

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad z. A.

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
[α - ³² P]-dCTP (6000 Ci/mmol)	NEN Life Science Products, Köln
[γ - ³² P]-ATP (3000 Ci/mmol)	NEN Life Science Products, Köln
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
0,24 -9,5 kb RNA-Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
1 kb DNA-Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (X-Gal)	Carl Roth, Karlsruhe
10 kDa Proteinleiter	Life Technologies, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Promega, Mannheim
Agar	Life Technologies, Karlsruhe
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	MERCK, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	SIGMA, Deisenhofen
Aquasafe 300 Plus-Szintillationslösung	Zinsser Analytic, Frankfurt a. M.
Benzamidin	SIGMA, Deisenhofen
<i>Bovine Serum Albumine</i> (BSA)	SIGMA, Deisenhofen
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Cacodylsäure Natriumsalz-3-hydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	SIGMA, Deisenhofen
<i>Complete</i> [™] , Mini (Protease-Inhibitoren-Cocktail, Tabl.)	Roche Diagnostics, Mannheim
Coomassie Brilliantblau G 250	Carl Roth, Karlsruhe
D-(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Dextranblau	SIGMA, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	New England BioLabs Inc., Schwalbach
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	SIGMA, Deisenhofen
Essigsäure, 99-100 %	MERCK, Darmstadt
Ethanol	J.T. Baker, Deventin, Niederlande
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylendiamine-Glykol-bis-(β -Aminoethylether)-Tetra-essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (Titrierkomplex III)	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Gibco, Eggenstein
Ficoll Typ 400	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Formaldehyd	MERCK, Darmstadt
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe
Gelatine (aus Kaltwasserfisch-Haut)	MERCK, Darmstadt
Glukose	MERCK, Darmstadt
Glutathion	SIGMA, Deisenhofen
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glücksklee [®] Magermilchpulver	Nestlé Deutschland AG, Frankfurt
Glykogen	SIGMA, Deisenhofen
Glyoxal	SIGMA, Deisenhofen
Glyzerin	SIGMA, Deisenhofen
Glyzin, freie Base	Applichem, Darmstadt
Harnstoff	FLUKA Chemie, Schweiz
Hefeextrakt	Life Technologies, Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Promega, Mannheim
<i>High Molecular Weight Standard Mixture</i> , Proteinleiter für SDS-PAGE	SIGMA, Deisenhofen
Imidazol	Carl Roth, Karlsruhe
Immumount	Shandon, Pittsburgh, USA
Ionenaustauschermaterial AG 501 X8	BioRad, München
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
Isopropyl-1-Thio- β -D-Galaktopyranosid (IPTG)	SIGMA, Deisenhofen
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	MERCK, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	J.T. Baker, Deventin, Niederlande
Kalziumchlorid-2-Hydrat	MERCK, Darmstadt
Kanamycin (Kanamycin A) Monosulfat	SIGMA, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	J.T. Baker, Deventin, Niederlande
Magnesiumsulfat wasserfrei	SIGMA, Deisenhofen
Maltose	SIGMA, Deisenhofen
Methanol	J.T. Baker, Deventin, Niederlande
N,N-Dimethylformamid	SIGMA, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	SIGMA, Deisenhofen
Natriumacetat Anhydrit	SIGMA, Deisenhofen
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventin, Niederlande
Natriumzitat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	MERCK, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	MERCK, Darmstadt
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe

Nonidet P40	Carl Roth, Karlsruhe
Ovalbumin	SIGMA, Deisenhofen
Paraformaldehyd	MERCK, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	SIGMA, Deisenhofen
Pepton 140	Life Technologies, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	J.T. Baker, Deventin, Niederlande
Polyvinylpyrrolidon	SIGMA, Deisenhofen
Ponceau S, reinst	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Prestained Proteinleiter, broad range</i>	New England Biolabs Inc., Schwalbach
Protein A Sepharose	SIGMA, Deisenhofen
Proteinkinase A, katalytische Untereinheit	Promega, Mannheim
Proteinkinase A, regulatorische Untereinheit	Promega, Mannheim
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Schwalbach
Roti [®] -Phenol/Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese [®] Gel 30, Acrylamid- und Bisacrylamid-stammlösung (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640-Zellkulturmedium	SIGMA, Deisenhofen
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure 36-38 %, z.A.	J.T. Baker, Deventin, Niederlande
Sepharose G 50	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
T4-Ligase	New England Biolabs Inc., Schwalbach
Tetracyclin	SIGMA, Deisenhofen
Thiopropyl Sepharose 6 B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thrombin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Trasylol (= Apronitin)	SIGMA, Deisenhofen
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	MERCK, Darmstadt
Triton X-100 [®]	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsininhibitor Typ I-S aus Sojabohnen (STI)	SIGMA, Deisenhofen
Tween [®] 20	Carl Roth, Karlsruhe
Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	Promega, Mannheim

2.1.2 Reagenziensätze (Kits)

Reagenziensätze (Kits)	Bezugsquelle
ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Advantage™ 2 Polymerase Mix	Clontech, Heidelberg
DNase I, Amplification Grade Kit	Life Technologies, Karlsruhe
pGEM®-T/pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega, Mannheim
GeneClean® II Kit	Transduction Laboratories (Dianova), Hamburg
Lumi-Light, Western Blotting Substrat	Roche Diagnostics, Mannheim
Marathon-Ready™ cDNA	Clontech, Heidelberg
Megaprime DNA-Markierungs Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
peqGOLD RNAPure™	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
QIAEX II Kit QIAGEN Plasmid Mini und Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini und Midi Kit	QIAGEN, Hilden
Red-Taq-Polymerase Kit	SIGMA, Deisenhofen
TOPO®XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Niederlande

2.1.3 Peptide

Alle Peptide wurden von der Abteilung Peptidchemie des FMP synthetisiert, durch Flüssigkeitschromatografie über Polyencap A300 Säulen (Bischoff, Leonberg) gereinigt und durch Massenspektrometrie (TSQ 700, Finnigan MAT, Bremen) analysiert (Klußmann et al. 1999).

Peptide
Peptid 1965 (Aminosäurereste 369-383 von rHt31)
Peptid 3060 (Aminosäurereste (-66)- (-46) von hHt31)
Ht31-Peptid (Aminosäurereste 493-515 von hHt31)
Ht31-P-Peptid (Aminosäurereste 493-515 von hHt31 mit zwei Mutationen: I502P und I507P)

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Anti-rHt31-Antiserum 1965, gerichtet gegen Aminosäurereste 369-383 von rHt31	BioGenes, Berlin
Anti-hHt31-Antiserum 3060, gerichtet gegen Aminosäurereste (-66)-(-46) von hHt31	BioGenes, Berlin
Cy [™] 3-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. (Dianova), Hamburg
Meerrettichperoxidase-konjugierte affinitätsgereinigte Esel-anti-Kaninchen IgG	Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. (Dianova), Hamburg

2.1.5 Sonstige Materialien

sonstige Materialien	Bezugsquelle
Centricon-Röhrchen (YM-30)	Millipore, Eschborn
Chromatography Columns, BioRad Poly-Prep (Nr. 731-1550)	BioRad, München
Filterpapier, extra dick (Nr. 1703965)	BioRad, München
Glogos-Marker (fluoreszierendes Lineal)	Stratagene, Heidelberg
Kodak-X-OMAT-Röntgenfilm	Kodak, USA
Nitrozellulosemembranen Hybond-C extra und OPTI-BRAN BA-S 85	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran Nytran NY 13	Schleicher & Schuell, Dassel
Rat Multiple Tissue Northern Blot	Clontech, Heidelberg
Whatman Gel-Blotting-Papier GB 004	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.6 Geräte

Autoklaven	Varioklav, Oberschleißheim
Brutschränke	Heraeus, Berlin
Elektrophoresekammern	Carl Roth, Karlsruhe
Epifluoreszenzmikroskop DMLB	Leica, Wetzlar
Eppendorf-Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Flüssigkeitsszintillationsmeßgerät Wallac 1409	Wallac-ADL, Freiburg
Fotometer Gene Quant HE 99 X Ultraspec II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Geigerzähler LB 122	Berthold, Wildbad
Geltrockner, BioRad Modell 583	BioRad, München

Glas-Teflon-Homogenisator POTTER S	B. Braun Biotech International,
Laser Scanning Mikroskop LSM 410	Zeiss, Jena
Lumi-Imager F1	Roche Diagnostics, Mannheim
Netzgeräte	BioRad, München
PCR-Geräte Perkin Elmer Thermocycler 9700 Biometra Trio-Thermoblock™	Perkin Elmer, Weiterstadt Biometra,
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Schweiz
Phosphoimager	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Plexiglas Hybridisierungskammer	hauseigene Werkstatt des FMP
QIAGEN Biorobot 9600	QIAGEN, Hilden
Rotationsrad Tube Rotator SB1	Stuart Scientific, Staffordshire, UK
Rotoren Beckman JA-14 Festwinkelrotor Beckman 60 Ti <i>swing out</i> Rotor Sorvall SS34 Festwinkelrotor	Beckman, München Beckman, München Sorvall, Bad Homburg
Schüttler Duomax 1030 Swip SM 25 DIGI Shaker Bath SBS 30	Heidolph, Kelheim Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg Stuart Scientific, Staffordshire, UK
<i>Semi-dry</i> Blotapparatur	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Sequenzierer ABI 373 A	Perkin Elmer, Weiterstadt
Stratalinker™	Stratagene, Heidelberg
Tankblot Apparatur	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät Typ UW 60	Bandelin, Berlin
UV Transilluminator Hoefer, Macro Vue UV 20	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Vortexer Janke & Kunkel VF2	IKA Labortechnik, Wilmington, USA
Waagen Scaltel SBA 52 Melter Toledo AG 245	Scaltec, Heiligenstadt M. Toledo, Schwarzenbach, Schweiz
Zentrifugen Beckman Optima™ TLX Ultrazentrifuge Beckman TLK-100 Heraeus Biofuge 28 RS Heraeus Biofuge 15 Heraeus Biofuge <i>pico</i> Heraeus Megafuge 1.0 Sorvall RC 5C Plus (Dupont)	Beckman, München Beckman, München Heraeus, Berlin Heraeus, Berlin Heraeus, Berlin Heraeus, Berlin Sorvall, Bad Homburg

2.1.7 Computeranalysen und Software

Homologiesuche mit DNA- und Peptidsequenzen, DNA-Sequenzdatenbanken	<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i> , http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast <i>Human Genome Center, Baylor College of Medicine (BCM Search Launcher)</i> , http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/ <i>European Molecular Biology Laboratory (EMBL)</i> , http://www.embl.de <i>The Institute for Genomic Research (TIGR)</i> , http://www.tigr.org/
Berechnung physikochemischer Parameter und Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen	<i>ExpASy/Proteomics tools</i> , http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam
Erstellung und Überprüfung von Primern für PCR	<i>BCM Search Launcher</i> , http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/ <i>Williamstone Enterprises</i> , http://www.williamstone.com/primers/calculator/calculator.cgi

2.1.8 Bakterienstämme, cDNA-Bibliothek und eukaryontische Zelllinien

2.1.8.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21	Novogene, Bad Soden
<i>E. coli</i> DH10β	Life Technologies, Karlsruhe
<i>E. coli</i> SOLR	Stratagene, Heidelberg
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Stratagene, Heidelberg

2.1.8.2 cDNA-Bibliothek und Bakteriophage

Bezeichnung	Herkunft
Uni-ZAP [®] XR <i>rat kidney cDNA-library</i> und f1 Helferphage (ExAssistant [™])	Uni-ZAP [®] XR Library, Stratagene, Heidelberg

2.1.8.3 Eukaryontische Zellen und Zelllinien

Alle permanenten Zelllinien wurden von ATTC, USA bezogen.

Bezeichnung	Merkmale
COS.M6	Affennierenzellen (<i>african green monkey kidney cells</i>)
HEK293	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
IMCD-Primärkultur	Primärkultur von Sammelrohrzellen aus der inneren Medulla der Rattenniere (<i>inner medullary collecting duct cells</i>), Maric et al. 1998
MCF-7	humane epitheliale Brustdrüsenkrebszellen
ZR-75-1	humane epitheliale Brustdrüsenkrebszellen

2.1.9 Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

2.1.9.1 Vektoren

Vektor	Resistenz	Bezugsquelle
pBluescript [®] SK(+/-)	amp ^R	Stratagene, Heidelberg
pGEX-4T-3	amp ^R	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.9.2 Rekombinante Plasmide

Die im Verlauf dieser Arbeit klonierten Deletionsmutanten des *inserts* von Klon 2.1 (rHt31, der Klon 2.1 wurde bei einem Expressions-*Screening* einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek isoliert) und des humanen *breast cancer nuclear receptor-binding auxillary protein*, hBrx (Rubino et al. 1998) sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die erste Spalte bezieht sich auf die Nukleotidsequenz, die letzte Spalte auf die Aminosäuresequenz der beiden Proteine. Weiterhin ist der beim Expressions-*Screening* einer Rattennieren-cDNA-Bibliothek isolierte Klon 3.1 aufgeführt.

Rekombinante Plasmide	Vektor	Insert
pBluesc.2.1 (1-1747)	pBluescript SK(+/-)	2.1 (1-582)
pGEX.rHt31(2-193)	pGEX-4T-3	rHt31 (1-64)
pGEX.rHt31(2-241)	pGEX-4T-3	rHt31 (1-80)
pGEX.rHt31(2-941)	pGEX-4T-3	rHt31 (1-313)
pGEX.rHt31(194-941)	pGEX-4T-3	rHt31 (65-313)
pGEX.rHt31(239-941)	pGEX-4T-3	rHt31 (80-313)
pGEX.rHt31(842-1729)	pGEX-4T-3	rHt31 (281-576)
pGEX.rHt31(842-1354)	pGEX-4T-3	rHt31 (281-451)
pGEX.rHt31(842-1411)	pGEX-4T-3	rHt31 (281-470)
pGEX.rHt31(1409-1747)	pGEX-4T-3	rHt31 (470-582)
pGEX.hBrx(1-228)	pGEX-4T-3	hBrx (1-76)
pGEX.hBrx(1-258)	pGEX-4T-3	hBrx (1-86)
pGEX.hBrx(250-1134)	pGEX-4T-3	hBrx (84-378)
pBluesc.3.1(1-5123)	pBluescript SK(+/-)	3.1 ¹⁾

¹⁾ Der Klon 3.1 besitzt keinen durchgehenden Leserahmen.

