

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Material

#### Oligonukleotide

Die Oligonukleotide und die Primer wurden von MWG-Biotech AG synthetisiert:

Oligonukleotid	
1	5'-T ATG CTC GAG CGT TTT GCG CGT AAA GGC GCG CTG CGT CAG AAA AAC GTG-3'
2	3'-GCA GTC TTT TTG CAC GGC TTT TTT TTT GCG TTT CAC GCA GTC TAG TTT TAG-5'
3	5'-CGT CAG ATC AAA ATC TGG TTT CAG AAC CGT CGT ATG AAA TGG AAA AAA-3'
4	3'-AC GAG CTC GCA AAA CGC GCA TTT CCG CGC GAC-5'
5	3'-ACC AAA GTC TTG GCA GCA TAC TTT ACC TTT TTT TCG A-5'
6	5'-CCG AAA AAA AAA CGC AAA GTG-3'
10	5'-GA TCC CGT TTT GCG CGT AAA GGC GCG CTG CGT CAG AAA AAC GTG GGC-3'
11	3'-G GCA AAA CGC GCA TTT CCG CGC GAC GCA GTC TTT TTG CAC CCG CCG G-5'
20	5'-GGC CCG GGC GGC CCG AAA AAA AAA CGT AAA GTG GGC GGC CCG GGC-3'
21	3'-AC GAG CTC GCA AAA CGC GCA TTT CCG CGC GAC GCA GTC TTT TTG CAC CCG GGC CCG CCG GGC-5'
22	3'-TTT TTT TTT GCA TTT CAC CCG CCG GGC CCG GCA GTC TAG TTT TAG-5'
23	5'-GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG-3'
24	3'-TTT TTT TTT GCA TTT CAC CCG CCG GGC CCG GCA GTC TAG TTT TAG ACC AAA GTC TTG-5'
25	3'-GCA GCA TAC TTT ACC TTT TTT CTT GTT TTT GAG TAG AGT CTT CTC CTA GAC TCG A-5'
26	5'-T ATG CCG AAA AAA AAA CGT AAA GTG GGC CCG GGC GGC CGT-3'
27	5'-TTT GCG CGT AAA GGC GCG CTG CGT CAG AAA AAC GTG GGC GGC CCG GGC-3'
28	3'-AC GGC TTT TTT TTT GCA TTT CAC CCG GGC CCG CCG GCA AAA CGC GCA TTT CCG-5'
29	3'-CGC GAC GCA GTC TTT TTG CAC CCG CCG GGC CCG GCA GTC TAG TTT TAG-5'
30	3'-ACC AAA GTC TTG GCA GCA TAC TTT ACC TTT TTT CTT GTT TTT GAG TAG AGT CTT CTC CTA GAC TCG A-5'
31	3'-TTT TTT TTT GCA TTT CAC CCG CCG GGC CCG CTT GTT TTT GAG TAG-5'
32	3'-AGT CTT CTC CTA GAC GCA GTC TAG TTT TAG ACC AAA GTC TTG GCA GCA TAC TTT ACC TTT TTT TCG A-5'
33	3'-CGC GAC GCA GTC TTT TTG CAC CCG CCG GGC CCG CTT GTT TTT GAG TAG-5'

<b>TP</b>	5'-Oligo 1- Oligo 6- Oligo 3-3' 3'-Oligo 4- Oligo 2- Oligo 5-5'
<b>TP2</b>	5'-Oligo 1- Oligo 20- Oligo 3-3' 3'-Oligo 21- Oligo 22- Oligo 5-5'
<b>TP3</b>	5'-Oligo 1- Oligo 20- Oligo 3- Oligo 23-3' 3'-Oligo 21- Oligo 24- Oligo 25-5'
<b>TP4</b>	5'-Oligo 1- Oligo 20- Oligo 23- Oligo 3-3' 3'-Oligo 21- Oligo 31- Oligo 32-5'
<b>TP5</b>	5'-Oligo 26- Oligo 27- Oligo 3-3' 3'-Oligo 28- Oligo 29- Oligo 5-5'
<b>TP6</b>	5'-Oligo 26- Oligo 27- Oligo 3- Oligo 23-3' 3'-Oligo 28- Oligo 29- Oligo 30-5'
<b>TP7</b>	5'-Oligo 26- Oligo 27- Oligo 23- Oligo 3-3' 3'-Oligo 28- Oligo 33- Oligo 32-5'
<b>vTP</b>	5'-Oligo 10 -3' 3'-Oligo 11 -5'

