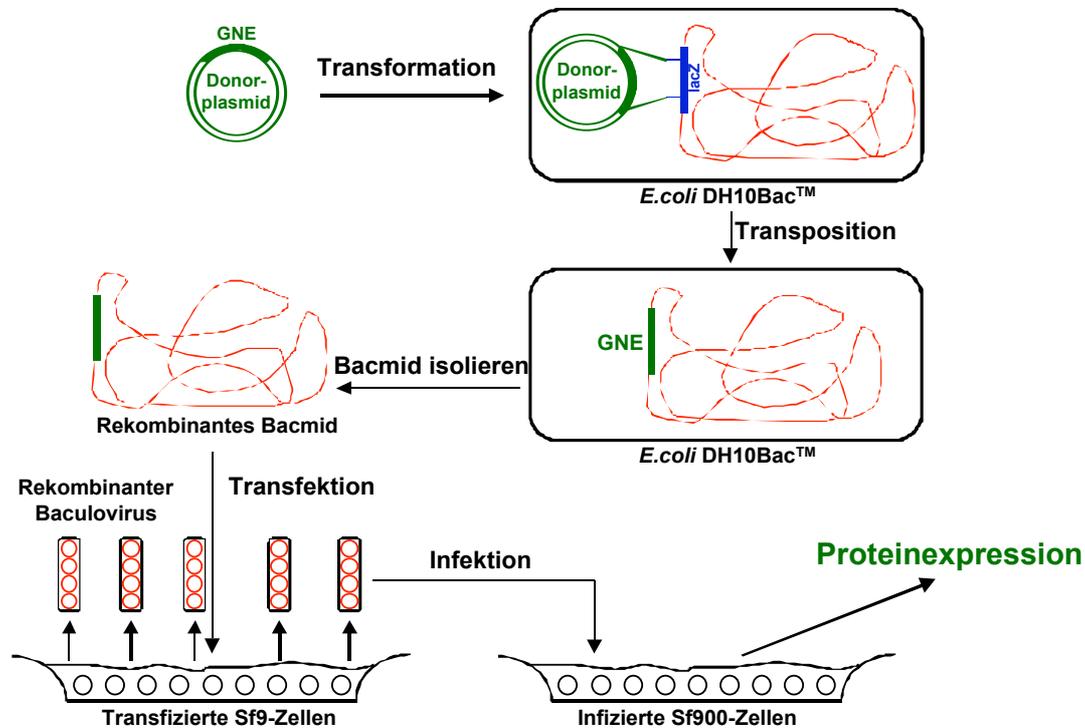


Abbildung 55: BAC-TO-BAC®-Baculovirus-Expressionssystem. Generation des rekombinanten Baculovirus und Proteinexpression in Insektenzellen.

7.3.2.2. Herstellung von rekombinantem Virus

Für die Transfektion, d.h. die Aufnahme der rekombinanten Bacmid-DNA, werden pro Well einer Zellkultur-6-Well-Platte (Falcon, USA) $0,5 \times 10^6$ Sf9-Insektenzellen in 2 ml Grace's-Medium ausgesät und für mindestens 1 Stunde bei 27 °C inkubiert, damit die Zellen adhären können. Währenddessen werden mindestens 5 µl (~5 µg) Bacmid-DNA in 100 µl Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze und 6 µl Cellfectin (Invitrogen, Niederlande) in weiteren 100 µl Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gelöst. Nachdem die Cellfectin-Lösung gut gevortext wurde, werden beide Lösungen zusammengegeben, vorsichtig gemischt und der Transfektionsmix für 45 Minuten bei RT inkubiert, damit sich DNA-Lipid-Komplexe bilden. Die adhärenen Sf9-Zellen werden pro Well mit 2 ml Sf-900 II-Medium ohne weitere Zusätze gewaschen. Anschließend werden zu jedem Transfektionsmix 800 µl Sf-900 II-

Material und Methoden

Medium ohne weitere Zusätze gegeben, gut gemischt und die *Sf9*-Zellen vorsichtig mit dieser Lösung überschichtet. Dabei ist darauf zu achten, daß die Insektenzellen nicht austrocknen. Die *Sf9*-Zellen werden mit dem Transfektionsmix für mindestens 5 Stunden bei 27 °C inkubiert. Anschließend wird der Transfektionsmix abgenommen, die Zellen mit 2 ml Grace's-Medium überschichtet und weiter bei 27 °C inkubiert. Nach 72 Stunden wird der Medienüberstand, indem sich die gebildeten Viren befinden, abgenommen (=Transfektionsüberstand) und für weitere Experimente bei 4 °C gelagert.

7.3.2.3. Amplifikation von Viren

Für die Expressionsversuche werden die Viren in größeren Mengen benötigt. Sie müssen daher zunächst vermehrt werden. Dafür wurden 20 ml *Sf9*-Insektenzellsuspension mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 500 µl Transfektionsüberstand infiziert und für 5 Tage bei 27 °C geschüttelt. Die Insektenzellen wurden 5 Minuten bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert. Der virushaltige Medienüberstand wurde abgenommen (= Urstock) und bei 4 °C gelagert.

Für eine weitere Amplifikation von Virus wurden 100 ml *Sf9*-Zellsuspension mit einer Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit 5 ml Urstock infiziert und bei 27 °C kultiviert. Nach 5 Tagen wurde der virushaltige Medienüberstand durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) geerntet (= Erststock) und bei 4 °C gelagert.