2.1.9.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Berlin und Metabion GmbH, Martinsried synthetisiert. Die Positionsangabe der Oligonukleotide bezieht sich auf die Nukleotidsequenz der *inserts* von Klon 2.1 und 3.1 bzw. des Vektors pBluescript. Die Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

2.1.9.3.1 Sequenzierungsprimer für Klon 2.1

Für die Sequenzierung der *inserts* von Klon 2.1 (rHt31 1-1747 bp) und Klon 3.1 (1-5123 bp) im Vektor pBluescript wurden 5'- und 3'-Primer verwendet.

2.1.9.3.1.1 5'-Primer (*sense*)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der cDNA-Sequenz
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	pBluescript (727-747)
Ht-T3-2	TGAAGCACGTGACTCAGGCAT	rHt31 (90-110)
Ht-T3-3	TTTTTCCTACCCGGGGAGCCCC	rHt31 (348-368)

2.1.9.3.1.2 3'-Primer (*antisense*)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der cDNA-Sequenz
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	pBluescript (689-668)
mt-ps-2	ACTGATTGTCATTAATGAGAT	rHt31 (1540-1520)
Ht-T7-2	GGGTTTCTGAGCTCGCTGGAG	rHt31 (1350-1330)
Ht-T7-3	TTCTGGACCTGTTTAACTTTG	rHt31 (950-930)
Ht-ps-4	TGAGAAGAATGTTCGATCCAGG	rHt31 (900-880)
Ht-T7-3	TTCTGGACCTGTTTAACTTTG	rHt31 (950-930)
Ht-T7-4 / Ht-ps-5	GCCTGGGTCCTGGGGCTTGC	rHt31 (600-580)
Ht-T3-2R	ATGCCTGAGTCACGTGCTTCA	rHt31 (110-90)

2.1.9.3.2 Sequenzierungsprimer für Klon 3.1

2.1.9.3.2.1 5'-Primer (*sense*)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der cDNA-Sequenz
T3-1	TAGCTGCCTGAAACTTACTC	3.1 (443-462)
T3-2	GGGGTAGGATACTTAGTAGT	3.1 (914-933)
T3-3neu	CCCTGTGTCCTGTGTGTCAG	3.1 (1158-1177)
T3-3	GACACGTACTIONACTTAATTA	3.1 (1278-1297)
T3-4	TGTTCTGAACTGTGGCCTGC	3.1 (1620-1639)
T7-6rev	GGTCTTGGCCTTAGTGGTTCAG	3.1 (2793-2814)
T7-3rev	GGATACGTATCACATACCTG	3.1 (3662-3681)
T7-2rev	ACTTGGTTGATAGCCTTGTG	3.1 (4136-4155)
T7-1rev	TTATACTCTAAATTCATAAT	3.1 (4507-4526)
T7-1rev2	ACACTCCAAAGGCCTTCCTGGG	3.1 (4656-4677)
T7 reverse	GGCGTGCTCCAGAGAGAGTC	3.1 (4947-4966)

2.1.9.3.2.2 3'-Primer (*antisense*)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der cDNA-Sequenz
T7-1	TCTGCATTCTGAAAAGACA	3.1 (4901-4882)
T7-2	AGTCACAATTATGAATTTAG	3.1 (4533-4514)
T7-3	CACAAGGCTATCAACCAAGT	3.1 (4155-4136)

T7-3mitte	CCAGGTATTTGACCCTGGAGG	3.1 (3814-3794)
T7-4	AACTGGACATCCAGCATGTA	3.1 (3709-3690)
T7-5	CACCAGAGCACGGTGTGGAT	3.1 (3380-3361)
T7-6	TTTACAGATACAAGACAGTG	3.1 (3053-3034)
T7-7	CAGACTGCAGTGAATGGGGGAAG	3.1 (2701-2679)
T7-8	CCCTGAATCCATGTTCTGAGC	3.1 (2349-2328)
T3-2rev	TAAGTAGTACGTGTCTTTAA	3.1 (1292-1273)
T3-1rev	ATATCACTAATTGCAGTGCT	3.1 (840-821)
T3 reverse	AGTAAACAACAAAGTGAGTCC	3.1 (373-354)

2.1.9.3.3 Primer mit Schnittstellen für die Klonierung von DNA-Fragmenten in den Vektor pGEX-4T-3

Für die Umklonierung von DNA-Fragmenten des *inserts* von Klon 2.1 (rHt31) aus dem Vektor pBluescript bzw. für die Klonierung von DNA-Fragmenten von hBrx in den Vektor pGEX-4T-3 wurden mittels PCR Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt. Es wurden 5'-Primer mit einer *EcoRI*-Schnittstelle und 3'-Primer mit einer *XhoI*-Schnittstelle am 5'-Ende verwendet. Die Positionsangaben beziehen sich auf die Nukleotidsequenz des *inserts* von Klon 2.1 (rHt31 1-1747 bp) bzw. auf die publizierte cDNA-Sequenz von hBrx in der Datenbank.

2.1.9.3.3.1 5'-Primer mit *EcoRI*-Schnittstelle

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der cDNA-Sequenz
1Fo.Ht31anf	GGAAGAATTCGGCACGAGAAACAACGCAG	rHt31 (2-19)
2Fo.Ht31vo.R2	GGAAGAATTCCTCCATAGAGGAGACCGCCA	rHt31 (194-212)
3Fo.Ht31na.R2	GGGAGGAATTCGCAGATCAAGGCCTCCAACA	rHt31 (239-257)
8Fo.Ht31mitRho	GGAAGAATTCACAAACAGGATCCAGTTCT	rHt31 (842-859)
Ht31-40forw	GGGCCGAATTCCTCCGACCAGAGACAGCACC	rHt31 (1409-1427)
Ht31-60forw	GGGCCGAATTCCTTCAGTGGTGAGGAGCAGA	rHt31 (1452-1470)
Bxzn.fo.1	GGGCCGAATTCATGTTGTATATAAACCGAG	hBrx (1-19)
Bx.301fo	GGGCCGAATTCATCACCGGATCCAGTTCATC	hBrx (250-269)

2.1.9.3.3.2 3'-Primer mit *Xho*I-Schnittstelle

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der cDNA-Sequenz
4Re.Ht31ende	AAACCCCTCGAGGCTCTTCTTGCTGCTG GACATTTT	rHt31 (1729-1706)
5Re.Ht31oh.R2	AAACCCCTCGAGGGAGTCTGCTCCAGG AGGCCATC	rHt31 (196-173)
6Re.Ht31	AAAGGGCTCGAGCTGCTTGATGACGGC CTCCACGAT	rHt31 (241-218)
Ht31-20rev	CCCGCTCGAGCTGAAAGGGTTTCTGAG CTCGCTGGAG	rHt31 (1354-1330)
Ht31-30rev	CCCGCTCGAGTCCGGTTCCAGGTGTTCT TCTGAAAGCG	rHt31 (1411-1386)
Ht31-50rev.ende	GAATTGGGTACCGGGCCCCCCTCGAG	pBluescript (667-641)
Bxzn.rev.1	CCCGCTCGAGTCCTCTGGCTTTGGGAA GATG	hBrx (228-210)
Bxzn.rev.2	CCCGCTCGAGTCTCCGGTGATATCACA GGCC	hBrx (258-240)

2.1.9.3.4 Primer für die hBrx-cDNA-Synthese aus ZR-75-Zellen

Neben dem Primer für die cDNA-Synthese von hBrx aus ZR-75-1-Zellen sind in der Tabelle zwei Primer aufgeführt (Bx.neu596fo und Bx.neu613rev), die nach einer neuen, von der in der Datenbank publizierten cDNA-Sequenz von Brx abweichenden Sequenz gelegt wurden (s. 3.6.1).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der cDNA-Sequenz
RT-PCRrev.2	AAATATTGGGGTGGTAGCGGTTT	hBrx (1518-1496)
Bx.neu596fo	ATGAGCTGGTGCCCCTCT	hBrx (595-612)
Bx.neu613rev	AGAGGGGCACCAGCTCAT	hBrx (612-595)

2.1.9.3.5 Primer für die Amplifikation von hHt31 aus der Marathon™ cDNA (5'- und 3'-RACE)

Die Auswahl der Primer erfolgte nach der Sequenz der konstruierten hypothetischen cDNA von hHt31 (vgl. 3.11.1). Die Sequenz ist im Anhang aufgeführt.

2.1.9.3.5.1 5'-RACE-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der hypoth. cDNA-Sequenz von
A1 5'-Race (<i>forward</i>)	GGTTCCACCTCCGTCACTGTAC	1-30
GSP1 hHt31 (<i>reverse</i>)	TGATTCACTGCCTGGACTGTTTGCC	2275-2251

2.1.9.3.5.2 3'-RACE-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der hypoth. cDNA von hHt31
3 ⁺ THCbfo1	GTACTCCTGAGGAAGCCACGGGGAGC	3828-3853
3 ⁺ THCbrev1	CGGTTTCATCCACCAGGAGGACTGC	5543-5519
3 ⁺ Ra.ende.rev2	TGCCTCAGCAGAGAGGAAGAGGGTCA	8330-8355

2.1.9.3.6 Sequenzierungsprimer für die 5'- und 3'-RACE-Produkte (hHt31)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Position in der hypoth. cDNA von hHt31
Kl.7Seq.3 ⁺ Ra1fo1	GTGATGACATGGACAGCATC	4233-4252
Kl.7Seq.3 ⁺ Ra1rev2	GATGCTGTCCATGTCATCAC	4252-4233
3 ⁺ Ra1fo3HCb	CCATGGGATGGGAGCTGAGGGTCGAG	4429-4454
3 ⁺ Ra1rev3HCb	CTCGACCCTCAGCTCCCATCCCATGG	4454-4429
3 ⁺ Ra1fo4HCb	CTCTGCAAATGCCGAAGAGCTCAGAC	4759-4784
3 ⁺ Ra1rev4HCb	GTCTGAGCTCTTCGGCATTTCAGAG	4784-4759
3 ⁺ RaSeq.1	CCTGCCACATAGCCCCTCC	5071-5089
3 ⁺ Ra1fo5	GTCAGTCGTACATTCAGCTACATC	5123-5146
3 ⁺ Ra1rev5	GATGTAGCTGAATGTACGACTGAC	5146-5123
3 ⁺ RaSeq.2	CAGCAAGGTCAATGAGTC	5698-5715
3 ⁺ RaSeq.3	GCTGATCAGTATCCATAGCC	6022-6041
3 ⁺ RaSeq.4	GCACAGTCCTTGAGCCTGG	6413-6441
3 ⁺ RaSeq.5	GTGAGAGAAGTGGCACATGAG	6752-6772
3 ⁺ Ra3fo1	CTCTCCAGAGGATTGCTCCCCAACA	7065-7090
3 ⁺ Ra2rev2	GTGCCTCCAGATTTCCACTCACAA	7215-7190
3 ⁺ RaSeq.6	CGCAGCTTGTCCTCCGCCCCG	7568-7585
3 ⁺ RaSeq.7	GCCGGGAGGCAGAGCGGC	7896-7913
3 ⁺ Ra.ende.rev3	CACCCTCTGCTGATACTTCTGACGC	8315-8291

2.1.10 Flüssigmedien und Agarplatten für *E. coli*

Sofern nichts anderes vermerkt ist, werden sowohl die Flüssigmedien als auch die Medien mit Agarzusatz bei 120 °C 15 min autoklaviert. Für das Gießen der Agarplatten werden pro Petrischale (Ø 100 mm) ca. 25 ml des auf 55 °C abgekühlten flüssigen Agars benötigt.

Luria Bertani (LB)-Medium	Pepton Hefeextrakt NaCl H ₂ O	10 g 5 g 5 g ad 1 l	pH 7,0
LB-Agarplatten	wie LB-Medium; vor dem Autoklavieren werden jedoch 12,5 g Agar hinzugefügt		
LB-Top Agar	wie LB-Medium; vor dem Autoklavieren werden 7 g Agarose hinzugefügt		

2.1.11 Antibiotika und andere Medienzusätze

Allen Agarplatten und Flüssigmedien wurden bei Bedarf nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55 °C Antibiotika und andere hitzeempfindliche Komponenten zugesetzt.

Medienzusatz	Konzentration in		
	Stammlösung	Flüssigmedium	Agarplatten
Ampicillin	100 mg/ml H ₂ O	100 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml H ₂ O	30 µg/ml	30 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml Ethanol	10 µg/ml	10 µg/ml
IPTG	100 mM	1 mM	0,1 mM
X-Gal	40 mg/ml DMFA	–	40 µg/ml

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation von *E. coli*

2.2.1.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Reagenzien

LB-Medium (s. 2.1.10), 100 mM CaCl₂, Glycerin

Durchführung

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli*-Stammes angeimpft und in einem Erlenmeyerkolben solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine Absorption bei 600 nm von 0,5 erreicht ist. Die Suspension wird zentrifugiert (7000 x g, 10 min, 4 °C, Heraeus Biofuge 28 RS) und der Überstand verworfen. Die Zellen werden in 100 mM CaCl₂ (eiskalt) resuspendiert und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden anschließend erneut zentrifugiert (1500 x g, 15 min, 4 °C, Heraeus Biofuge 28 RS) und das Sediment in 1,6 ml 100 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach Zugabe von 400 µl Glycerin wird die Suspension aliquotiert (100 µl Aliquots). Die kompetenten Zellen können direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -70 °C bis zu 6 Monaten gelagert werden.