**Tabelle 4. Oligonukleotide für TP bis TP7 und vTP**

<b>Sequenzierungsprimer für pVP22 bzw. pvTP</b>
5'- GTG GTG CAG GAC GTC GAC -3'
<b>Sequenzierungsprimer für pHO2c (TP bis TP7)</b>
5'- GTC CGG CGT AGA GGA TCG -3'

<b>Primer</b> (vTP bzw. VP22 sollen in pHO2c insertiert werden, weshalb die Schnittstellen angepasst werden.)
Primer Calumet (Forward): 5'- GAC CAG CAT ATG ACC TCT CG -3'
Primer Temulac (Reverse): 5'- GAC TTA AAG CTT TCA ATG GTG ATG -3'

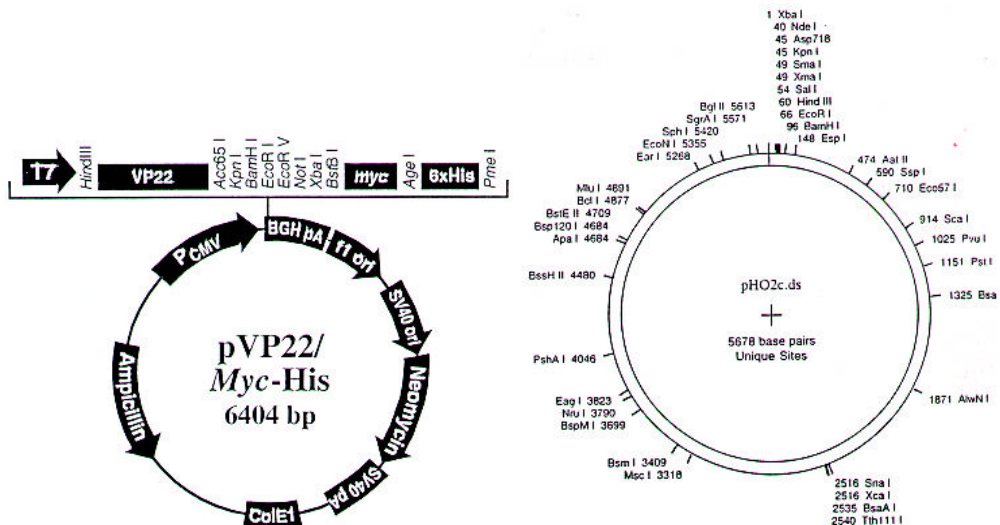
## Vektoren

Vektor (siehe Abb. 28)	Art des Vektors	Referenz/ Bezugsquelle
pVP22	Expressionsvektor für Mammalian-zellen	Invitrogen
pHO2c	Expressionsvektor für <i>E.coli</i>	Otto H., AG Prof. Hucho, FU Berlin [Fasshauer et al., 1997]

## Bakterienstämme

DH5 $\alpha$ -*E.coli*-Zelllinie von Henning Otto, AG Prof. Hucho, FU Berlin

BL21 (DE3)-*E.coli*-Zellen von AG Prof. Schweiger, FU Berlin



**Abbildung 28.** Die Vektorkarten von pVP22 (links) und von pHO2c (rechts). pVP22 kodiert für VP22 (911-1813bp). Weiterhin enthält es z.B. die CMV Promotersequenz, die T7 Promotersequenz (nur zum Sequenzieren), die *Multiple cloning site* (1814-1909bp), das myc-Epitop (1907-1936bp), ein His-6-tag (1952-1969bp) und das Ampicillin Resistenzgen. pHO2c enthält neben der T7 Promotersequenz (zum Sequenzieren und Exprimieren) die *Multiple cloning site* (40-96bp), ein His-6-tag (73-90bp) und das Ampicillin Resistenzgen.