7.3.2.4. Expression von rekombinantem Protein in Insektenzellen

Die Expressionen werden unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt. Insektenzellen wurden bei einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml mit jeweils entsprechenden Volumina Erststock infiziert und unter Schütteln bei 27 °C inkubiert. Nach 48-72 Stunden wurden die Insektenzellen durch Zentrifugieren 5 Minuten bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 7,5 / 1 mM DTT / 1 mM EDTA / 1 mM PMSF) pro 10 ml Insektenzellsuspensionskultur resuspendiert und je nach Menge mittels einer French-Press (One Shot Cell Disruption), durch 30-faches „Douncen“ mit einem Glas-Douncer oder durch 20-maliges Aufziehen in eine Spritze (Braun, Deutschland) aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten wurden im Anschluß bei 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) und

4 °C für 30 Minuten abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

7.3.2.5. Plaque-Assay

Für diesen Assay wurden *Sf9*-Zellen aus einer Schüttelkultur mit FCS verwendet. Es wurden in einer Six-Well-Platte $1,5 \times 10^6$ Zellen in 3ml Medium pro Well ausgesät. Zur Adhäsion der Zellen wurde eine Stunde bei 27 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die Virusverdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-7} angesetzt (je Verdünnungsschritt 100 µl Virus + 900 µl Medium). Nachdem die Virusverdünnung sehr gut gevortext wurde, wurden 500 µl der jeweiligen Verdünnung auf die Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurde in einem Well Medium statt Virus zugegeben. Die Inkubation der Platten erfolgte schwenkend für 2 Stunden bei Raumtemperatur und 12 Zyklen/Minute. Für den Assay wurden 14 ml Medium auf ca. 45 °C vorgewärmt. Desweiteren wurden 7 ml SeaPlaque-Agarose (3% w/v; Biozym, Deutschland) verflüssigt und bei 45 °C temperiert. Bei der Agarosezugabe war schnelles Arbeiten sehr wichtig, da die Agarose fest werden konnte und die Zellen nicht austrocknen durften. Das vorgewärmte Medium (14 ml) wurde zu der Agarose (7 ml) gegeben, gut geschwenkt und nach Absaugen des Virus wurden 3ml des Medium-Agarose-Mixes zügig auf die Zellen pipettiert. Nach 15 Minuten war die Agarose ausgehärtet. Zum Schutz gegen Austrocknung diente die Überschichtung mit je 1 ml Medium pro Well. Der Assay wurde für 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Nach 5 Tagen erfolgte die Färbung mit einer MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Lösung (5 mg/ml in Wasser, sterilfiltriert). Nach Absaugen des Mediums wurden 200 µl MTT-Lösung pro Well eingesetzt und 2 Stunden bei 27 °C inkubiert. Nach der Inkubation konnten die Plaques gezählt werden. MTT färbt alle lebenden Zellen blau an, daher erscheinen die von Viren zerstörten Zellen als weiße Punkte. Für die Auswertung wurden ab der Virusverdünnung alle Plaques gezählt, in der einzelne Plaques gut zu erkennen waren. Die Viruskonzentration wird in MOI angegeben. Es ist ratsam den Assay über Nacht bei Raumtemperatur stehen zu lassen, um am nächsten Tag erneut abzulesen, da einige Plaques noch nachreifen können.

7.3.3. Expression von rekombinanten Proteinen in *Escherichia coli*

Die Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E.coli* erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers des Expressionsvektor pGEXTM-4T-1. Sämtliche Überexpressionen wurden mit dem *E.coli*-Stamm BL21 StarTM(DE3)pLysS

Material und Methoden

durchgeführt. Wie unter 7.3.1.9. beschrieben, wurden zunächst BL21 StarTM(DE3)pLysS-Zellen mit den Vektoren transformiert.

7.3.3.1. Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen

Um die optimalen Bedingungen für eine maximale Expression von rekombinantem Protein zu ermitteln, wurden zunächst Pilotexpressionen durchgeführt. Die Expressionen wurden dabei wie folgt durchgeführt: Einzelne Kolonien wurden in 5 ml LB_{Amp/Cm}-Medium bis zur Sättigung über Nacht bei 37 °C kultiviert. Mit 200 µl dieser Vorkultur wurden 20 ml LB_{Amp/Cm}-Medium (1:100) beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 2 ml-Aliquots abgenommen und durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) pelletiert. Die Zellpellets wurden in 200 µl PBS (1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die Suspensionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und sofort wieder auf 37 °C erwärmt. Dieser Frieren/Tauen-Zyklus wurde fünfmal wiederholt. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten wurden anschließend für 30 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde abgenommen und für eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung verwendet. Das Pellet wurde in 200 µl Probenpuffer resuspendiert und der gleichen Analyse unterzogen.

Die maximale Expression von rekombinantem Protein wurde durch Veränderung mehrerer Parameter ermittelt. Zum einen wurden Bakterien auch über Nacht bei 16 °C kultiviert. Zum anderen wurde die Proteinexpression auch mit 0,1 mM und 0,3 mM IPTG induziert. Es zeigte sich, daß eine maximale Proteinausbeute durch Kultivierung der Bakterien über Nacht bei 16 °C und einer Induktion mit 0,3 mM IPTG erzielt werden konnte.