2.2.1.1.2 Transformation von *E. coli*

Reagenzien

LB-Medium (s. 2.1.10)

Durchführung

50 µl kompetente Zellen (s. 2.2.1.1.1) werden in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 0,1-1 µg Plasmid-DNA versetzt und mindestens 30 min auf Eis gestellt. Anschließend

wird der Transformationsansatz in einem Wasserbad 2½ min bei 42 °C inkubiert. Nach diesem Hitzeschock wird der Ansatz 5 min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für 60 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden zentrifugiert (8000 rpm, 2 min, RT, Heraeus Biofuge *pico*) und der Überstand bis auf einen Rest (ca. 200 µl) verworfen. Die Zellen werden erneut resuspendiert und jeweils 1/10 (20 µl) und 9/10 (180 µl) auf selektive Agarplatten ausplattiert. Die Platten inkubieren ü. N. bei 37 °C.

2.2.1.2 Nukleinsäure-Isolierungsmethoden

2.2.1.2.1 Plasmidisolierung aus *E. coli* im kleinen Maßstab

Reagenzien

Lösung I	Tris-HCl (pH 8,0) Glucose EDTA	25 mM 50 mM 10 mM
Lösung II	SDS NaOH	1 % (w/v) 200 mM
Lösung III	Kaliumacetat Essigsäure (99 %) H ₂ O	3 M 11,5 % (v/v) ad 100 ml
TE-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0) EDTA	10 mM 10 mM
abs. Ethanol		
Ethanol 70 %		

Durchführung

Die Übernachtbakterienkultur (1,5 ml) wird in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (12000 rpm, 3 min, RT, Heraeus Biofuge *pico* (Tischzentrifuge)). Die Zellen werden in 100 µl Lösung I resuspendiert und 2 min bei RT inkubiert. Danach werden 200 µl einer frisch angesetzten Lösung II dazugegeben und nach Mischen durch Invertieren inkubiert der Ansatz für 5 min in einem Eisbad. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wird das Lysat für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird

zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, Tischzentrifuge) und der die DNA-enthaltende klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wird durch Zugabe von 1 ml Ethanol (abs.) und 30 min Inkubation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt und danach zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, Tischzentrifuge). Anschließend wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das DNA-Sediment wird bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Heizblock getrocknet und anschließend in 50 μl TE-Puffer gelöst. Von der isolierten Plasmid-DNA werden zur Kontrolle 10 μl , gegebenenfalls nach Restriktionsverdau, in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

2.2.1.2.2 Plasmidisolierung aus *E. coli* mit dem *QIAGEN Midi PREP Kit*

Mit dieser Methode kann man je nach Plasmid aus einer 100 ml Bakterienkultur bis zu 100 μg Plasmid-DNA isolieren.

Reagenzien

Puffer P1 (Zellresuspendierung)	Tris-HCl (pH 8,0) EDTA RNase A	50 mM 10 mM 100 $\mu\text{g/ml}$
Puffer P2 (Zellyse)	NaOH SDS	200 mM 1 % (w/v)
Puffer P3 (Neutralisation)	Kaliumacetat (pH 5,5)	3 M
Puffer QBT (Säulenäquilibrierung)	NaCl MOPS (pH 7,0) Isopropanol Triton X-100 [®]	750 mM 50 mM 15 % (v/v) 0,15% (v/v)
Puffer QC (Säulenwaschung)	NaCl MOPS (pH 7,0) Isopropanol	1 M 50 mM 15 % (v/v)
Puffer QF (DNA Elution)	NaCl Tris-HCl (pH 8,5) Isopropanol	1,25 M 50 mM 15 % (v/v)

Alle Reagenzien sind im *QIAGEN Midi PREP Kit* enthalten. Vor der ersten Benutzung des Kits wird die mitgelieferte lyophilisierte RNase A in Puffer P1 gelöst. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen in der Heraeus Biofuge 28 RS.

Durchführung

100 ml einer Übernachtsbakterienkultur werden abzenrifugiert (6000 x g, 15 min, 4 °C). Das Zellsediment wird in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 wird die Suspension durch vorsichtiges Schwenken gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 4 ml eiskalter Puffer P3 zugegeben, die Lösung sofort durch Invertieren gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden Proteine und Zelltrümmer abzentrifugiert (20000 x g, 30 min, 4 °C). Der Überstand wird auf eine zuvor mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte *QIAGEN*-Säule gegeben. Die Säule mit der gebundenen DNA wird zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und anschließend die DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wird mit 0,7 Volumen (3,5 ml) Isopropanol für 5 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (15000 x g, 30 min, 4 °C). Das DNA-Sediment wird zweimal mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15000 x g, 20 min, 4 °C). Nach der letzten Zentrifugation wird das Sediment bei 37 °C im Brutschrank getrocknet und anschließend in 150 µl TE-Puffer, pH 8,0 (s. 2.2.1.3.1) resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgt wie in Punkt 2.2.1.3.2.

2.2.1.2.3 Plasmidisolierung aus *E. coli* mit den *QIAPREP*TM *Minipreps* für Bioroboter 9600 (*QIAGEN*)

Mit dieser Methode lassen sich bis zu 96 Ansätze gleichzeitig bearbeiten. Aus einer 3 ml Übernachtsbakterienkultur kann man 1-5 µg Plasmid-DNA isolieren.

Reagenzien

siehe 2.2.1.2.2

Durchführung

Die Plasmidisolierung erfolgt semi-automatisch mit dem Bioroboter 9600. Die Übernachtsbakterienkulturen (3 ml) werden in Zentrifugenröhrchen des Herstellers überführt und zentrifugiert (4000 rpm, 10 min, RT, Heraeus Biofuge 15). Nach vollständiger Ent-

fernung des Überstandes werden die Röhren in den dafür vorgesehenen Ständer im Roboter plaziert und das Programm wird gestartet.

2.2.1.3 Spezifische DNA-Spaltung durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Reagenzien

5 x Probenpuffer	Bromphenolblau EDTA (pH 8,0) Glyzerin	0,2 % (w/v) 1 mM 50 % (v/v)
10 x Reaktionspuffer		
Restriktionsendonuklease		3-5 Einheiten

Durchführung

Es werden die mit den Restriktionsenzymen gelieferten Puffer verwendet und die Spaltung wird unter den vom Hersteller geforderten Bedingungen durchgeführt. Zu der gelösten DNA werden die erforderliche Menge Restriktionsendonuklease und der entsprechende 10 x Reaktionspuffer pipettiert. Das gewünschte Endvolumen wird durch Zugabe von Aqua tridest. erreicht. Die Reaktion wird nach 1 h Inkubation bei 37 °C im Heizblock durch Zugabe von 1/5 Volumen 5 x Probenpuffer abgebrochen. Der Ansatz wird anschließend auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen (s. 2.2.1.4).

2.2.1.4 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Reagenzien

20 x TAE-Puffer	Tris Essigsäure EDTA H ₂ O	484,4 g 114 ml 372 g ad 5 l pH 7,8
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	10 µg/ml in A. tridest.

Durchführung

Je nach Größe der zu trennenden DNA/RNA-Fragmente wählt man unterschiedliche Agarosekonzentrationen in den Gelen (0,8-3 % (w/v)). Für ein 1%iges Gel werden 1,35 g Agarose in 135 ml 1 x TAE-Puffer suspendiert und durch Kochen im Mikrowellenherd in Lösung gebracht. Die Lösung wird nach Zugabe von Ethidiumbromid (1,5 µg/ml) in eine horizontale Gelgießvorrichtung gegossen. Das erstarrte Gel wird in die mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und anschließend werden die mit Probenpuffer (s. 2.2.1.5) versetzten Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wird bei 80-120 V (4 V/cm Gellänge) für 45-60 min durchgeführt. Die Auswertung erfolgt unter dem Transilluminator bzw. am *Lumi Imager F1*.

2.2.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

2.2.1.5.1 Isolierung von DNA-Fragmenten mit dem *GeneClean-Kit II* (Dianova)

Die Reinigung von mindestens 250 bp langen DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen wird mit Hilfe des *GeneClean-Kit II* (Dianova) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen in der Heraeus Biofuge *pico* (Tischzentrifuge).

Reagenzien

3 M NaI-Lösung, Glasmilch-Suspension und *New-Wash*-Puffer sind im Kit enthalten, außerdem wird TE-Puffer pH 8,0 (s. 2.2.1.3.1) benötigt.

Durchführung

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA in einem TAE-Agarosegel wird die DNA-Bande auf dem UV-Transilluminator aus dem TAE-Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das Agarosestück wird im Gefäß gewogen und 3 Volumina (µl ~ mg) NaI-Lösung zugegeben. Die Agarose wird bei 50 °C im Heizblock unter Schütteln geschmolzen (ca. 10 min) und zu je 5 µg DNA

werden 5 µl Glasmilch gegeben. Nach 5 min Inkubation bei RT wird die Suspension kurz zentrifugiert (12000 rpm, 30 sec, RT) und das Glasmilchsediment mit 500 µl eiskaltem *New Wash*-Puffer gewaschen und bei 12000 rpm kurz zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschen wird der Überstand vollständig entfernt und das Glasmilchsediment 10 min bei RT getrocknet (Deckel offen lassen).

Die DNA wird durch Zugabe von 5 µl TE-Puffer von der Glasmilch eluiert. Dazu wird das Glasmilchsediment durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (12000 rpm, 15 sec, RT). Der Überstand, der die DNA enthält, wird abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die Elution wird ein zweites Mal durchgeführt. Die Eluate werden anschließend vereinigt. Zur Beurteilung der Qualität wird mit 10 % der eluierten DNA eine TAE-Agarosegelelektrophorese durchgeführt (s. 2.2.1.4).

2.2.1.5.2 Isolierung von DNA-Fragmenten mit dem *QIAEX II Kit* (Qiagen)

Die Gelelution von DNA-Fragmenten kürzer als 250 bp wird mit dem *QIAEX II Kit* nach dem Protokoll des Herstellers und den mitgelieferten Reagenzien durchgeführt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen in der Heraeus Biofuge *pico* (Tischzentrifuge).

Durchführung

Das Ausschneiden der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgt wie unter 2.2.1.5.1 angegeben. Das Agarosestück wird gewogen, 3 Volumina (µl ~ mg) Puffer QX 1 und 10 µl QIAEX II-Suspension zugegeben. Die Agarose wird anschließend durch 10 min Inkubation bei 50 °C im Wasserbad unter Schütteln geschmolzen. Die Probe wird zentrifugiert (12000 rpm, 30 sec, RT), das Sediment mit 500 µl Puffer QX 1 gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wird das Sediment zweimal mit 500 µl Puffer PE gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand vollständig entfernt und das Sediment 10-15 min an der Luft getrocknet.

Zur Elution der DNA wird das Sediment in 20 µl TE-Puffer, pH 8,0 oder Aqua tridest. resuspendiert, 5-10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (12000 rpm, 30 sec, RT). Der Überstand, der die DNA enthält, wird abgenommen und in ein neues

Gefäß überführt. Die Elution wird wiederholt und beide Eluate werden vereinigt. Zur Beurteilung der Qualität der DNA wird mit 10 % der eluierten DNA eine TAE-Agarosegelelektrophorese durchgeführt (s. 2.2.1.4).

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Reagenzien

10 x Ligationspuffer	Tris-HCl (pH 7,5) MgCl ₂ dATP DTT BSA	500 mM 100 mM 10 mM 100 mM 25 µg/ml
T4 DNA-Ligase		1 Einheit/µl

Durchführung

Es wird ein molares Vektor-*insert*-Verhältnis von 1:2 bis 1:3 gewählt. In ein Eppendorfreaktionsgefäß werden die zu ligierenden, durch Restriktionsendonukleasen gespaltenen DNA-Fragmente, eine entsprechende Menge 10 x Ligationspuffer (im Ansatz einfach konzentriert) sowie 1 µl T4 DNA-Ligase pipettiert. Anschließend wird mit Aqua tridest. auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz inkubiert 12-16 Stunden bei 16 °C im PCR-Gerät. Anschließend können kompetente *E. coli*-Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert werden (s. 2.2.1.1.2).

2.2.1.7 PCR-Amplifizierung von cDNA-Fragmenten

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) ist es möglich, spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Hierbei wird die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) eingesetzt, da sie ihre Aktivität auch nach Erhitzen auf 95 °C beibehält. Für eine optimale Hybridisierung sollten die Primer (*sense* und *antisense*) eine Sequenzlänge von 16-35 bp und am 5'- und 3'-Ende ein Guanin oder Cytosin aufweisen.

Reagenzien

cDNA-Matrize		50 ng/μl
10 x PCR-Puffer	Tris-HCl (pH 8,4) KCl MgCl ₂	25 mM 125 mM 1,9 mM
dNTP Mix	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	10 mM
5'-Primer		10 mM
3'-Primer		10 mM
Taq-DNA-Polymerase		5 Einheiten/μl

Durchführung

Zu der zu amplifizierenden cDNA (50 ng in Aqua tridest. oder TE-Puffer gelöst) werden auf Eis 1 μl dNTP's, je 1 μl 5'- und 3'-Primer, 5 μl 10 x PCR-Puffer und 0,125 μl Taq-DNA-Polymerase gegeben und mit Aqua tridest. auf ein Endvolumen von 50 μl aufgefüllt. Der Ansatz wird sofort bei 95 °C in ein PCR-Gerät gestellt und die Amplifikation entsprechend folgendem Programm durchgeführt:

95 °C, 5 min

25-30 Zyklen: 95 °C, 45 sec

55 °C, 45 sec

72 °C, 90 sec

72 °C, 4 min

Zur Kontrolle der PCR-Bedingungen und zum Ausschluß von Verunreinigungen wird immer eine Positiv- und eine Negativprobe (ohne cDNA im Ansatz) mitamplifiziert. Diese werden wie das PCR-Amplifikat auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen (10 μl PCR-Reaktionslösung + 2 μl 5 x Probenpuffer (vgl. 2.2.1.4)).