### Zelllinien

NIH 3T3, Mäuse-Fibroblasten-Zelllinie, (DSMZ Braunschweig)

Neuro-2a (N2a), Mäuse-Neuroblastoma-Zelllinie, (AG Prof. Reutter, FU Berlin)

U937, *histiocytic lymphoma*-Zelllinie, human (DSMZ Braunschweig)

CHO-Zellen, *chinese hamster ovary*- Zelllinie (DSMZ Braunschweig)

### Chemikalien

Chemikalien sind, wenn im Text nicht anders angegeben, von Merck Eurolab GmbH, Berlin, von Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe oder von Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen.

### Marker

1 kb DNA Ladder (1 µg/µl) von GibcoBRL;

Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE (*High Molecular Weight Standard Mixture*) für 30-200kDa von SIGMA Chemie GmbH;

SDS Molekulargewichtsmarker für 2500 - 17000 Da von SIGMA Chemie GmbH

## **Medien**

DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) von Cytogen für 3T3- bzw. CHO-Zelllinie;

Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (ohne Natriumpyruvat) von Invitrogen für N2a-Zelllinie;

RPMI von Invitrogen für U937-Zelllinie

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium);

LB-Medium für Agar-Platten und

TB-Medium (Terrific Broth) für Bakterienkultur nach Sambrook et al., 1989

## **Restriktionsenzyme**

BamH I (20 000 U/ml),

BssH II (4 000 U/ml),

Hind III (20 000 U/ml),

Pst I (100 000 U/ml),

Xho I (20 000 U/ml)

Not I (10 000 U/ml) und

Nde I (10 000 U/ml) von NEBioLabs

## 5.2 Methoden

### *Molekularbiologische Methoden*

#### **Anzucht von Bakterien**

Für Übernachtskulturen wurden Einzelkolonien von den entsprechenden LB-Agar-Platten entnommen und in 5ml Medium bei 37°C unter starker Bewegung angezogen. Bei plasmidenthaltenden Bakterien wurden die dem Resistenzgen entsprechenden Antibiotika zugegeben.

#### **Wachstum einer Standard-Expressionskultur**

Durch Zugabe von IPTG wird in den BL21(DE3)-*E.coli*-Zellen die T7 RNA Polymerase exprimiert, die wiederum für die Expression von vTP bzw. VP22 verantwortlich ist.

Die Standard- Expressionskultur wurde einmal in einem kleineren Maßstab zur Bestimmung der Löslichkeit des Zielproteins und ein anderes Mal in einem größeren Umfang zur Präparation des Proteins durchgeführt.

1. Von der Agarplatte wird eine Kolonie gepickt und in einer Übernachtskultur in TB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin angezüchtet.
2. Von dieser Übernachtskultur werden 2,5ml bzw. 5ml in 50ml bzw. in 100ml vorgewärmtes TB-Medium mit 100µg/ml Antibiotika gegeben.
3. Die Zellen werden bei 37°C kräftig im Schüttelinkubator (~ 300rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,7 wachsen gelassen (etwa nach 30 – 60 min).
4. Die Expression wird durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1mM induziert. Zusätzlich werden noch 100µg/ml Ampicillin und Pefabloc mit einer Endkonzentration von 1mM dazugegeben.
5. Die Kultur wird für weitere 4h bei 37°C in den Schüttelinkubator gestellt.
6. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000xg für 20min geerntet. Das Pellet kann bei -20°C eingefroren werden.

Um den Erfolg der Expression zu überprüfen, werden vor und jede Stunde nach der Induktion ein Aliquot abgenommen, die mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese und des Western Blots analysiert werden.

#### **Phosphorylierung der Oligonukleotide**

Die synthetisierten Oligonukleotide werden phosphoryliert, um die Ligation effektiver zu gestalten.