7.3.3.2. Expression von rekombinantem Protein in *Escherichia coli*

Die Expressionen wurden unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt. Einzelne Kolonien wurden in 5 ml LB_{Amp/Cm}-Medium bis zur Sättigung über Nacht bei 37 °C kultiviert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB_{Amp/Cm}-Medium (1:100) beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 0,3 mM IPTG wurde die Proteinexpression induziert. Nach 16 Stunden wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation für 15

Minuten bei 4 °C und 4.000 rpm (Multifuge 1 L-R, Heraeus) pelletiert. Zur Lyse wurden die Zellen in 10 ml PBS (1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 100 µl Lysozym (10 mg/ml)) resuspendiert und durch einmaliges geben durch eine French-Press (One Shot Cell Disruption) bei 1 bar aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) wurde der cytosolische Überstand abgenommen und für die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

7.3.4. Transiente Proteinexpression in adhärenenten Säugerzellen

Die Transfektion von Säugerzellen erfolgte weitestgehend nach den Angaben des Herstellers des Transfektionsreagenzes (BIO-RAD, Deutschland). Am Tag vor der Transfektion wurde eine entsprechende Menge an Zellen in serumhaltiges Medium umgesetzt und bei 37 °C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert, so daß die Zellen am nächsten Tag zu 50-90% konfluent waren. Am nächsten Tag wurden für jeden Ansatz (10 cm Schale) 12-36 µg der zu transfizierenden DNA in 1,5 ml serumfreien Medium und 40-60 µl der Transfektionsreagenz TransFectin™ in weiteren 1,5 ml serumfreien Medium gelöst. Nachdem die TransFectin™-Lösung gut gevortext wurde, wurden die DNA- und die TransFectin™-Lösung vorsichtig zusammengegeben und gemischt, und für 20 Minuten bei RT inkubiert, damit sich der DNA-Lipid-Komplex bilden kann. Anschließend wurden die 3 ml des DNA-TransFectin™-Komplexes direkt zu den Zellen gegeben. Die Schale wurde vorsichtig geschwenkt, so daß eine gleichmäßige Verteilung gewährleistet war. Nach 4-6 Stunden wurde der DNA-TransFectin™-Komplex abgenommen und durch serumhaltiges Medium ersetzt werden.

Für eine transiente Expression kann die Genaktivität bereits nach 24-48 Stunden getestet werden. Dafür wurden die transfizierten Zellen durch eine Zentrifugation 5 Minuten bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Lysepuffer (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,5 / 1 mM DTT / 1 mM EDTA / 1 mM PMSF) resuspendiert und durch 20-maliges Aufziehen in eine Spritze (Braun, Deutschland) aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten wurden im Anschluß bei 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) und 4 °C für 30 Minuten abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

Material und Methoden

7.3.5. Stabile Proteinexpression in Säugerzellen

Zur stabilen Proteinexpression wurden Säugerzellen mit der Plasmid-DNA über die Cell Line Nucleofektor™ V-Technologie (Amaxa, Deutschland) transfiziert. Diese Technologie beruht auf der Methode der Elektroporation. Bei diesem Verfahren wird unter optimierten Pufferbedingungen durch einen kurzen elektrischen Impuls die Zellmembran kurzfristig permeabilisiert, wodurch die DNA in die Zelle gelangen und direkt in den Zellkern diffundieren kann. Für die Transfektion wurden GNE-defiziente *BJA-B* K20-Zellen verwendet. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert, einmal mit PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) gewaschen und auf 2 x 10⁶ Zellen pro Transfektion eingestellt. Die Zellen wurden ein weiteres Mal abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Nucleofektor™ Solution V (Amaxa, Deutschland) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden 2 µg (maximal 5 µl) Plasmid-DNA dazugegeben. Der Ansatz wurde dann luftblasenfrei in eine Transfektionsküvette überführt. Die Küvette wurde in das Nucleofektor™-Gerät gestellt und das Programm S 18 gestartet. Die Zellen wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette aus der Küvette in eine 10 cm Petrischale mit vorgewärmten RPMI 1640 Medium überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Die transfizierten Zellen sollen nun unter Selektionsdruck wachsen bis die Genaktivität getestet werden kann. Nach 48 Stunden begann die Selektion. Dazu wurden die Zellen in Selektionsmedium (RPMI 1640 Medium mit 2,7 g/l Geneticin (G418)) aufgenommen und eine Woche bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte ein täglicher Mediumswechsel. Nach zwei Wochen wurden die Zellen zum einen mit dem radiometrischen Epimerase-Assay auf ihre GNE-Aktivität hin getestet, und zum anderen durch limitierter Verdünnung subkloniert. Die Klonierung erfolgte im 96-Well-Format. Dazu wurden die Zellen geerntet, einmal mit PBS gewaschen und mit selektionsfreiem Medium auf eine Zelle pro 100 µl eingestellt. Pro Well wurden 100 µl Zellsuspension pipettiert und anschließend bei 37 °C inkubiert. Sobald in den nächsten Tagen eine Konfluenz von nahezu 100% erreicht wurde, erfolgte ein Wechsel zum nächst größeren Format (24-Well, 6-Well) bis hin zur T75-Flasche. Bei jedem Wechsel wurden Klone mit dem radiometrischen Epimerase-Assay getestet. Es wurde nur mit den Klonen mit der höchsten spezifischen Epimeraseaktivität weitergearbeitet.