2.2.1.8 5'- und 3'-RACE mit dem *Marathon-Ready*TM cDNA-Kit (Clontech)

Bei den *Marathon-Ready*TM cDNAs handelt es sich um vorbereitete „Bibliotheken“ von Adaptor-ligierten cDNAs, die als Matrize für die Marathon cDNA-Amplifikation (5'- und 3'-RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)) eingesetzt werden. Als Polymerase wird der Advantage[®] 2 Polymerase-Mix (Clontech) verwendet. Die Reagenzien sind in den Kits enthalten. Die Durchführung erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers. Bei der Auswahl der genspezifischen Primer (GSP) sollte darauf geachtet werden, daß diese eine Schmelztemperatur (T_m) größer 70 °C aufweisen.

Durchführung

Der RACE-Ansatz wird wie folgt auf Eis pipettiert:

Marathon-Ready cDNA	5 µl
10 x cDNA PCR-Puffer	5 µl
dNTP Mix (10 mM)	1 µl
GSP1 (5'-Primer, 10 mM)	1 µl
GSP2 (3'-Primer, 10 mM)	1 µl
50 x Advantage [®] 2 Polymerase Mix	1 µl
H ₂ O	36 µl

Anschließend wird die Probe in das PCR-Gerät gestellt und folgendes Programm gewählt:

94 °C, 1 min
 5 Zyklen: 94 °C, 30 sec
 72 °C, 5 min¹
 25 Zyklen: 94 °C, 30 sec
 68 °C, 5 min¹
 68 °C, 10 min

¹ Die optimale Elongationszeit ist von der Länge des erwarteten Amplifikates abhängig (1 min pro kb).

Zur Kontrolle der RACE-Bedingungen und zum Ausschluß von Verunreinigungen wird immer eine Negativprobe (ohne Marathon-cDNA im Ansatz) mitamplifiziert. Diese wird wie das RACE-Amplifikat auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen (10 µl RACE-Reaktionslösung + 2 µl 5 x Probenpuffer (vgl. 2.2.1.4)).

2.2.1.9 DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode (Sanger et al. 1977)

Die Sequenzierung der DNA wird mit dem *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Reagenzien

Ready Reaction Mix, Sequenzierungsprimer (4 µM), 25 mM EDTA, Formamid (deion.), 3,3 M NaAc (ph 4,6), abs. Ethanol, Ethanol 70 %

Durchführung

Der Sequenzierungsansatz wird wie folgt auf Eis pipettiert:

Ready Reaction Mix	2 µl
DNA (500 ng/µl)	1 µl
Sequenzierungsprimer (4 µM)	1 µl
H ₂ O	6 µl

Anschließend wird die Probe in das PCR-Gerät gestellt und folgendes Programm gewählt:

Denaturierung	96 °C, 16 sec
Hybridisierung	52 °C, 16 sec
Polymerisierung	60 °C, 4 min

Das Programm durchläuft 26 Zyklen. Danach wird der Reaktionsansatz durch Ethanol-fällung gereinigt. Zu 10 µl Reaktionsansatz werden folgende Komponenten gegeben:

3,3 M NaAc (pH 4,6)	4 µl
H ₂ O	26 µl
Ethanol z. A.	110 µl

Der Ansatz wird durch Schütteln und Invertieren gut gemischt und bei 3500 rpm 15 min zentrifugiert (Heraeus Biofuge *pico*). Das Sediment wird mit 70 %igem Ethanol gewaschen (200 µl), erneut zentrifugiert und bei 37 °C getrocknet.

Die Sequenzierprobe wird mit 4,5 µl 50 mM EDTA (pH 8,0)/deion. Formamid (im Verhältnis 1:50) resuspendiert, 2 min bei 90 °C denaturiert und auf das Sequenziergel aufgetragen. Der Gellauf erfolgt im automatischen Sequenzierer ABI 373 A (Perkin Elmer) bei 40 W (1200-1500 V).

2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus ZR-75-1-Zellen erfolgt mit dem *peqGOLD RNAPure™ Kit* nach den Vorgaben und mit den Reagenzien des Herstellers.

Reagenzien

peqGOLD RNA Pure™-Lösung, Chloroform, Isopropanol, Ethanol, Depc-Wasser

Durchführung

Es werden zwei Zellkulturschalen (60 mm Durchmesser) mit konfluent gewachsenen Zellen verwendet. Alle Arbeiten werden RNase-frei durchgeführt.

Die Zellen werden direkt in der Zellkulturschale durch Zugabe von 2,5 ml *peqGOLD RNA-Pure™* pro Ø 60 mm Schale und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert. Die Zellysate werden in 1,25 ml Aliquots in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße verteilt und, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe von den Proteinen zu gewährleisten, 5 min bei RT stehengelassen. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform werden die Proben 15 sec stark geschüttelt (Vortexer) und 5 min stehengelassen. Eine anschließende Zentrifugation (12000 x g, 5 min, RT, Sorvall RC5C Zentrifuge) führt zur Trennung der Proben in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine

Interphase und eine obere farblose wäßrige Phase. Die RNA ist in der wäßrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Phenol- bzw. Interphase befinden. Die wäßrige Phase nimmt ca. 60 % des Probenvolumen ein.

Die wäßrige Phase wird in ein frisches 2 ml Gefäß überführt. Die Präzipitation der RNA erfolgt durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem ml *peqGOLD RNAPure*[™] für 5-15 min bei RT. Anschließend wird sie sedimentiert (12000 x g, 10 min, 4 °C, Sorvall RC5C Zentrifuge). Der Isopropanolüberstand wird vorsichtig abgezogen und das Sediment zweimal mit 1 ml 75 %igem Ethanol durch starkes Schütteln (Vortexer) und anschließende Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4 °C, Sorvall RC5C Zentrifuge) gewaschen. Das RNA-Sediment wird kurz an der Luft getrocknet (10-15 min, zu langes Trocknen verschlechtert die Löslichkeit der RNA) und in 50 µl Depc-Wasser resuspendiert. Durch fotometerische Messung wird die Konzentration der RNA bestimmt.

Zur Überprüfung der Qualität der isolierten Gesamt-RNA wird diese in einem 1 %igen TAE-Agarosegel (s. 2.2.1.4) aufgetrennt. Als Probenpuffer wird der 6 x Probenpuffer III (0,25 % Bromphenolblau, 40 % (w/v) Saccharose in Aqua tridest.) nach Sambrook et al. (1989) eingesetzt. Die Gelelektrophorese wird mit 3-4 Volt/cm Gellänge für 45-60 min durchgeführt. Die Auswertung erfolgt am *Lumi-Imager F1*. Wenn die Stärke der 18S-RNA Bande ein Drittel der Stärke der 28S-RNA Bande beträgt, ist die isolierte RNA von guter Qualität. Sie kann anschließend im Northern Blot oder nach DNase-Verdau für die cDNA-Synthese eingesetzt werden (s. 2.2.3).

2.2.3 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

2.2.3.1 DNase-Verdau

Zum Ausschluß von genomischer DNA-Kontamination wird vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau mit dem Deoxyribonuclease I, *Amplification Grade Kit*, Life Technologies nach dem Protokoll des Herstellers mit den gelieferten Reagenzien durchgeführt.

Durchführung

Die Komponenten werden wie folgt pipettiert:

Gesamt-RNA	1 µg
10 x DNase I Reaktionspuffer	1 µl
DNase I	1 µl
Depc-H ₂ O	7 µl

Bei größeren Mengen RNA wird die Menge der angegebenen Komponenten und das Reaktionsvolumen linear erhöht. Der Ansatz inkubiert 15 min bei RT. Anschließend wird die DNase I durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA und 10 min Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Die Probe wird sofort für die cDNA-Synthese verwendet (s. 2.2.3.2).

2.2.3.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wird mit dem SUPERSCRIPT™ *Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis* (Life Technologies) durchgeführt.

Reagenzien

Alle Reagenzien sind außer den GSP (genspezifische Primer) im Kit enthalten.

Durchführung

Zur Kontrolle wird immer eine Probe ohne Superscript II RT im Ansatz mitgeführt. Folgende Komponenten werden jeweils in zwei PCR-Reaktionsgefäße pipettiert:

DNase-verdaute Gesamt-RNA	1-5 µg
GSP oder Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (10 µM)	1 µl
Depc-H ₂ O	ad 12 µl

Der Ansatz wird 10 min bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Anschließend werden folgende Komponenten in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

10 x PCR-Puffer	2 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	1 μ l
DTT (100 mM)	2 μ l

Dieser Reaktionsansatz wird zu der RNA/Primerlösung pipettiert und der gesamte Ansatz 5 min bei 42 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 μ l Superscript II *reverse Transkriptase* (200 Einheiten/ μ l) zu einem Ansatz wird die Reaktion bei 42 °C weitere 50 min fortgesetzt und anschließend durch 15 min Inkubation bei 70 °C beendet. Die Proben werden auf Eis gestellt. Die anschließende PCR-Reaktion wird wie unter 2.2.1.7 beschrieben durchgeführt, in einer Reaktion werden 2 μ l cDNA eingesetzt.

2.2.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit [α^{32} P]-dCTP

Die Markierung der DNA wird mit dem *Megaprime DNA labeling* Kit von Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

25-50 ng DNA (in 5 μ l Aqua tridest.) werden mit der vom Hersteller gelieferten Nonamer-Primer-Lösung (5 μ l) versetzt. Der Ansatz wird im Heizblock denaturiert (100 °C, 5 min) und anschließend bei Raumtemperatur belassen. Für die Markierungsreaktion wird zugesetzt:

Markierungspuffer	10 μ l
[α^{32} P]-dCTP (50 μ Ci)	2,5 μ l (6000 Ci/mmol)
Klenowenzym	2 μ l
H ₂ O	25,5 μ l

Nach 15-20 min Inkubation bei 37 °C wird dem Reaktionsansatz 25 μ l Dextranblau (20 mg/ml Lösung) zugegeben und die DNA durch Fraktionierung über eine Sephadex G50-Säule von freien Nukleotiden getrennt.

2.2.5 Abtrennung der DNA-Fragmente von freien Nukleotiden

Nicht eingebaute Nukleotide werden von Sonden durch Fraktionierung mittels Sephadex G50-Säulenchromatografie abgetrennt.

Reagenzien

Sephadex G50-Material, Natriumazid, TE-Puffer (pH 7,6 und 8,0, s. 2.2.1.2.1)

Vorbereitung des Sephadex G50-Materials

Das Sephadex G50-Material (20 g) wird ü. N. in 400 ml TE-Puffer pH 7,6 bei RT gequollen. Am nächsten Tag wird mit einer Pasteurpipette nicht abgesetztes Material entfernt. Das gequollene Material wird nach der Entgasung in 50 ml Falcon-Röhrchen aliquottiert und bei 4 °C gelagert. Zur Konservierung wird Natriumazid (Endkonzentration 0,01 %) zugesetzt.

Sephadex G50-Säulenchromatografie

Das Sephadex G50-Material wird in eine mit einer Glaskugel verschlossene Pasteurpipette (150 mm) so gegossen, daß das Säulenbett bis zur Einkerbung der Pasteurpipette reicht. Zum Setzen des Säulenbettes füllt man die Pipette mehrmals mit TE-Puffer, pH 8,0 auf. Die Säule darf dabei nicht austrocknen. Nach Abnahme eines 1 µl Aliquots für spätere Messungen (mit 9 µl Aqua tridest. auf 10 µl auffüllen) wird die Probe auf die Säule aufgetragen und nachdem sie in die Matrix eingewandert ist, mit TE-Puffer, pH 8,0 überschichtet. Bis die blaue Front die Säule durchwandert hat, wird mehrmals mit TE-Puffer, pH 8,0 nachgefüllt. Mit Beginn der Elution der blauen Front werden Fraktionen gesammelt. Bis das Säulenbett trocken ist, werden zunächst die blaue und anschließend noch weitere Fraktionen in Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen.

Zur Bestimmung der Inkorporation von radioaktiven Nukleotiden werden 7,5 µl einer 1:10 Verdünnung der Probe vor dem Auftragen auf die Säule (das entspricht 1 % der eingesetzten Radioaktivität) und jeweils 1 % der ersten und zweiten Fraktion in mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Szintillationsröhrchen pipettiert. Die Radioaktivität in cpm wird im Wallac 1409 *Liquid Scintillation Counter* bestimmt. Die Einbaurrate

wird in Prozent errechnet und die spezifische Aktivität (cpm/ μ g DNA) bestimmt. Für die Hybridisierung werden $3-4 \times 10^6$ cpm/ml (ca. $30-40 \times 10^6$ cpm pro Membran) eingesetzt.

2.2.6 *Multiple tissue Northern Blot*

In dieser Arbeit wurde eine kommerziell erhältliche Nylonmembran (*Multiple tissue Northern Blot*, Clontech, Heidelberg) mit einer rHt31-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert.

2.2.6.1 Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran

Reagenzien

Heringsperma-DNA		10 mg/ml
Formamid ²⁾		100 %
SDS		10 %
50 x Denhardt´s	Ficoll Type 400 Polyvenylpyrrolidon BSA H ₂ O	1 g 1 g 1 g ad 100 ml ¹⁾
20 x SSPE	NaCl NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O EDTA	3 M 200 mM 20 mM pH 7,4
Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung	Formamid 50 x Denhardt´s SDS 10 % Depc- H ₂ O	100 ml 40 ml 2 ml ad 200 ml ³⁾
20 x SSC	NaCl Na-Citrat Depc-H ₂ O	175,3 g 88,2 g ad 1 l pH 7,0

¹⁾ 50 x Denhardt´s-Lösung wird sterilfiltriert und bei -70 °C gelagert.

²⁾ Es wird frisches Formamid benutzt, bei dem auf eine Deionisierung verzichtet werden kann.

³⁾ Die Lösung wird in 12 ml Volumina aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Durchführung

Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Membran werden in verschließbaren Plexiglashybridisierungskammern (hauseigene Werkstatt) durchgeführt. Die Prähybridisierungslösung (0,1 ml/cm² Membran) wird auf 42 °C vorgewärmt. Die Heringssperma-DNA wird denaturiert (10 min, 100 °C), sofort auf Eis gestellt und anschließend in die vorgewärmte Prähybridisierungslösung pipettiert (Endkonzentration 100 µg/ml). Die Membran wird in die mit Prähybridisierungslösung gefüllte Hybridisierungskammer gelegt und bei 42 °C 4-24 h im Wasserbad unter Schütteln inkubiert.