1. Die Oligonukleotidlösungen werden jeweils auf 1,25pmol/µl mit destilliertem Wasser eingestellt.
2. Zu je 80µl Oligonukleotidlösung werden je 5U T4 Polynukleotidkinase und je 10µl T4 DNA Ligase- Puffer (10x konzentriert, mit 10mM ATP) gegeben und mit destilliertem Wasser auf 100µl aufgefüllt.

3. Die Inkubation wird für 30min bei 37°C im Brutschrank durchgeführt.
4. Anschließend wird der Ansatz für 10min auf 70°C erhitzt, um die Kinase zu inaktivieren.

## Hybridisierung

Die phosphorylierten Oligonukleotide werden miteinander hybridisiert.

1. Je 10µl der phosphorylierten Oligonukleotide (1,25pmol/µl) werden zusammen in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert.
2. Die Nukleotide werden im Mini Cycler miteinander hybridisiert: für 1min bei 92°C, dann alle 10s -0,1°C bis eine Temperatur von 20°C erreicht wird.
3. Für kurze Zeit können sie dann bei 4°C aufbewahrt werden.
4. Die phosphorylierten, hybridisierten Nukleotide werden mit destilliertem Wasser auf 1pmol/µl, 0,1pmol/µl und 0,05pmol/µl verdünnt.

## PCR

pVTP und pVP22 werden mit Hilfe der PCR so verändert, dass die DNA, die für vTP und VP22 kodiert, in pHO2c eingefügt werden kann, um vTP bzw. VP22 in BL21(DE3)-*E.coli*-Zellen exprimieren zu können. Die PCR wird mit dem „Q-Solution PCR Kitsystem“ (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

1. PCR-Ansatz wird pipettiert: je 5µl 10xReaktionspuffer, 10µl Q-Solution, 2,5µl dNTPs, 5µl Primer forward (1:10 verdünnt), 5µl Primer revers (1:10 verdünnt), 1µl Taq-Polymerase, 0,2µl, 0,5µl bzw. 1µl template DNA, mit H<sub>2</sub>O wird auf 50µl aufgefüllt
2. PCR-Programm wird gestartet: 2min 94°C; 25mal: (30s 94°C, 1min 60°C, 1,5min 72°C); 15min 72°C
3. Proben werden bei 4°C aufbewahrt.

## Ligation

Die zu insertierende DNA wird in den Vektor pVP22 bzw. pHO2c ligiert. Dazu wird der Ligationskit von Boehringer Mannheim benutzt.

1. Zu 1µl 1pmol/µl, 0,1pmol/µl bzw. 0,05pmol/µl Insert werden je 2µl DNA Verdünnungspuffer (*DNA dilution buffer*), je 1µl linearisierter Vektor pipettiert und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10µl gebracht.
2. Anschließend wird je 10µl T4 DNA Ligationspuffer (*T4 DNA ligation buffer*, 2x konzentriert) dazugegeben und gründlich gemischt.
3. Dann wird je 1µl T4 DNA Ligase (5000U/ml) dazupipettiert und wieder gründlich gemischt.
4. Es folgt zunächst eine Inkubation von 5min bei RT und anschließend über Nacht bei 15°C.

## Transformation

Die Ligationsansätze werden zum Klonieren in DH5 $\alpha$ - *E.coli*-Zellen und zum Exprimieren in BL21(DE3)-*E.coli* Zellen transformiert.

1. In 1,5-ml-Reaktionsgefäße werden zum einen zur Kontrolle nur 90 $\mu$ l kompetente Bakterienzellen und zum anderen je 90 $\mu$ l Bakterienzellen mit 5 $\mu$ l Ligationsansatz pipettiert.
2. Diese Ansätze werden für 30min auf Eis und dann für 1min bei 42°C in den Heizblock gestellt. Nach diesem Hitzeschock werden die Proben wieder für 1-2min mit Eis gekühlt.
3. Es wird je 1ml LB<sup>-</sup> -Medium dazugegeben.
4. Es folgt eine Inkubation von 55min bei 37°C im Brutschrank.
5. 150 $\mu$ l und die restlichen 850 $\mu$ l der transformierten Proben werden auf LB-Agar-Platten, die 100 $\mu$ g/ml Ampicillin enthalten, ausplattiert und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

Am nächsten Tag lässt sich der Erfolg der vorangegangenen Versuche an der Anzahl der Kolonien auf den Agar-Platten erkennen.