7.3.6. Allgemeine proteinbiochemische Methoden

7.3.6.1. Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die rekombinant mit C- bzw. N-terminalem His-Tag exprimierte GNE kann über eine Ni-NTA-Agarose-Säule aufgereinigt werden. Der proteinhaltige Überstand nach dem Zellaufschluß und anschließender Zentrifugation wurde auf 500 µl Ni-NTA-Agarose (QIAGEN, Deutschland) in Poly-Prep-Chromatography-Columns (BIO-RAD, Deutschland) aufgetragen. Die Säule wurde zuvor mit 2 x 1 ml Ni-NTA-Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8,0 / 300 mM NaCl / 20 mM Imidazol) äquilibriert. Nachdem die Säule mit der Probe 30 Minuten bei 4 °C geschwenkt wurde, wurden nicht bindende Proteine mit weiteren 2 x 1 ml Ni-NTA-Waschpuffer eluiert. Die GNE wurde anschließend mit 2 ml Ni-NTA-Elutionspuffer (Ni-NTA-Waschpuffer mit 100 mM Imidazol) eluiert. Fraktionen zu je 3 Tropfen (~150 µl) wurden gesammelt.

Um störende Salze abzutrennen, wurden proteinhaltige Fraktionen vereinigt und auf eine PD10-Säule (Pharmacia, Deutschland) aufgetragen, die zuvor mit Gelfiltrationspuffer (10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,5 / 100 mM NaCl / 1 mM EDTA / 1 mM DTT) äquilibriert wurde. Proteine wurden mit 5 ml Gelfiltrationspuffer mittels Gravitationskraft eluiert. Fraktionen von je 5 Tropfen (~250 µl) wurden während der Chromatographie gesammelt und anschließend analysiert.

7.3.6.2. Glutathion-Affinitätschromatographie

Die rekombinant mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase (GST) exprimierten VCP- bzw. Oxr1-Proteine können über eine „Glutathion-Sepharose 4B MicroSpin“-Säule (GE Healthcare) aufgereinigt werden. Dabei wurde der „MicroSpin GST Purification Module“-Kit verwendet und sich weitestgehend an die Vorgaben des Herstellers gehalten. Die Säule wurde zuvor einmal mit 600 µl PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) äquilibriert. Nach einer Zentrifugation (1 Minute, 3.000 rpm; Biofuge fresco, Heraeus) wurde das Lysat (~600 µl) auf die MicroSpin-Säule gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden nicht bindende Proteine dreimal mit je 600 µl PBS eluiert. Dazwischen erfolgte jedes Mal ein weiterer Zentrifugationsschritt. Anschließend wurde dreimal mit je 100 µl Glutathion (10 mM in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) eluiert. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung oder Western-Blot analysiert und in den folgenden beschriebenen Experimenten eingesetzt.

Der GST-Tag von GST-Fusionsproteinen läßt sich durch die Endopeptidase

Material und Methoden

Thrombin abspalten. Nach der Reinigung über die Glutathion-MicroSpin-Säule wurden 50 µl der eluierten Fraktionen mit 2 µl (2 U) Thrombin-Protease (GE Healthcare) versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einer SDS-PAGE analysiert.

7.3.6.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) durchgeführt, bei der der Farbstoff Coomassie-Brillantblau mit Proteinen unter Komplexbildung reagiert.

20 µl proteinhaltige Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (10% (v/v) Phosphorsäure / 5% (v/v) Ethanol / 0,1% (w/v) Coomassie G-250) versetzt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 578 nm bestimmt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin.

7.3.6.4. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die vertikale SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) mit dem SDS-PAGE Mini-Protean III System durchgeführt. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an hydrophobe Regionen der Proteine an, wodurch diese denaturiert werden und eine stark negative Ladung eingeführt wurde. Dabei ist die Ladung eine Funktion der Größe der Proteine. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes ist die Beweglichkeit der Proteine in der SDS-PAGE dann umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekulargewichte.

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese wird ein System aus zwei Gelen, einem Trenn- und einem Sammelgel, verwendet. Das Sammelgel weist einen sauren pH-Wert auf, so daß das im Laufpuffer enthaltene Zwitterion Glycin im Sammelgel nur zu einem geringen Teil als Anion vorliegt. Dadurch kommt es beim Anlegen eines elektrischen Feldes zu einem Mangel an Anionen im Sammelgel, so daß sich ein starkes lokales elektrisches Feld zwischen den sich schnell bewegenden Chloridionen und den langsameren Glycinanionen aufbaut. Dies führt zu einer stärkeren Beschleunigung der anionischen Proteine in dem großporigen Sammelgel und damit zu einer Fokussierung der Proteine. Mit dem Übergang ins Trenngel gehen die Glycin-Zwitterionen aufgrund des höheren pH-Wertes wieder voll in den anionischen Zustand über, wodurch der Ionenmangel aufgehoben wurde und wieder eine konstante Feldstärke im gesamten Gel herrscht. Aufgrund der kleineren Porengröße des Trenngels werden die Proteine entsprechend ihrem Verhältnis

Material und Methoden

Molekulargewicht zu Ladung verlangsamt.

Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurden die proteinhaltigen Proben mit Probenpuffer gemischt und 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte dann bei einer konstanten Spannung von 120 V, für 10 Minuten, anschließend bei 200 V. Als Größenstandard diente der Molekulargewichtsmarker „Precision Plus Protein™ Standards All Blue“ (BIO-RAD, Deutschland).