Für die Hybridisierung werden Sonde (30-40 x 10⁶ cpm, s. 2.2.4) und Heringssperma-DNA (Endkonzentration 100 µg/ml) denaturiert (10 min, 100 °C), 1-5 min auf Eis gestellt und anschließend in die auf 42 °C vorgewärmte Hybridisierungslösung pipettiert. Die Prähybridisierungslösung wird gegen die Hybridisierungslösung ausgetauscht und die Hybridisierung erfolgt anschließend unter Schütteln im Wasserbad ü. N. (12-18 h).

2.2.6.2 Waschen und Exposition der Membran

Reagenzien

Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS), Waschlösung 2 (1 x SSC, 0,1 % SDS), Waschlösung 3 (0,1 x SSC, 0,1 % SDS)

Durchführung

Alle Waschlösungen werden im Wasserbad auf 50 °C vorgewärmt. Die Hybridisierungslösung wird entsorgt und die Membran in eine Plastikschiene überführt. Die Membran wird jeweils 20 min mit Waschlösung 1, 2 und 3 gewaschen. Die Ablösung der unspezifisch gebundenen Radioaktivität von der Membran wird mit dem Geigerzähler kontrolliert, eventuell muß nochmals mit Lösung 3 gewaschen werden.

Die feuchte Membran wird in Haushaltsfolie verpackt und ein *Glogos*-Marker mit der 0-cm-Marke an die Oberkante der Membran geklebt. Damit auch nach der Autoradiografie durch eventuell notwendige Waschschrirte noch unspezifisch gebundene Sonde

entfernt werden kann, darf die Membran nicht austrocknen. Die Exposition erfolgt ü. N. auf einem X-OMAT-Röntgenfilm von Kodak.

2.2.7 Entfernen einer Sonde von einer Membran

Reagenzien

Strip-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0) EDTA SDS	10 mM 1 mM 1 % (w/v)
--------------	----------------------------------	----------------------------

Durchführung

Die Sonde wird von der Membran durch zweimalige Inkubation für jeweils 20 min bei 90 °C in Strip-Puffer entfernt. Das Ergebnis wird durch eine Autoradiografie kontrolliert.

2.2.8 Screening einer Rattennieren cDNA-Bibliothek

Bei dem primären Expressions-*Screening* einer Rattennieren cDNA-Bibliothek (*Uni-ZAP[®] XR Library*, Stratagene) mit der *RII-overlay*-Methode (s. 2.2.13) wurde der Klon 2.1 isoliert. Da es sich um einen Partialklon handelt, wurde ein weiteres *Screening* zur Isolierung des vollständigen Klons mit dem *insert* von Klon 2.1 (rHt31 1-1747 bp) als Sonde durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

Arbeitsschritte

2.2.8.1 Primäres *Screening*

2.2.8.1.1 Herstellung der Bakteriensuspension

2.2.8.1.2 Bestimmung des Phagentiters durch Infektion der Bakterien

2.2.8.1.3 Herstellung der Nitrozellulosefilter (Replikafilter)

2.2.8.1.4 Herstellung der radioaktiven cDNA-Sonde

2.2.8.1.5 Hybridisierung der Nitrozellulosefilter

2.2.8.2 Sekundäres *Screening*

2.2.8.3 „*In vivo Exzision*“ der pBluescript-Phagemide aus dem Uni-ZAP XR-Vektor

2.2.8.4 Isolierung der pBluescript-Plasmide und Charakterisierung der *inserts*

2.2.8.1 Primäres *Screening*

Reagenzien

LB-Medium	s. 2.1.10		
Top Agar	s. 2.1.10		
20 x SSC	NaCl Na-Citrat Depc-H ₂ O	175,3 g 88,2 g ad 1 l	pH 7,0
20 x SSPE	NaCl NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O EDTA	3 M 200 mM 20 mM	pH 7,4
Maltoselösung ¹⁾	Maltose	200 mg/ml	
MgSO ₄ -Lösung ¹⁾	MgSO ₄	1 M	

SM-Puffer	NaCl MgSO ₄ Tris-HCl (pH 7,5) Gelatine	100 mM 8 mM 50 mM 0,01 %
Denaturierungslösung	NaCl NaOH	1,5 M 0,5 M
Neutralisationslösung	NaCl Tris-HCl (pH 7,5)	1,5 M 0,5 M

¹⁾ Die Lösung muß sterilfiltriert werden.

2.2.8.1.1 Herstellung der Bakteriensuspension

Die *E. coli* XL1-Blue MRF'-Bakterien werden auf LB-Platten, supplementiert mit Tetracyclin (10 µg/ml) ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden 5 ml LB-Medium, dem 0,2 % Maltose und 10 mM MgSO₄ zugesetzt wurden, mit einer Einzelkolonie inokuliert (Vorkultur). Für die Herstellung der Hauptkultur werden 50 µl der Vorkultur in 50 ml LB-Medium (0,2 % Maltose, 10 mM MgSO₄) überführt und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt ist optional, die Einzelkolonie kann auch direkt in die Hauptkultur überimpft werden.

Die Hauptkultur wird am nächsten Morgen abzentrifugiert (2000 x g, 10 min, Heraeus Biofuge 28 RS). Das Bakteriensediment wird in 20 ml sterilem 10 mM MgSO₄ resuspendiert und kann bei 4 °C drei Wochen gelagert werden.

2.2.8.1.2 Bestimmung des Phagentiters durch Infektion der Bakterien

Mit Hilfe von Verdünnungsreihen werden die *plaque forming units/ml* (pfu), d.h. die Anzahl der Plaques, die pro ml Phagensuspension auf einem Bakterienrasen entstehen, errechnet. Die Titerbestimmung wird für jede neue Bakteriensuspension, d.h. vor jedem *Screening* wie folgt durchgeführt: Die am vorherigen Tag gegossenen LB-Agarplatten werden 1 h bei 37 °C präinkubiert. Den Agarplatten wird so Feuchtigkeit entzogen, wodurch das spätere Ablösen der Nitrozellulosefilter erleichtert wird (s. 2.2.8.1.3). Außerdem ist es von Vorteil für das Gießen des Top-Agars. Dieser wird in der Mikrowelle aufgeköcht und in ein 48 °C Wasserbad gestellt.

Es wird eine Verdünnungsreihe der λ -Bakteriophagen in SM-Puffer hergestellt (in dieser Arbeit 1/10, 1/100, 1/1000 und 1/7500). Zur Infektion der Bakterien mit den λ -Phagen werden 100 μ l SM-Puffer, 200 μ l der Bakteriensuspension (s. 2.2.8.1.1) und 20 μ l Phagensuspension jeder Verdünnung in sterile Animpfröhrchen pipettiert, gut durchmischt und auf dem Schüttler bei 37 °C 20 min inkubiert. Anschließend werden 3-4 ml Top-Agar pro Animpfröhrchen dazugegeben. Die Suspension wird kurz gemischt (Vortexer) und auf den LB-Agarplatten ausplattiert. Nach Erstarren des Top-Agars werden die Platten invertiert und bei 37 °C ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag werden die Plaques auf dem Bakterienrasen gezählt und die pfu/ml bestimmt (Anzahl der Plaques/ingesetzte μ l Phagen x Verdünnungsfaktor x 1000).

2.2.8.1.3 Herstellung der Nitrozellulosefilter (Replikafilter)

Ausgehend von den Ergebnissen der Titration wird für das weitere Vorgehen die Verdünnung an Phagensuspension gewählt, bei der pro Platte etwa 5000 Plaques entstehen (in dieser Arbeit eine Verdünnung von 1/7500). Es wird mit der entsprechenden Verdünnung wie in Punkt 2.2.8.1.2 verfahren und eine ausreichend große Anzahl Platten (40-60) hergestellt.

Am nächsten Morgen werden nach Kühlung der Platten (1 h, 4 °C) die zuvor sorgfältig beschrifteten Nitrozellulosefilter (Hybond C extra) auf die Platten aufgelegt. Die Beschriftung ist für die spätere Identifizierung der Plaques anhand der Autoradiografie essentiell. Zusätzlich werden zur Erleichterung der Lokalisierung der Phagen auf den Platten mit einer sterilen Nadel Löcher an verschiedenen Stellen durch die Filter in den Agar gestochen. Nach 5 min Auflagezeit werden die Filter vorsichtig mit einer Pinzette abgehoben und mit der DNA-Seite nach oben 1 min auf mit Denaturierungslösung getränktem 3MM Whatman-Filterpapier inkubiert, wobei die DNA-Seite nicht mit der Lösung überschichtet werden darf. Durch diese Inkubation werden die λ -Phagen lysiert und die DNA denaturiert. Anschließend werden die Filter mit der DNA-Seite nach oben 5 min in Neutralisationslösung inkubiert, zweimal 5 min mit 2 x SSPE gewaschen und auf 3MM Whatman-Filterpapier luftgetrocknet. Die DNA wird durch Backen für 2 h bei 80 °C auf den Filtern fixiert. Bis zur Hybridisierung werden die Filter zwischen zwei 3MM Whatman-Filtern gelagert.

2.2.8.1.4 Herstellung der radioaktiven Sonde

Das DNA-Fragment (in dieser Arbeit rHt31 1-1747 bp) wird wie in Punkt 2.2.4 beschrieben, mit dem *Megaprime DNA labeling* Kit von Amersham Pharmacia Biotech mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP radioaktiv markiert.

2.2.8.1.5 Hybridisierung der Nitrozellulosefilter

Reagenzien

Vorwaschlösung	SSC (s. 2.2.6.1) SDS EDTA	5 x 0,05 % 1 mM
6 x SSC		
Chloroform		
Prähybridisierungslösung	s. 2.2.6.1	
Heringssperma-DNA	s. 2.2.6.1	
Waschlösung I	SSC SDS	2 x 0,1 %
Waschlösung II	SSC SDS	0,1 x 0,1 %

Durchführung

Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Prähybridisierung und Hybridisierung werden wie in Punkt 2.2.6.1 in einer verschließbaren Plexiglas-Hybridisierungskammer durchgeführt. Die Nitrozellulosefilter werden mit der DNA-Seite nach oben, einzeln mit einer Pinzette auf eine 6 x SSC-Lösung aufgelegt. Sobald sie durchnässt sind, werden sie untergetaucht und 5 min bei RT geschüttelt. Anschließend werden sie mindestens 2 h bei 42 °C in der Vorwaschlösung inkubiert. Die Heringssperma-DNA wird durch 5 min Kochen denaturiert und zu der auf 42 °C vorgewärmten Prähybridisierungslösung gegeben (Endkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$).

Die Filter werden einzeln luftblasenfrei, mit der DNA-Seite nach oben in die mit 10-15 ml Prähybridisierungslösung gefüllte Hybridisierungskammer gegeben und sorgfältig übereinander geschichtet. Die Prähybridisierung wird unter Schütteln 2 h bei 42 °C durchgeführt. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde ($30-40 \times 10^{60}$ cpm) wird denaturiert (95 °C, 5 min) und anschließend in die Prähybridisierungslösung pipettiert. Die Hybridisierung erfolgt ü. N. (mindestens 8 h) bei 42 °C im Schüttelwasserbad.

Waschen und Exposition der Filter

Die Filter werden in eine Plastikschiene überführt, 3 x 30 min in Waschlösung I bei 50 °C und anschließend in Waschlösung II für 60 min bei 50 °C im Schüttelwasserbad gewaschen. Nach dem letzten Waschschiene werden die Filter auf Whatman-Filterpapier kurz abgetropft, in Klarsichtfolie eingewickelt und auf Whatman-Filterpapier fixiert. Die Exposition auf Kodak-X-OMAT Röntgenfilme erfolgt ü. N. bei -20 °C.

Zuordnung der Hybridisierungssignale zu den Phagen

Die Hybridisierungssignale auf den Röntgenfilmen werden beschriftet und den einzelnen Plaques auf den Platten zugeordnet. In 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße werden 200 µl SM-Puffer und 100 µl Chloroform vorgelegt. Die Plaques werden mit einer sterilen Pasteurpipette ausgestochen und in die vorbereiteten 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße übertragen. Die Suspensionen werden ü. N. bei 4 °C geschüttelt und am nächsten Tag weiterverarbeitet oder bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.8.2 Sekundäres *Screening*

Von den ausgestochenen λ -Phagen muß für das sekundäre *Screening* erneut eine Verdünnungsreihe wie in Punkt 2.2.8.1.2 erstellt werden. Ziel ist die Vereinzelnung der λ -Phagen. Nach der Bestimmung der optimalen Verdünnung der λ -Phagensuspension werden die Bakterien mit den λ -Phagen infiziert und auf Agar-Platten ausplattiert (s. 2.2.8.1.2). Das weitere Vorgehen erfolgt wie beim primären *Screening*.

Die nach dem sekundären *Screening* erhaltenen Hybridisierungssignale werden den entsprechenden Phagenplaques zugeordnet. Von diesen werden 4-5 Plaques pro Platte ausgestochen und in Eppendorfreaktionsgefäße, in die 200 µl SM-Puffer und 100 µl Chloroform vorgelegt wurden, übertragen. Hierbei ist darauf zu achten, daß wirklich nur ein einzelner Plaque von einem λ -Phagen ausgestochen wird. Die Suspensionen werden ü. N. bei 4 °C geschüttelt oder bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.8.3 „In vivo Exzision“ der pBluescript-Phagemide aus dem Uni-ZAP XR-Vektor

Die cDNA-*inserts* im λ ZAP XR-Vektor befinden sich im Vektor pBluescript, der in die λ -DNA integriert ist. Das Phagemid kann mit Hilfe eines Helferphagen (ExAssistent) *in vivo* aus der λ -DNA herausgeschnitten und zirkularisiert werden. Diese „Umklonierung“ ermöglicht die Isolierung des doppelsträngigen pBluescript-Vektors. Die *in vivo* Exzision erfolgt nach den Vorgaben des Herstellers.