## Isolierung von Plasmid-DNA

Die **Mini-Präparation** wird zur Isolierung kleiner DNA-Plasmidmengen (bis ca. 20 $\mu$ g) für analytische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wird der QIAprep-Spin-Plasmid-Kit von QIAGEN verwendet.

Die **Maxi-Präparation** dient zur präparativen Isolierung von Plasmid-DNA (bis ca. 1mg). Es wird dazu das Endotoxin-freie EndoFree Plasmid-Kit-System von QIAGEN benutzt.

Die Durchführung der Mini- bzw. Maxi-Präparation erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

## Restriktionsverdau

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen kann DNA geschnitten werden, um entweder das entsprechende Insert einsetzen zu können oder um den Erfolg der Hybridisierung, Ligation und Transformation zu überprüfen.

1. Zu dem entsprechenden Puffer (10x konzentriert) werden 3 $\mu$ g Vektor, 0,5 $\mu$ l - 1 $\mu$ l der entsprechenden Restriktionsenzyme (pVP22: BamH1, Not I; pHO2c: Nde I, Hind III; Kontrollverdau: Xho I und Pst I (bei TP bis TP4); BssH II) pipettiert und mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 30 $\mu$ l gebracht.
2. Es folgt eine Inkubation von 1 - 2h bei 37°C (bei BssH II 2 - 4h bei 50°C).
3. Die Reaktion wird mit 5x Blue Run gestoppt.
4. Der Erfolg des Restriktionsverdaus wird mit Hilfe eines 0,8%igen Agarosegels überprüft.

### **Agarose-Gelelektrophorese [Sambrock et al., 1989]**

Agarose-Gelelektrophoresen dienen vor allem der Trennung von hochmolekularen Nucleinsäuren für analytische und präparative Zwecke. Zur Trennung von PCR- bzw. Restriktionsprodukten wurden Gele mit einem Agarosegehalt von 0,8-1% in TAE-Puffer verwendet, die 0,5µg/ml Ethidiumbromid enthielten.

### **Isolierung der Plasmid-DNA aus dem Agarosegel**

Um die aufgetrennte Plasmid-DNA aus dem Agarosegel zu isolieren, werden die Puffer und Säulen des E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit-Systems von PeqLab verwendet. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

### **Sequenzierung**

Die Plasmid-DNA wird sequenziert, um zu überprüfen, ob das Insert vollständig in das Plasmid eingebaut wurde. Dazu wird ABI PRISM Big Dye Ready Reaction Terminator v 2 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems) verwendet.

1. Zu 200ng DNA werden 2µl 1,6µM Sequenzierungsprimer und 3µl des „ready mix“ pipettiert, so dass das Endvolumen 10µl beträgt.
2. Nach vorsichtigem Mischen wird der Ansatz in einen Mini-Cycler gegeben, wo folgendes PCR-Programm abläuft:  
10s bei 4°C;  
24 Mal: (+1°C/s bis auf 96°C, 30s bei 96°C, -1°C/s bis auf 50°C, 15s bei 50°C, +1°C/s bis auf 60°C, 4min bei 60 °C)
3. -1°C/s bis auf 4°C, aufbewahren bei 4°C.

Die Sequenzierung wird per Automat von der Firma GATC-Biotech AG, Konstanz durchgeführt.

## ***Proteinchemische Methoden***

### **Bestimmung der Zielprotein-Löslichkeit**

Diese Methode dient zur Bestimmung der Löslichkeit der in den Bakterienzellen exprimierten Proteine und wird wie in der Anleitung „The QIAexpressionist<sup>™</sup>“ von QIAGEN durchgeführt. Dabei wird das Zellysate in einen Überstand, der die löslichen Proteine beinhaltet, und in ein Pellet, der die unlöslichen Proteine enthält, aufgetrennt.