Lösung A: 30% Acrylamid (w/v)
 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)

Lösung B: 0,4% SDS (w/v)
 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Lösung C: 0,4% SDS (w/v)
 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8,8
 192 mM Glycin
 0,1% SDS (w/v)

5 x Probenpuffer: 0,3 M Tris-HCl, pH 6,8
 50% Glycerin (v/v)
 15% SDS (w/v)
 0,015% Bromphenolblau (w/v)
 50 mM DTT (nur bei reduzierendem Probenpuffer)

Ansatz für 7,5%ige Trenngele: 2,25 ml Lösung A
 2,25 ml Lösung B
 4,5 ml H₂O (bidest.)
 50 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v)
 12 µl Tetramethyldiamin

Material und Methoden

Ansatz für 4%ige Sammelgele:	0,4 ml Lösung A
	0,75 ml Lösung C
	1,85 ml H ₂ O (bidest.)
	12 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v)
	3 µl Tetramethyldiamin

7.3.6.5. Coomassie-Färbung von Proteingelen

Proteine über 0,5 µg können in Gelen mit dem Farbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 angefärbt werden, wobei der Farbstoff mit den Proteinen unter Komplexbildung reagiert. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel für mindestens eine Stunde bei RT in Färbelösung geschüttelt. Verwendet wurde Bio-Safe™ Coomassie Stain von BIO-RAD (0,04% (w/v) Brilliant Blue G-250 in 5% (v/v) H₃PO₄). Das gefärbte Gel wurde anschließend in H₂O (bidest.) bei RT geschüttelt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt waren.

7.3.6.6. Silberfärbung von Proteingelen

Proteine, deren Menge zwischen 0,5 µg und 50 ng liegt, können in Proteingelen mit der Silberfärbung nachgewiesen werden. Nach der Elektrophorese wurde das Trenngel für 20 Minuten bei RT in Fixierlösung (40% (v/v) Ethanol / 10% (v/v) Essigsäure / 0,05% (v/v) Formaldehyd) geschüttelt. Anschließend wurde dreimal für 5 Minuten mit 50% (v/v) Ethanol gewaschen. Dann wurde 1 Minute in 0,02% (w/v) Na₂S₂O₃ unter leichtem Schwenken inkubiert, dreimal 20 Sekunden in H₂O (bidest.) gewaschen, 15 Minuten in 0,16% (w/v) Silbernitrat / 0,08% (v/v) Formaldehyd inkubiert und erneut zweimal 20 Sekunden mit H₂O (bidest.) gewaschen. Die Färbung erfolgte nach Sichtkontrolle in 5% (w/v) Natriumcarbonat / 0,0005% (w/v) Na₂S₂O₃ / 0,05% Formaldehyd für 1-5 Minuten. Das Gel wurde zügig in Fixierlösung überführt, wodurch die Färbereaktion gestoppt wurde. Nach 20-minütiger Inkubation in der Fixierlösung wurde das Gel bis zum Trocknen in Wasser gelagert.

7.3.6.7. Western-Blotting

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurde in Anlehnung an Towbin *et al.* (1979) im Tank-Blot-Verfahren mit Blotapparaturen der Firma BIO-RAD (Deutschland) durchgeführt. Direkt nach der Elektrophorese wurde der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut, so daß die Nitrocellulosemembran (Protran® Nitrocellulose Transfer Membran; Schleicher &

Schuell, Deutschland) zur Anode zeigt. Der Transfer wurde bei RT mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für eine Stunde in Transferpuffer (25 mM Tris / 160 mM Glycin / 10% (v/v) Ethanol) durchgeführt. Zur Überprüfung des Proteintransfers werden die auf die Membran übertragenen Proteine mit Ponceau-Färbelösung (0,2% (w/v) Ponceau-Rot S / 3% (v/v) Trichloressigsäure / 3% (w/v) Sulfosalicylsäure) angefärbt. Dazu werden die Membran etwa 5 Minuten in die Färbelösung getaucht und dann mit H₂O (bidest.) solange entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden.

7.3.6.8. Immunologischer Proteinnachweis auf Nitrocellulosemembranen

Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrocellulose-Membran erfolgte immunologisch mit Antikörpern. Dafür wurde die Membran zunächst für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit Blockierungspuffer (5% (w/v) Milchpulver in PBS-Tween (0,1%)) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 5 Minuten in PBS-Tween (0,1%) gewaschen und für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Als primäre Antikörper dienten der monoklonale α -Penta-His-Antikörper (1:2.000 in PBS-Tween (0,1%); QIAGEN, Deutschland) und der Peroxidase konjugierte α -GST-Antikörper (1:2.000 in PBS-Tween (0,1%); Sigma, USA). Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS-Tween (0,1%) für 5 Minuten wurde die Membran für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Der verwendete sekundäre Antikörper α -RAM (Rat Anti-Mouse; 1:5.000 in PBS-Tween (0,1%); Jackson ImmunoResearch, Großbritannien) ist ebenso mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt, so daß die Blotmembranen mit dem Enhanced-Chemoluminescence-Luminol-System entwickelt werden können. Zuvor wurde die Membran noch je zweimal mit PBS-Tween (0,1%) und PBS gewaschen, anschließend mit Whatman-Papier getrocknet und in eine Folie gelegt. Bei der Inkubation mit einer frisch hergestellten Mischung aus 10 μ l 6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO, 1 ml 1,25 mM Luminol in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 und 3 μ l 3% (v/v) H₂O₂ katalysiert die Peroxidase eine Chemolumineszenz-Reaktion, deren Signale mit einer LAS-1000-Kamera (Fuji, Japan) aufgenommen werden.

7.3.6.9. UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assays

Zum Nachweis der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität wurde zum einen ein UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Assay mit anschließendem colorimetrischen Nachweis des

Material und Methoden

entstandenen ManNAc durchgeführt.