Durchführung

Es werden 100 ml Übernachtskulturen von XL1 Blue MRF'- und SOLR-Bakterien in LB-Medium (0,2 % Maltose, 10 mM MgSO₄) hergestellt. Die XL1 Blue MRF'-Bakterien werden abzentrifugiert (2000 x g, 10 min, Heraeus Biofuge 28 RS) und in 40 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert. Die SOLR-Bakterien werden ohne Zentrifugationsschritt bei 4 °C zwischengelagert und können bis zu 3 Tagen für die *in vivo* Exzision benutzt werden.

In 15 ml Falcon-Röhrchen werden jeweils folgende Komponenten für die Infektion der Bakterien mit den λ -Phagen pipettiert und 15 min bei 37 °C inkubiert:

XL1 Blue MRF'-Bakteriensuspension	200 µl
Phagensuspension von 2.2.8.2	50 µl
ExAssistent Helferphage	1 µl

Es werden 3 ml LB-Medium zugegeben und die Inkubation wird weitere 3 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C fortgesetzt. Anschließend werden bakterielle Zelltrümmer

durch Zentrifugation (2000 x g, 15 min, Heraeus Biofuge 28 RS) entfernt. Der die λ -Phagen enthaltende Überstand wird in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt und zur Abtötung eventuell noch lebender Bakterien im Wasserbad bei 70 °C für 15 min inkubiert. Die Suspension wird zentrifugiert (4000 x g, 15 min, Heraeus Biofuge 28 RS) und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Dieser Überstand enthält die als filamentöse Phagenpartikel (Phagemide) „verpackte“ *in vivo* ausgeschnittene pBluescript-Plasmide und kann 1-2 Monate bei 4 °C gelagert werden.

Die SOLR-Bakterien (200 μ l der Übernachtskultur) werden mit 10 μ l der Phagemid-suspension durch 15 min Inkubation bei 37 °C infiziert. Der Vektor pBluescript befindet sich jetzt als Plasmid in den SOLR-Bakterien. Anschließend werden die SOLR-Bakterien auf LB-Ampicillin-Agarplatten (s. 2.1.11) ausplattiert (25 μ l pro Platte). Die Agar-Platten werden bei 37 °C ü. N. inkubiert.

2.2.8.4 Isolierung der pBluescript-Plasmide und Charakterisierung der *inserts*

Für die Plasmidisolierung werden von den Platten einzelne Kolonien in 3 ml LB-Medium, supplementiert mit Ampicillin (100 μ g/ml) überführt und ü. N. im Schüttelinkubator inkubiert. Die Isolierung erfolgt mit dem *QIAPREPTM Miniprep* Bioroboter 9600 nach dem Protokoll des Herstellers (s. 2.2.1.2.3). Zur Bestimmung der Größe werden die *inserts* mit *EcoRI* und *XhoI* aus dem Vektor pBluescript herausgeschnitten (s. 2.2.1.5) und in einem TAE-Agarosegel aufgetrennt. Anschließend werden die *inserts* vom Vektor pBluescript ausgehend mit den Primern T3 und T7 sequenziert (s. 2.2.1.8). Die erhaltenen Sequenzen können mittels Programmen, die im Internet verfügbar sind, auf Homologien zu bekannten Sequenzen untersucht werden (s. 2.1.8).

2.2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.2.9.1 Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

Für die Charakterisierung des *inserts* von Klon 2.1 werden die mittels PCR (s. 2.2.1.8) hergestellten DNA-Fragmente in den Vektor pGEX-4T-3 kloniert, welcher anschließend in kompetente Bakterien transformiert wird. Die Proteinexpression des pGEX-Plasmids wird durch den *tac*-Promoter, der durch das Laktoseanalogon Isopropyl β -D-Thiogalaktosid (IPTG) induziert werden kann, reguliert. Induzierte Bakterien exprimieren ein Fusionsprotein, bestehend aus dem von der klonierten DNA kodierten Protein am C-Terminus und der Glutathion-S-Transferase (GST) am N-Terminus. Dieses Fusionsprotein kann über Glutathion Sepharose 4B gereinigt werden. Die Reinigung erfolgt nach der *Batch*-Methode mit dem *Glutathion-S-transferase* (GST) *Gene Fusion System* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg).

2.2.9.1.1 Vorbereitung der Glutathion-Sepharose 4B

Reagenzien

Glutathion-Sepharose 4B			
PBS	NaCl	8 g/l	
	KCl	0,2 g/l	
	KH ₂ PO ₄	0,2 g/l	
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,15 g/l	pH 7,4

Durchführung

Bei erstmaliger Anwendung der Glutathion-Sepharose 4B (GS) werden 1,33 ml der vom Hersteller gelieferten GS-Lösung (75 %ige Suspension) vorbereitet. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen in der Heraeus Biofuge 15.

Die GS-Suspension wird durch Schütteln resuspendiert und 1,33 ml in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (500 x g, 5 min, RT) wird der Überstand verworfen und das GS-Sediment in 10 ml kaltem (4 °C) autoklavierten PBS durch Schütteln resuspendiert. Das Gemisch wird erneut zentrifugiert (500 x g, 5 min, RT)

und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift erfolgt insgesamt dreimal. Anschließend wird das GS-Sediment in 2 ml PBS resuspendiert. Es entsteht eine 50 %ige GS-Suspension, die bis zu einem Monat bei 4 °C gelagert werden kann.

2.2.9.1.2 Reinigung der GST-Fusionsproteine

Reagenzien

PBS	(s. 2.2.9.1.1)	
PMSF-Lösung	PMSF	40 mM (in Ethanol z. A.)
Proteaseinhibitorengemisch	Benzamidin Trypsininhibitor Aprotinin	100 mM 2 µg/ml 1 µg/ml
PBSI	PBS PMSF-Lsg. Proteaseinhibitorengemisch	10 ml 125 µl 80 µl
Complete™, Mini (Roche Diagnostics)	Protease-Inhibitoren-Cocktail, Tabletten	1 Tabl./7-10 ml PBSI
IPTG		100 mM
Triton X-100®		20 %
Elutionspuffer (frisch ansetzen)	reduziertes Glutathion Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM 50 mM

Durchführung

Alle Lösungen werden autoklaviert. Dem LB-Medium (s. 2.1.10) wird Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml, s. 2.1.11) zugesetzt. Um den Abbau der Fusionsproteine durch Proteasen während der Reinigung zu minimieren, wird, wenn nicht anders angegeben, immer auf Eis bzw. im Kühlraum gearbeitet. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C in der Heraeus Biofuge 28 RS. Während der Reinigung sollten zur Überprüfung und Kontrolle der einzelnen Arbeitsschritte Aliquots für spätere Analysen abgenommen werden.

Von einer 3 ml Übernachtbakterienkultur werden 500 µl in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium (mit Ampicillin) überführt und 1-2 h bis zu einer $O.D._{600nm} = 0,45$ bei 37 °C auf dem Schüttler im Brutschrank inkubiert. Nach Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) für 1-2 h wird die Bakterienkultur

abzentrifugiert (7700 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand möglichst vollständig entfernt. An dieser Stelle kann die Reinigung unterbrochen und das Bakteriensediment bei -80 °C eingefroren werden.

Das Sediment wird in 5 ml eiskaltem (4 °C) PBSI resuspendiert und die Suspension auf 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße verteilt. Die Bakterien werden mit Ultraschall (10 Pulse, auf Eis) aufgeschlossen und nach Zugabe von 20 %iger Triton X-100[®]-Lösung (Endkonzentration 1 %) wird das Lysat 30 min unter leichtem Schütteln im Kühlraum inkubiert. Anschließend wird es zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand in neue Eppendorfreaktionsgefäße transferiert. Zu 100 µl Ultraschallüberstand werden 2 µl der 50 %igen GS-Suspension gegeben. Die Lösung inkubiert anschließend weitere 30-60 min unter leichtem Schütteln. Bei allen Fusionsproteinen mit besonderer Vulnerabilität gegenüber Proteasen sollte diese Inkubation, alle weiteren Reinigungsschritte sowie die Elution unbedingt bei 4 °C erfolgen, bei weniger empfindlichen Fusionsproteinen kann ab jetzt bei RT gearbeitet werden.

Die Sepharose wird sedimentiert (500 x g, 5 min, Heraeus Biofuge 15) und der Überstand verworfen. Das Sediment wird in zehnfachem Volumen kaltem PBS (4 °C) resuspendiert, erneut sedimentiert (500 x g, 5 min, Heraeus Biofuge 15) und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wird zweimal wiederholt. Den Proben wird pro 1 µl Sedimentvolumen der GS 1 µl Elutionspuffer zugegeben. Nach 10-20 min Inkubation unter leichtem Schütteln (die Sepharose darf hierbei nicht über dem Flüssigkeitsrand klebenbleiben und austrocknen) werden die Proben zentrifugiert (500 x g, 5 min). Der Überstand wird in neue 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße transferiert. Die Elution wird zweimal wiederholt und alle Eluate anschließend vereinigt. Vom Eluat wird die Proteinkonzentration nach Bradford (s. 2.2.9.3) bestimmt und eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Blau-Färbung (s. 2.2.9.4.1 und 2.2.9.4.2) zur Überprüfung der Qualität der Reinigung durchgeführt.

2.2.9.2 Thrombinspaltung der GST-Fusionsproteine

Der Vektor pGEX-4T-3 kodiert zwischen der Glutathion-S-Transferase und der *multiple cloning site* eine Schnittstelle für die Thrombinprotease. Mit diesem Enzym kann das von dem klonierten DNA-Fragment kodierte Protein von der Glutathion-S-Transferase

abgespalten werden. Die Abspaltung des GST ist nur zur genauen Größenbestimmung des kodierten Proteins in einer SDS-PAGE notwendig.

Durchführung

Zu dem Eluat von 2.2.9.1.2 gibt man pro mg Fusionsprotein 10 µl Thrombinlösung (1 U/µl) und inkubiert die Lösung unter vorsichtigem Schütteln bei RT 4-16 Stunden. In einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Blau-Färbung kann die Vollständigkeit der Spaltung überprüft und die genaue Größe des Proteins bestimmt werden.

2.2.9.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Reagenzien

Proteinreagenz Coomassie Brilliantblau-Lösung (PR CBB)	PR CBB Ethanol 95 Vol. % H ₃ PO ₄ 85 %	100 mg/l 4,75 % (v/v) 8,5 % (v/v)
Ovalbumin-Lösung 1	Ovalbumin	0,1 mg/ml
Ovalbumin-Lösung 2	Ovalbumin	1 mg/ml
NaOH-Lösung		2 N

Durchführung

Herstellung der Proteinreagenz (PR CBB)

100 mg Proteinreagenz Coomassie brilliant blue G 250 (PR CBB) werden in 50 ml 95 %igem (v/v) unvergällten Ethanol gelöst. Die Lösung wird in einen Meßzylinder überführt, 800 ml Aqua tridest. dazugegeben und ü. N. im Dunkeln stengelassen.

Am nächsten Tag wird nach Zugabe von 100 ml 85 %iger Phosphorsäure (H₃PO₄) ad 1000 ml mit Aqua tridest. aufgefüllt. Die Lösung wird geschüttelt und durch einen Faltenfilter in eine braune Glasflasche (Lichtschutz) filtriert.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Eine Eichreihe wird mit Ovalbumin bekannter Konzentration in 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen erstellt. Die Proteinstandards 0, 1, 2, 5, 10, 20 und 40 µg werden mit Aqua tridest. auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Alle Standards werden in Duplikaten verwendet. Das Pipettierschema ist in Tab. 2.1 dargestellt. Von den zu bestimmenden Proben werden im Doppelansatz je 5 µl in Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und mit 45 µl Aqua tridest. verdünnt.

Pipettierschema

Proben Nr.	Proteinmenge (µg)	Standard Ovalbumin 0,1 mg/ml Stammlsg. (µl)	H ₂ O (µl)	2 N NaOH (µl)	PR CBB (µl)
1	0	0	50	50	1000
2	0	0	50	50	1000
3	1	10	40	50	1000
4	1	10	40	50	1000
5	2	20	30	50	1000
6	2	20	30	50	1000
Proben Nr	Proteinmenge (µg)	Standard Ovalbumin 1 mg/ml Stammlsg. (µl)	H ₂ O (µl)	2 N NaOH (µl)	PR CBB (µl)
7	5	5	45	50	1000
8	5	5	45	50	1000
9	5	5	45	50	1000
10	10	10	40	50	1000
11	10	10	40	50	1000
12	20	20	30	50	1000
13	20	20	30	50	1000
14	40	40	10	50	1000
Proben Nr	Proteinmenge (µg)	Probe (µl)	H ₂ O (µl)	2 N NaOH (µl)	PR CBB (µl)
X	zu bestimmen	5	45	50	1000
X	zu bestimmen	5	45	50	1000

Tab. 2.1: Pipettierschema der Eichreihe (Proben 1-14) und der Probe (X) für die Proteinbestimmung. Die zweite Spalte gibt die eingesetzte Menge an Protein für die Eichkurve an. Nach Zugabe von Protein, Wasser und NaOH werden die Proben 10 min bei 60 °C oder 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann wird das Proteinreagenz (PR CBB) dazugegeben und sofort die Absorption bei 595 nm im Fotometer gemessen.

Zur Denaturierung der Proteine werden 50 µl NaOH-Lösung hinzugegeben und die Proben bei 60 °C für 10 min inkubiert (alternativ bei 37 °C für eine Stunde). Anschließend wird den Proben 1 ml PR CBB hinzugefügt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm im Fotometer gemessen. Die gemessenen Werte werden mit dem Programm *wiacalc* (Wallac und Os 1989) ausgewertet. Das Programm erstellt anhand der sieben Proteinstandards eine Eichkurve und berechnet daraus die Proteinmenge in den unbekanntenen Proben in µg.

2.2.9.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

2.2.9.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE, Laemmli et al. 1970), wird in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Die Diskontinuität bezieht sich auf die Gelstruktur (großporiges Sammelgel, engporiges Trenngel), den pH-Wert (Sammelgel, pH 6,8 → Trenngel, pH 8,8) und der Ionenstärke der Puffer. Durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen der Tertiär- und Sekundärstruktur und durch Streckung der Moleküle gleicht das anionische Detergenz SDS die unterschiedlichen Molekülgrößen aus. Die Schwefelbrücken, die zwischen den Cysteinen gebildet werden können, werden durch Zugabe der reduzierenden Thiolverbindung β-Mercaptoethanol aufgespalten. Die Proteine werden nach ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld getrennt.

Reagenzien

4 x Laemmli-Probenpuffer	Glyzerin 10 % SDS (w/v) 2 M Tris-HCl (pH 6,8) β-Mercaptoethanol Bromphenolblau	2 ml 1,5 ml 1 ml 375 µl 5 mg
Rotiphorese [®] Gel 30	gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wäßrige 30 %ige Acrylamidstammllösung mit 0,8 % Bisacrylamid	
Trenngelpuffer	Tris-HCl (pH 8,8)	0,75 M
Sammelgelpuffer	Tris-HCl (pH 6,8)	0,625 M
SDS-Lösung	SDS	20 % (w/v)

TEMED	unverdünnt	
Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung	APS	10 % (w/v)
Laufpuffer	Tris Glyzin SDS H ₂ O	240 mM 384 mM 0,1 % ad 1 l pH 8,3-8,4

Durchführung

Vorbereitung der Gele

Nach Zusammenbau der Gelgießvorrichtung wird zuerst das Trenngel in der im Pipettierschema (Tab. 2.2) angegebenen Reihenfolge vorbereitet und zwischen die durch 1 mm dicke Abstandhalter voneinander getrennten Glasplatten so hoch gegossen, daß noch ausreichend Platz für das Sammelgel bleibt. Um eine Polymerisation unter Luftausschluß zu gewährleisten und eine ebene Trenngeloberfläche zu erhalten, wird das Gel mit 70 %igem Isopropanol überschichtet. Nach 30 min wird das Isopropanol abgegossen, das angesetzte Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und der Teflonkamm für die Probestaschen eingesetzt. Nach 30 min kann der Kamm entfernt und das Gel beladen werden.

	Trenngel			Sammelgel	
	8 %	10 %	12 %		
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	1,5 ml	1,87 ml	2,25 ml	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	417,5 µl
Tris-HCl pH 8,8 0,75 M	2,825 ml	2,825 ml	2,825 ml	Tris-HCl pH 6,8 0,625 M	312,5 µl
SDS 20 % (w/v)	28,25 µl	28,25 µl	28,25 µl	SDS 20 % (w/v)	12,5 µl
TEMED unverdünnt	2,83 µl	2,83 µl	2,83 µl	TEMED unverdünnt	2,5 µl
Aqua tridest.	1,25 ml	0,875 ml	0,5 ml	Aqua tridest.	1,75 ml
APS 10 % (w/v)	39,5 µl	39,5 µl	39,5 µl	APS 10 % (w/v)	12,5 µl

Tab. 2.2: Ansatz für ein 8 %iges, 10 %iges und 12 %iges SDS-PAGE Minigel.

Vorbereitung der Proben und Elektrophorese

Es werden 0,5-10 µg der GST-Fusionsproteine bzw. 40-80 µg Proteinhomogenat pro Geltasche aufgetragen. Die Proteinproben werden im Eis aufgetaut, mit 4 x Laemmli-Probenpuffer, bis dieser im Ansatz eine einfache Konzentration erreicht hat, verdünnt und 5 min bei 95 °C gekocht. Anschließend werden die Proben in die Geltaschen gegeben. Der Lauf erfolgt in einer entsprechenden, mit Laufpuffer gefüllten Vorrichtung bei 20 mA pro Minigel für etwa 90 min (oder bis die bromphenolblaugefärbte Lauffront an der Unterkante des Gels angekommen ist).

In dieser Arbeit wurden als Molekulargewichtsstandard für die SDS-PAGE der *High Molecular Weight*-Größenstandard (10 kDa Proteinleiter) der Firma Life Technologies, der *Prestained Protein Marker, Broad Range* von New England Biolabs Inc. und der *High Molecular Weight Standard Mixture for SDS-PAGE* von SIGMA verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese kann das Gel entweder in Coomassie Blau-Lösung gefärbt (s. 2.2.9.4.2) oder auf eine Nitrozellulosemembran geblottet werden (s. 2.2.9.4.3).

2.2.9.4.2 Coomassie Blau-Färbung

Reagenzien

Coomassie Blau-Lösung	Methanol Essigsäure Coomassie [®] Brilliant Blue R 250	50 % 10 % 0,25 %
Entfärberlösung	Methanol Essigsäure Aqua tridest.	30 % 10 % ad 1 l

Durchführung

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 45 min in der Coomassie Blau-Lösung unter leichtem Schütteln bei RT gefärbt und anschließend in der Entfärberlösung entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar sind. Mehrmaliges Wechseln der Lösung beschleunigt das Entfärben. Das Gel wird anschließend in einer entsprechenden Vorrichtung getrocknet.

Die Entfärbelösung kann nach Filterung durch einen Aktivkohle-Filter erneut benutzt werden.

2.2.9.4.3 Western Blot

Der Transfer von Proteinen aus einer SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran wird mittels Elektrotransfer im Tankblot- und im *Semi-dry*-Verfahren erreicht. Beim Tankblot erfolgt der Elektrotransfer zwischen zwei Elektroden in einer mit Blotpuffer gefüllten BioRad Tankblot-Apparatur.

2.2.9.4.3.1 Tankblot

Reagenzien

Transferpuffer	Tris-HCl Glyzin Methanol SDS	20 mM 150 mM 20 % (v/v) 0,05 % (w/v)	pH 8,3-8,5
TBS	Tris-HCl NaCl	10 mM 150 mM	pH 7,4
TBST	TBS Tween 20	1 x 0,05 % (v/v)	
Ponceau Rot-Färbelösung	Ponceau S Essigsäure	0,1 % (w/v) 5 % (v/v)	

Durchführung

Der Elektrotransfer erfolgt in einem kontinuierlichen Puffersystem bei 4 °C. Es werden für ein Minigel zwei auf Gelgröße (5,5 x 9,5 cm) zugeschnittene Whatman-Filterpapiere, eine Nitrozellulosemembran, zwei Schwämme, eine Blotkassette und eine Blotkammer benötigt. Vor dem Transfer werden die Filter, Schwämme und die Nitrozellulosemembran im Transferpuffer äquilibriert.

Eine Glasplatte wird vom Gel entfernt, das Trenngel vom Sammelgel getrennt und die untere rechte Ecke des Trenngels zur Orientierung entfernt. Der Aufbau des Transfer-*Sandwich* erfolgt von der Anoden- zur Kathodenseite der Transfervorrichtung:

Anodenseite
Schaumstoff
Whatman-Filterpapier
Nitrozellulosemembran
Acrylamidgel
Whatman-Filterpapier
Schaumstoff
Kathodenseite

Damit das *Sandwich* beim Transfer luftblasenfrei ist, wird es im Transferpuffer aufgebaut und mögliche Luftblasen werden nach jeder Schicht durch Rollen mit einer Glaspipette entfernt. Die Kassette wird geschlossen und in den mit Transferpuffer gefüllten Tank so eingesetzt, daß das Gel der Kathode und die Nitrozellulosemembran der Anode zugewandt ist. Ein Kühlelement, das in den Blot-Tank eingesetzt wird, verhindert die Überhitzung während des Transfers. Der Transfer erfolgt bei 80 mA pro Minigel für 2 h.

Der Proteintransfer auf die Membran wird durch Färbung der Membran für 5 min in Ponceau Rot-Lösung auf dem Schüttler überprüft. Die Markerproteine werden auf der gefärbten Membran mit einem Kugelschreiber markiert und die Spuren beschriftet. Anschließend wird die Membran in eine Klarsichthülle gelegt und zur Dokumentation fotokopiert. Die Membran wird 2 x 10 min in TBST auf dem Schüttler entfärbt und kann entweder für die Immundetektion eingesetzt (s. 2.2.9.4.4) oder bis zum Gebrauch zwischen zwei Whatman-Filterpapieren aufbewahrt werden.

2.2.9.4.3.2 *Semi-dry-Transfer*

Beim *Semi-dry-Transfer* erfolgt der Proteintransfer zwischen zwei Graphitelektroden. Es werden zwei extra dicke Filterpapiere (*extra thick Filterpaper*, BioRad) und eine Nitrozellulosemembran für ein Minigel benötigt. Vorteile des *Semi-dry-Transfers* gegenüber dem Tanktransfer sind u. a. der erheblich geringere Pufferverbrauch, der schnellere Transfer und die einfachere Handhabung. Außerdem entfällt die Kühlung.

Reagenzien

<i>Semi-dry-Transferpuffer</i>	Tris-HCl	48 mM	
	Glyzin	39 mM	
	SDS	0,0375 % (w/v)	
	Methanol	20 % (v/v)	pH 9,0-9,4

Durchführung

Das Acrylamidgel wird 15-30 min, die Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran 5-10 min im Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wird das Transfer-*Sandwich* in einer *Semi-dry-Transfer*apparat wie folgt aufgebaut:

Kathodengraphitplatte
extra dickes Filterpapier
Acrylamidgel
Nitrozellulosemembran
extra dickes Filterpapier
Anodengraphitplatte

Mögliche Luftblasen werden nach jeder Schicht durch Rollen einer Glaspipette entfernt. Der Transfer erfolgt bei 10 V pro Minigel für 30 min. Es können zwei Minigele gleichzeitig geblottet werden. Das weitere Vorgehen erfolgt wie in 2.2.9.4.3.1.

2.2.9.4.4 Immundetektion

Aus den polyklonalen Anti-Kaninchen Antiseren 1965 (gerichtet gegen ein Epitop in den Sequenzen von rHt31 (Aminosäuren 369-383), hHt31 (Aminosäuren 803-817) und hBrx (Aminosäuren 172-186) und 3060 (gerichtet gegen eine Sequenz im neuen, bisher nicht publizierten N-Terminus von hHt31 (Aminosäurereste (-66)-(-46))¹ wurden über eine Thiopropyl-Sepharose 6B Säule die Antikörper 1965 und 3060 affinitätsgereinigt (s. 2.2.10). Sie wurden anschließend für die Immundetektion dieser Proteine im Western Blot eingesetzt.

Reagenzien

TBST	s. 2.2.9.4.3.1	
Blotto	TBST Magermilchpulver	1 x 5 % (w/v)
<i>Lumi-Light</i> Färbelösung	<i>Lumi-Light Luminol / Enhancer-Lösung</i> <i>Lumi-Light Stable Peroxide-Lösung</i>	kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 mischen

Durchführung

Blocken		2 h in Blotto bei RT oder ü. N. bei 4 °C
Primärantikörper	1:50-1:5000	1,5 h in Blotto bei RT
Waschen		6 x 5 min in TBST
Sekundärantikörper	Meerrettich-Peroxidase-konjugierter anti-Kaninchen-Antikörper, 1:1500	1 h in Blotto bei RT
Waschen		6 x 5 min in TBST
Chemilumineszenzreaktion	<i>Lumi-Light</i> Färbelösung	5 min, dann Exposition am <i>Lumi-Imager F1</i> ²

¹ Bei der Bezeichnung dieser Aminosäuren wurde die bisher publizierte Aminosäuresequenz von hHt31 (Carr et al. 1992a) zugrunde gelegt.

² Die Expositionszeit wird entsprechend der Intensität der Signale gewählt.

2.2.9.4.5 Peptidinhibition des affinitätsgereinigten Antikörpers 1965

Das dem Epitop des Antikörpers 1965 entsprechende Peptid 1965 (Aminosäurereste 369-384 von rHt31) wird in DMSO gelöst (1,87 mg/ml, 1 mM). Der Antikörper 1965 (0,016 µg/µl, 1 µM) wird mit einem tausendfachen molaren Überschuß an in DMSO gelöstem Peptid eine Stunde bei RT in 500 µl Blotto (s. 2.2.9.4.4) inkubiert. Der Antikörper wird anschließend im Western Blot wie in 2.2.9.4.4 beschrieben eingesetzt.

2.2.10 Affinitätsreinigung von Antiseren

Die das Epitop spezifisch erkennenden Antikörper der Antiseren 1965 und 3060 werden durch Affinitätsreinigung über eine Thiopropyl-Sepharose 6B Säule gewonnen. Die Säule wird nach Abspaltung der Schutzgruppe (2-Thiopyridil) mit den Peptiden 1965 (Aminosäurereste 369-384 von rHt31) bzw. 3060 (Aminosäurereste (-66)-(-46) von hHt31) inkubiert, welche an die freie 2-Pyridyldisulfidgruppe der Sepharose binden. Anschließend wird die Säule mit dem jeweiligen Antiserum inkubiert und nach mehreren Waschschritten zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper werden die spezifisch gebundenen Antikörper von der Sepharose eluiert.

Reagenzien

Strip-Puffer	NaHCO ₂ (pH 8,4) EDTA	300 mM 1 mM	
Waschpuffer	CH ₃ COOH NaCl EDTA	100 mM 500 mM 1 mM	
Bindungspuffer I	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (pH 7-7,5) NaCl	20 mM 150 mM	
Elutionspuffer I	Glyzin NaCl	200 mM 150 mM	pH 2,5
Elutionspuffer II	Glyzin NaCl	200 mM 150 mM	pH 2,25
PBS-T	PBS (s. 2.2.9.1.1) Tween [®] 20	1 x 0,5 %	
Tris-HCl	Tris-HCl (pH 9,0)	2 M	
HEPES/KOH		50 mM	pH 8,0

2.2.10.1 Herstellung der Peptidaffinitätssäulen

Vorbereitung der Sepharose

Die Thiopropyl-Sepharose 6B (0,5 g) wird in einem Erlenmeyerkolben in einem Überschuß von Aqua tridest. (11 ml) 10 min bei RT gequollen. Die Sepharose wird in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, zentrifugiert (780 x g, 3 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und der Überstand verworfen. Anschließend wird die Sepharose zweimal mit Aqua tridest. gewaschen und jeweils bei 780 x g für 3 min zentrifugiert (Heraeus Biofuge 15).