100 µl Probe wurden mit 45 µl 200 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 7,5), 45 µl 50 mM MgCl_2 und 2,5 µl 100 mM UDP-GlcNAc gemischt und in der Regel für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine 1-minütige Inkubation bei 100 °C gestoppt. Die denaturierten Proteine aus dem Enzymreaktionsansatz wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) für 2 Minuten pelletiert. Das entstandene ManNAc wurde mittels Morgan-Elson-Reaktion (Reissig *et al.*, 1955), mit dem spezifisch *N*-Acetylhexosamine detektiert werden, nachgewiesen (Abb. 56). Nach der Zentrifugation wurden 150 µl des Überstandes mit 30 µl 0,8 M H_3BO_3 -Puffer (pH 9,1; mit KOH eingestellt), gemischt und für 3 Minuten bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 800 µl Farbreagenz (1% (w/v) 4-Dimethylaminobenzaldehyd / 1,25% (v/v) 10 M HCl in Essigsäure) zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Extinktion wurde bei 578 nm gemessen.

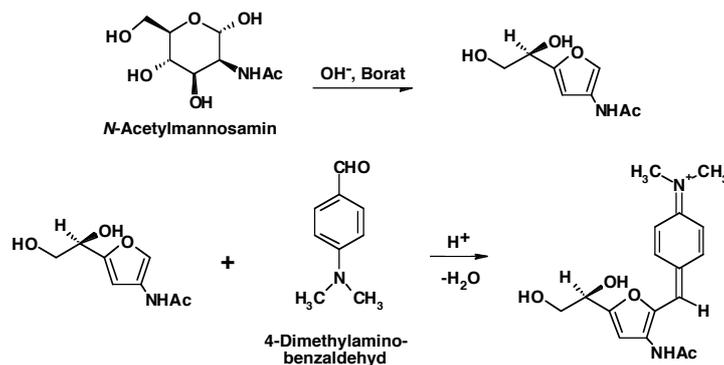


Abbildung 56: Morgan-Elson-Reaktion nach Reissig *et al.*, 1955.

Zum anderen wurde zum Nachweis der der UDP-GlcNAc-2-Epimerase-Aktivität ein radiometrischer Nachweis des entstandenen ManNAc durchgeführt. Für diesen Assay wurden 330 µg (maximal 80 µl) Protein eingesetzt. Zusätzlich zu 35 µl Na-Phosphat-Puffer (200 mM, pH 7,5) und 20 µl MgCl_2 (50 mM) wurden 10 µl ^{14}C -UDP-GlcNAc/UDP-GlcNAc, (50 nCi, 10 mM) in den Enzymreaktionsansatz gegeben. In der Regel wurde die Enzymreaktion für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das entstandene ^{14}C -ManNAc wurde durch absteigende Papierchromatographie von ^{14}C -UDP-GlcNAc abgetrennt. Die Proben wurden auf Whatman 3MM-Chromatographiestreifen (Herolab, Deutschland) von 2 x 48 cm aufgetragen. Die Chromatographie wurde für 16-20 Stunden mit 70% (v/v) 1-Propanol / 100 mM Natriumacetat (pH 5,0) durchgeführt. Die getrockneten Chromatographiestreifen wurden anschließend in 2,5 cm lange Stücke geschnitten und die Radioaktivität mit 5

ml Ultima Gold XR (Packard, Niederlande) in einem Tri-Carb 1900 CA Flüssigszintillationszähler (Packard, Niederlande) gemessen. Der Rf-Wert für UDP-GlcNAc und ManNAc beträgt unter diesen Bedingungen 0,08 bzw. 0,55.

7.3.6.10. ManNAc-Kinase-Assay

Zum Nachweis der ManNAc-Kinase-Aktivität wurde ein colorimetrischer ManNAc-Kinase-Assay durchgeführt.

80 µl Probe wurden mit 65 µl Tris-HCl (200 mM, pH 8,1 / 65 mM MgCl₂), 20 µl 100 mM ATP, pH 7,5, 10 µl 100 mM ManNAc, 10 µl frisch angesetztem 100 mM Phosphoenolpyruvat, 10 µl frisch angesetztem 15 mM NADH und 2 µl Lactat-Dehydrogenase/Pyruvatkinase (je 2 U) gemischt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Aktivität der ManNAc-Kinase wurde durch einen gekoppelt-optischen Test nach Warburg nachgewiesen (Abb. 57). Die Abnahme der NADH-Konzentration führt zu einer Verringerung der Absorption bei 340 nm. Nachdem die Enzymreaktion durch Zugabe von 800 µl 10 mM EDTA, pH 7,5 gestoppt wurde, wurde die Extinktion bei 340 nm gegen Wasser gemessen. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne ManNAc-Kinase.