Abspaltung der Schutzgruppe (2-Thiopyridil)

Die Sepharose wird mit 12 ml Strip-Puffer gewaschen und zentrifugiert (780 x g, 3 min, Heraeus Biofuge 15). Nach Resuspension des Sepharose-Sediments in 2 ml Strip-Puffer wird die Suspension in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß transferiert und bei RT für 40 min auf dem Rotationsrad inkubiert. Die Sepharose-Suspension wird erneut zentrifugiert (780 x g, 3 min, Heraeus Biofuge 15), der Überstand aufbewahrt und die Sepharose anschließend dreimal mit 12 ml Waschpuffer gewaschen. Sie kann unter N₂ im Waschpuffer gelagert werden.

Lösen des Peptids

10 mg Peptid werden in 0,4 ml Aqua tridest. gelöst und der pH-Wert auf ca. 8,0 mit 50 mM Hepes/KOH eingestellt.

Bindung des Peptids an die Sepharose

Die Sepharose wird bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 7-7,5 mit 12 ml Bindungspuffer bei 4 °C gewaschen. Das Volumen der Sepharose beträgt nach der letzten Zentrifugation etwa 2 ml. 0,5 ml Sepharose werden in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und das gelöste Peptid dazugegeben. Die Bindung des Peptids an die Sepharose erfolgt auf dem Rotationsrad für 1 h bei 4 °C.

Nach der Bindung wird die Sepharose in ein 15 ml Falconröhrchen transferiert, zentrifugiert (780 x g, 3 min, Heraeus Biofuge 15) und nacheinander mit jeweils 12 ml Bindungspuffer, Elutionspuffer I und dreimal mit Bindungspuffer gewaschen.

2.2.10.2 Affinitätsreinigung des Antiserums

Bindung der Antikörper an die Peptid-gekoppelte Sepharose

Das Antiserum (15 ml) wird zu der Peptid-gekoppelten Sepharose (s. 2.2.10.1) gegeben und ü. N. bei 4 °C auf dem Rotationsrad inkubiert. Nach der Inkubation wird zentrifugiert (780 x g, 3 min, RT, Heraeus Biofuge 15) und der Überstand aufbewahrt. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen wird anschließend fünfmal mit PBS-T gewaschen.

Elution der Antikörper

Die Sepharose wird in eine BioRad-Säule (BioRad Poly-Prep *Chromatography Column*, Nr. 731-1550) transferiert. Das Packen der Säule erfolgt unter Durchfluß von 10 ml PBS-T. In 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße werden 50 µl 2 M Tris, pH 9 vorgelegt. Die Antikörper werden von der Sepharose-Säule durch Zugabe von 6 ml Elutionspuffer I, pH 2,5 eluiert. Das Eluat wird in 1 ml Fraktionen in den vorbereiteten 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen. Der pH-Wert muß hierbei unbedingt kontrolliert werden und sollte etwa 7,5 betragen. Um tatsächlich alle Antikörper zu eluieren, wird eine zweite Elution mit 4 ml Elutionspuffer II, pH 2,25 durchgeführt.

Die eluierten Antikörper werden in Centricon-Röhrchen (YM-30, Millipore) ankonzentriert und anschließend in NaPO₄-Puffer umgepuffert, indem mindestens fünfmal Bindungspuffer durch die Centricon-Röhrchen hindurchzentrifugiert wird.

Regeneration der Säule

Zur Konservierung der wiederverwendbaren Peptidsäule läuft Bindungspuffer mit 0,05 % Natriumazid und 2 mM PMSF durch (10 ml), bis etwa 2 ml über dem Säulenbett übrigbleiben. Die Peptidsäule wird bei 4 °C gelagert.

2.2.11 Herstellung von Zellfraktionen eukaryontischer Zellen

2.2.11.1 Herstellung von löslichen und partikulären Zellfraktionen

Reagenzien

PBS (s. 2.2.9.1.1), PBSI (s. 2.2.9.1.2)

Durchführung

Es wird auf Eis oder im Kühlraum gearbeitet. Für die Fraktionierung der Zellen werden konfluent bewachsene Zellkulturschalen (\varnothing 60 mm) benötigt. Die Zellen werden dreimal mit eiskaltem PBS (4 ml) gewaschen und mit 200 μ l PBSI abgeschabt. Anschließend werden sie im Glas-Teflon-Homogenisator mit 15 Hüben bei 1250 rpm homogenisiert. Von diesem Zellhomogenat (Gesamthomogenat) können bereits Aliquots (500 μ l) für Western Blot-Experimente (s. 2.2.9.4) abgenommen werden.

Die Kerne und Zelldebris werden abzentrifugiert (2800 x g, 10 min, 4 °C, Sorvall RC5C Plus). Von beiden Fraktionen (2800 x g Sediment (Kerne und Zelldebris) und Überstand) werden ebenfalls Aliquots (500 μ l) abgenommen. Das Sediment wird je nach Größe in 50-200 μ l PBSI resuspendiert. Anschließend wird der 2800 x g-Überstand in ein UZ-Röhrchen überführt und in der Ultrazentrifuge (Optima TLX, Beckman) zentrifugiert (200000 x g, 60 min, 4 °C). Das Sediment (partikuläre Zellfraktion) wird nach Abnahme des Überstands (lösliche Zellfraktion) in PBSI resuspendiert (20 μ l pro \varnothing 60 mm Schale).

Von den verschiedenen Fraktionen (Gesamthomogenat, Kerne und Zelldebris, lösliche und partikuläre Fraktion) werden jeweils zweimal 5 μ l für die Proteinbestimmung (s. 2.2.9.3) abgenommen. Die Fraktionen werden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.11.2 Reinigung der Kernfraktion eukaryontischer Zellen

Die Reinigung erfolgt in modifizierter Form nach dem Protokoll von Graham und Rickwood (1997).

Reagenzien

Homogenisierungspuffer (HP)	Sucrose Tris-HCl (pH 7,4) MgCl ₂ EDTA Dithiothreitol	0,25 M 10 mM 5 mM 0,5 mM 0,5 mM
Sucrosegradientenpuffer	Sucrose Tris-HCl (pH 7,4) MgCl ₂	2,2 M 10 mM 1 mM
PBS	s. 2.2.9.1.1	
PMSF	s. 2.2.9.1.2	
Proteaseinhibitorengemisch	s. 2.2.9.1.2	
HPI	Homogenisierungspuffer PMSF Proteaseinhibitorengemisch	10 ml 125 µl 80 µl

Durchführung

Es wird auf Eis oder im Kühlraum gearbeitet und es werden 6-10 konfluent bewachsene Zellkulturschalen (Ø 60 mm) pro Präparation benötigt. Die Zellen werden zweimal mit eiskaltem PBS (4 ml) gewaschen, mit 200 µl Homogenisierungspuffer mit Proteaseinhibitoren (HPI) abgeschabt und im Glas-Teflon-Homogenisator mit 5 Hüben bei 700 rpm homogenisiert. Das Homogenat wird zentrifugiert (600 x g, 10 min, 4 °C, Sorvall RC 5C Plus) und der Überstand verworfen. Das Sediment wird in der Hälfte des zuvor verwendeten Volumen an HPI resuspendiert und nochmals zentrifugiert (600 x g, 10 min, 4 °C). Anschließend wird das Sediment (grobe Kernfraktion) im Sucrosegradientenpuffer (200 µl pro Ø 60 mm Schale) resuspendiert und erneut homogenisiert (Glas-Teflon-Homogenisator, 1000 rpm, 5 Hübe). Dieser Schritt ist entscheidend, da hierbei Membrankontaminationen von den Kernen entfernt werden.

Die Kernsuspension wird im *swing-out* Rotor zentrifugiert (60-80000 x g, 80 min, 4 °C, Beckman TLK-100 Zentrifuge). Nach der Zentrifugation sollten die Kerne ein cremig

gelbes Sediment am Boden des Zentrifugationsröhrchens bilden, jegliche Membrankontamination färbt das Sediment rötlich. Die sich möglicherweise gebildete Haut auf dem Flüssigkeitsspiegel wird mit einem Spatel entfernt und das Röhrchen durch schnelle Inversion geleert. Flüssigkeitsreste werden mit einem Spatel, der mit einem Papiertuch umwickelt ist, entfernt. Das Sediment wird in HPI (10-20 µl pro Ø 60 mm Schale) resuspendiert und anschließend aliquotiert (50 µl). Für die Proteinbestimmung (s. 2.2.9.3) werden zweimal 5 µl abgenommen. Die Aliquots werden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.12 Herstellung von Zellfraktionen aus Geweben der Ratte

Reagenzien

PBSI (s. 2.2.9.1.2)

Durchführung

Das Gewebe wird mit Schere und Skalpell so weit wie möglich zerkleinert und nach Zugabe von PBSI (3 ml/g Gewebe) im 5 ml Glas-Teflon-Homogenisator mit 15 Hüben bei 1250 rpm homogenisiert. Die weitere Aufbereitung erfolgt wie unter 2.2.11.1 beschrieben.

2.2.13 RII-overlay

Der radioaktive RII-overlay wird nach dem Protokoll von Bregman et al. (1989) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die regulatorischen Untereinheiten der PKA (RII) durch die katalytischen Untereinheiten (cPKA) *in vitro* mit radioaktivem Phosphor [^{32}P] autophosphoryliert. Die GST-Fusionsproteine bzw. Zell- und Gewebekomponenten werden in einer SDS-PAGE aufgetrennt (s. 2.2.9.4.1), auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (s. 2.2.9.4.3) und anschließend mit den radioaktiv markierten RII-Untereinheiten hybridisiert.

2.2.13.1 Radioaktive Markierung der RII-Untereinheiten

Die radioaktive Markierung der RII-Untereinheiten wird wie folgt auf Eis durchgeführt:

RII	2,7 µg/µl	5,6 µl	15 µg ¹⁾
cPKA	1,31 µg/µl	2 µl	2,6 µg ¹⁾
Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0)	1 M	12,5 µl	25 mM
cAMP	1 mM	5 µl	10 µM
MgCl ₂	0,5 M	10 µl	10 mM
DTT	50 mM	5 µl	0,5 mM
[γ ³² P]-ATP = 3.3 x 10 ⁸ cpm/ml	5 µCi/µl	15 µl	75 µCi
ATP (kalt)	10 µM	5 µl	100 pM
[[γ ³² P]-ATP/ATP (kalt)			0,1 µM
H ₂ O.		434,9 µl	

¹⁾ Endkonzentration in 500 ml Volumen

Der Ansatz wird 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 5 µl einer 1 mM ATP-Lösung wird die ATP-Konzentration auf 10 µM eingestellt. Die Probe wird für weitere 50 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Dextranblau (70 µl einer 20 mg/ml Lösung) werden nicht eingebaute Nukleotide über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt (s. 2.2.13.2).

2.2.13.2 Abtrennung der RII-Untereinheiten von freien Nukleotiden

Nicht eingebaute Nukleotide werden durch Fraktionierung über eine Sephadex G50-Säule von den radioaktiv markierten RII-Untereinheiten getrennt (vgl. 2.2.5).

Reagenzien

Sephadex G50-Material, PBS (s. 2.2.9.1.1), BSA

Durchführung

20 g Sephadex G50-Material werden ü. N. in 400 ml PBS wie in Punkt 2.2.5 beschrieben bei RT gequollen. Das Sephadex G50-Material wird in eine sterile, mit einer Glaskugel verschlossene 10 ml Einmalpipette gegossen. Zum Setzen des Säulenbettes laufen ca. 30 ml PBS, dem 1 mg/ml BSA zugesetzt sind, durch die Säule.

Vom Markierungsansatz werden 5,7 µl (1 %) zur Bestimmung der eingesetzten Radioaktivität abgenommen und anschließend die restliche Probe auf die Säule aufgetragen. Nach Einwandern der Probe in die Matrix wird mit PBS aufgefüllt. Aufgrund der Eigenschaften des Säulenmaterials laufen die radioaktiv markierten RII-Untereinheiten mit dem Dextranblau. Bis zur Elution der blauen Front wird die Säule mehrmals mit PBS aufgefüllt und anschließend werden die blaue und weitere Fraktionen gesammelt, bis die Säule trocken ist.

Zur Bestimmung der Einbaurate werden 5,7 µl der Probe vor dem Auftragen auf die Säule und 1 % der ersten und zweiten Fraktion in mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit gefüllte Szintillationsröhrchen überführt. Die Radioaktivität wird in cpm wie in 2.2.5 bestimmt und die Einbaurate berechnet.

2.2.13.3 Hybridisierung

Reagenzien

Blotto/BSA	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)	10 mM
	NaCl	150 mM
	Magermilchpulver	5 %
	BSA	0,1 %
	NaN ₃	0,02 %
Ht31-Peptid (in DMSO)	1 mM	10 µM
Ht31-P-Peptid (in DMSO)	1 mM	10 µM
Waschpuffer	Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4)	10 mM
	NaCl	150 mM

Durchführung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wird die Membran ü. N. bei 4 °C oder 1 h bei RT auf dem Schüttler in Blotto/BSA inkubiert. Die radioaktiv markierten RII-Untereinheiten (10^6 cpm/ml (10×10^6 cpm pro Membran)) werden mit dem inhibitorischen Peptid Ht31 oder dem Kontrollpeptid Ht31-P (Endkonzentration der Peptide im Ansatz jeweils 10 μ M) in 500 μ l Blotto/BSA 30 min bei RT auf dem Schüttler präinkubiert. Die Inkubationslösung wird durch frisches Blotto/BSA ersetzt, die radioaktiv markierten RII-Untereinheiten dazugegeben und die Membran bei RT für 4-6 h inkubiert.

Nach der Inkubation wird die Membran 4 x 15 min in Blotto/BSA und 2 x 10 min in Waschpuffer gewaschen. Die Membran wird in Frischhaltefolie verpackt und ein *Glogos*-Marker zur Orientierung auf die Folie geklebt. Durch Exposition auf einen Röntgenfilm werden RII-Untereinheiten-bindende Proteine detektiert.