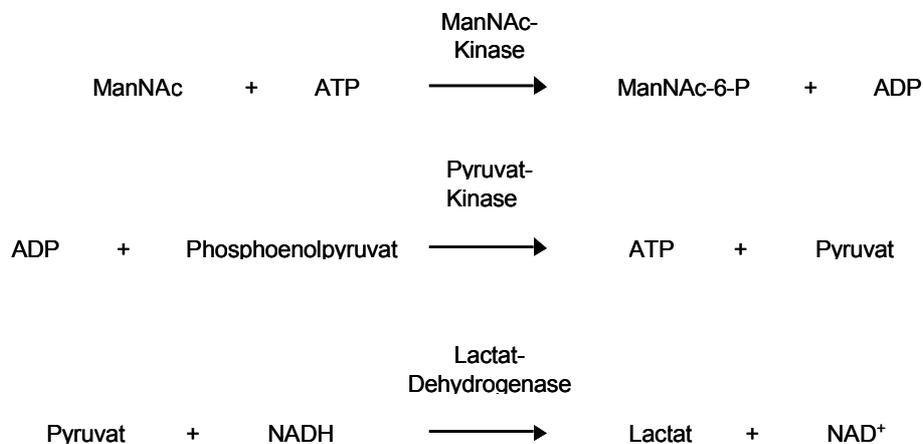


Abbildung 57: Colorimetrischer ManNAc-Kinase-Assay.

7.3.6.11. Gelfiltrationschromatographie

Zur Bestimmung der Quartärstruktur von Proteinen dient die Gelfiltrationschromatographie. Das Prinzip der Methode beruht auf der Trennung von Proteinen nach ihrer Größe. Die Probe wird auf eine Säule aus porösen Kügelchen aufgetragen, die aus einem unlöslichen, aber stark hydratisierten Polymer bestehen. Kleine Moleküle können in diese Kügelchen eindringen, große nicht. Folglich

Material und Methoden

verteilen sich kleine Moleküle sowohl in der wäßrigen Lösung innerhalb der Kügelchen als auch zwischen ihnen, wohingegen große Moleküle auf das wäßrige Medium zwischen den Kügelchen beschränkt bleiben. Große Moleküle passieren die Säule schneller und verlassen sie zuerst, weil ihnen nur ein kleineres Volumen zugänglich ist.

Nach der Reinigung der Proteine über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und PD10-Säule wurden 350 µl der gepoolten Fraktionen auf eine SuperdexTM200 10/300GL-Säule (Amersham Biosciences, Großbritannien) aufgetragen. Als Laufpuffer dienten 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 7,5 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 100 mM NaCl. Es wurden Fraktionen von 500 µl bei einer Flußrate von 0,5 ml/min gesammelt. Als Größenstandard diente ein Gemisch aus Proteinen mit unterschiedlichen molekularen Massen, bestehend aus Thyreoglobulin (670 kDa), IgG (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa) und Myoglobin (17 kDa) (BioRad, Deutschland). Das Verhältnis des dekadischen Logarithmus der Molekularmasse ist linear zum Elutionsvolumen der Proteine. Nach Erstellung einer Geradengleichung konnte aus den Elutionsvolumina der einzelnen Isoformen die molekulare Masse bestimmt werden.

7.3.6.12. Durchflußcytometrie

Um die Sialylierung von Glycokonjugaten auf der Zelloberfläche zu untersuchen, wurde eine Durchflußcytometrie nach dem Prinzip des „*Fluorescence Activated Cell Sorting*“ (FACS) durchgeführt. Diese Methode beruht auf die Erkennung in und Isolierung einzelner Zellen aus einer Zellpopulation anhand ihrer Größe, Granularität oder Oberflächeneigenschaften. Zellen werden dabei meistens mit einem Antikörper inkubiert, der gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist. Dieser Antikörper kann entweder direkt oder indirekt über einen sekundären Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sein. In diesem speziellen Fall wurde mit Lektinen gearbeitet, die ebenfalls fluoreszenzmarkiert und gegen spezifische Kohlenhydrate gerichtet sind. Im Durchflußcytometer werden die markierten Zellen von einem Laserstrahl erfaßt, wodurch es zu einer Anregung des gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes kommt. Durch die daraus resultierende Emission von Licht einer bestimmten Wellenlänge erhält man ein spezifisches Signal. Innerhalb kürzester Zeit können tausende Zellen in einem Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet und allgemein charakterisiert werden. Das verwendete FACS-Gerät stammt von der Firma BD Biosciences (Deutschland) und besitzt einen Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Bei diesem Experiment wurde mit den

Lektinen VVA und LFA, die mit dem Fluorochrom Fluorescein (FITC) konjugiert sind, gearbeitet.

Zunächst wurden die Zellen durch eine Zentrifugation 5 Minuten bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) geerntet und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden zu dem Zellpellet 100 µl Lektin-Lösung (VVA: 5 µg/100 µl PBS; LFA: 2 µg/100 µl) gegeben, vorsichtig gemischt und eine Stunde in der Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellpellets in 1-2 ml PBS aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und am FACS-Gerät vermessen.

7.3.6.13. Pull-down-Versuche

Mit Hilfe der *Pull-down*-Versuche kann man Proteine mit samt ihrer Interaktionspartner aus einer komplexen Proteinlösung präzipitieren. In dieser Arbeit wurden *Pull-down*-Versuche sowohl über die eine GST-Sepharose als auch über eine Ni-NTA-Agarose durchgeführt. Hierfür wurden die GST-Fusionsproteine (VCP bzw. Oxr1), das GST-Protein und die His-getagten GNE-Proteine (N-His-GNE1, N-His-GNE1 M712T, GNE1-C-His) in *Sf900*- bzw. *E.coli*-Zellen exprimiert. Das GST-VCP-Fusionsprotein und das C-terminal His-getagte GNE-Protein wurden zudem in *Sf900*-Zellen co-exprimiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in Lysepuffer aufgenommen und je nach Volumen mittels Spritze oder „One Shot“-Gerät aufgeschlossen. Nach einer weiteren Zentrifugation (30 Minuten, 4 °C, 13.000 rpm; Biofuge fresco, Heraeus) wurde der lösliche Überstand für den *Pull-down* verwendet.

Für einen GST-*Pull-down* wurde der „MicroSpin GST Purification Module“-Kit verwendet. Die Säule wurde zuvor einmal mit 600 µl PBS äquiliert. Nach einer Zentrifugation (1 Minute, 3.000 rpm; Biofuge fresco, Heraeus) wurde der lösliche Überstand (~600 µl) auf die MicroSpin-Säule gegeben und drehend eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Die Sepharose wurde dreimal mit je 600 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Lysate von N-His-GNE1, N-His-GNE1 M712T und GNE1-C-His auf die Säulen mit den gebundenen GST-Fusionsproteinen gegeben und über Nacht bei 4 °C drehend inkubiert. Abschließend wurde mit Glutathion (10 mM in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) eluiert. Die Proben wurden in reduzierendem SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und waren dann bereit für die Auftrennung in der SDS-PAGE und für die Analyse im Western-Blot mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis.

Material und Methoden

Für den Ni-NTA-*Pull-down* wurden die MicroSpin-Säulen aus dem „MicroSpin GST Purification Module“-Kit und Ni-NTA-Agarose der Firma QIAGEN (Deutschland) verwendet. Es wurden 100 µl Ni-NTA-Agarose eingesetzt. Diese wurde zuvor einmal mit 600 µl Ni-NTA-Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 8,0 / 300 mM NaCl / 20 mM Imidazol) äquilibriert. Nach einer Zentrifugation (1 Minute, 3.000 rpm; Biofuge fresco, Heraeus) wurde der lösliche Überstand auf die Säule gegeben und eine Stunde bei 4 °C drehend inkubiert. Als Kontrolle wurden sowohl die GST-Fusionsproteine als auch das GST-Protein direkt auf die Ni-NTA-Säule gegeben. Nicht bindende Proteine wurden dreimal mit 600 µl Ni-NTA-Waschpuffer eluiert. Die Lysate der GST-Fusionsproteine wurden ebenfalls auf die Säule gegeben und über Nacht bei 4 °C drehend inkubiert. Abschließend wurde mit 100 µl Ni-NTA-Elutionspuffer (Ni-NTA-Waschpuffer mit 100 mM Imidazol) eluiert. Die Proben wurden in reduzierendem SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und waren dann bereit für die Auftrennung in der SDS-PAGE und für die Analyse im Western-Blot mit anschließendem immunologischen Proteinnachweis.

7.3.6.14. Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Als Immunpräzipitation (IP) wird die Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen bezeichnet. Heute dient die IP als analytische Methode. Bei der Co-Immunpräzipitation (Co-IP) lassen sich über eine Sepharosematrix und mit Hilfe eines Antikörpers Proteine mit samt ihrer Interaktionspartner aus Proteingemischen, z. B. Zelllysaten präzipitieren. Diese Sepharosematrix ist mit Protein G (Protein G-Sepharose™ 4 Fast Flow; Amersham Biosciences, Schweden) beschichtet. Protein G ist ein Protein der bakteriellen Zellwand (*Streptococcus pneumoniae*) und bindet mit hoher Affinität an die konstanten Ketten von IgG-Antikörpern vieler Säuger. Verwendet wurde der α-Penta-His-Antikörper. Nach Bindung des Fc-Teils des α-Penta-His-Antikörper an die Protein G-Sepharose bleibt der Fab-Teil des Antikörpers für die Bindung des Proteins mit Interaktionspartner zugänglich. Alle anderen Proteine lassen sich mit mehrfachem Waschen abtrennen.

In dieser Arbeit erfolgte die Co-IP des GNE-Proteins samt seines möglichen Interaktionspartners VCP aus frischen Zelllysaten co-transfizierter bzw. einzeln transfizierter *Sf900*-Zellen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation geerntet, in 1 ml Na-Phosphat-Puffer (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert, und durch 30-maliges Aufziehen in eine Spritze (Braun, Deutschland) aufgeschlossen. Nachdem 60 µl der Protein G-Sepharose einmal mit dem Na-

Phosphat-Puffer gewaschen wurden, um im Lagerungspuffer enthaltenes Ethanol zu entfernen, wurde das Zelllysate dazugegeben und eine Stunde bei 4 °C drehend inkubiert. Dieser Schritt diente der Vermeidung unspezifischer Bindungen. Anschließend wurde das Zelllysate mit 25 µl (200 ng/µl) des α -Penta-His-Antikörpers eine Stunde bei 4 °C drehend inkubiert. Es folgte eine weitere Zugabe von 60 µl Protein G-Sepharose. Die Kopplung des Antikörpers an Protein G erfolgte eine Stunde drehend bei 4 °C. Nach der Inkubation des präadsorbierten Lysats mit der Antikörper-gekoppelten Sepharose wurde diese abzentrifugiert (1 Minute, 3.000 rpm; Biofuge fresco, Heraeus) und dreimal mit je 100 µl Na-Phosphat-Puffer gewaschen. Abschließend wurde das Pellet in reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Zur Identifizierung wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse durchgeführt. Bei einzeln transfizierten Zellen wurde nach den Waschschrinen das Zelllysate des möglichen Interaktionspartners VCP zu der Antikörper-gekoppelten Sepharose gegeben und über Nacht bei 4 °C drehend inkubiert. Danach wurde ebenfalls die Sepharose abzentrifugiert und dreimal mit je 100 µl Na-Phosphat-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Zur Identifizierung wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse durchgeführt.