## Extraktion

Durch die Extraktion lässt sich herausfinden, mit welchem Reagens die im Pellet befindlichen unlöslichen Proteine in Lösung gebracht werden können. Sie wird zum einen mit Tween 20/ EGTA, Harnstoff und zum anderen mit Guanidin-Hydrochlorid durchgeführt.

1. Zu je 1ml Rohextrakt (Proteinpellet in Lysispuffer) werden 0,25% Tween 20/ 0,1mM EGTA, 8M Harnstoff bzw. 6M Guanidin-Hydrochlorid pipettiert.
2. Es folgt eine Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur.
3. Der Ansatz wird dann für 10 min bei 13000rpm und bei 4°C zentrifugiert.

Das Protein sollte sich nun im Überstand befinden. Dazu wird sowohl das Pellet als auch der Überstand mit Hilfe einer SDS-PAGE getestet.

## Präparation von klarem Lysat unter denaturierenden Bedingungen

Um das exprimierte Protein in quantitativen Maßstab zu isolieren, wird zunächst aus den Bakterienzellen ein klares Lysat hergestellt. Da vTP bzw. VP22 ein His-6-tag enthalten, werden sie über eine Nickel-Säule aufgereinigt. Die Durchführung erfolgt wie im Heft „The QIAexpressionist™“ von QIAGEN beschrieben.

## Proteinexpression in CHO-, NIH 3T3-Zellen

pVTP und pVP22 enthalten den CMV-Promotor, wodurch sie in Säugetier-Zelllinien exprimiert werden können. vTP bzw. VP22 sollen in CHO- bzw. NIH 3T3-Zellen exprimiert und anschließend präparativ isoliert werden. Zuerst werden die Zellen ausgesät, am nächsten Tag mit pVTP bzw. pVP22 transfiziert und 2 Tage nach der Transfektion isoliert.

Zellen aussäen: Es werden CHO- bzw. NIH 3T3-Zellen in 20 175cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen ausgesät.

Transfektion: Siehe auch Abschnitt „Zellkultur“;

Es werden 20 µg DNA pro 175cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit Superfect (Verhältnis: 1µg DNA : 6µl Superfect; QIAGEN) und Medium (Verhältnis: 1µg DNA : 60µl Medium, ohne FCS) transfiziert. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben von QIAGEN.

Zellen ernten und exprimiertes Protein isolieren:

1. 2 Tage nach der Transfektion wird das Medium von den Schalen abgesaugt und die Zellen 2x mit je 20ml PBS gewaschen.
2. Mit je 5ml Lysispuffer (1% Triton, 20mM Hepes, ½ Tablette complete (minis), EDTA free (Protease Inhibitor Cocktail; Roche)) werden die Zellen abgeschabt und in ein 50ml-Falcon-Röhrchen überführt.
3. Dieser Ansatz wird für 15min bei 4°C gerührt.
4. Das Lysat wird bei 15000rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet und ein 500µl Aliquot des Überstandes werden für spätere Kontrollen aufgehoben.

5. Zu dem Überstand werden NaCl (Endkonzentration 300mM) und 250µl Ni-NTA gegeben und für 1h bei 4°C gerührt.
6. Der Ansatz wird für 2min bei 300xg zentrifugiert. Der Überstand wird für spätere Tests aufgehoben.

Alle weiteren Schritte werden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

7. Die Ansätze werden in eine Säule gegeben und 3x mit je 10ml Waschpuffer (50mM Phosphatpuffer pH 8,0, 300mM NaCl, 8mM Imidazol) gewaschen.
8. Die Säule wird anschließend mit Elutionspuffer (500mM Phosphatpuffer pH 8,0, 300mM NaCl, mM Imidazol) eluiert: a) 20mM Imidazol: 1x 1ml, b) 40mM Imidazol: 1x 1ml, c) 80mM Imidazol: 2x 0,5ml, d) 120mM Imidazol: 2x 0,5ml, e) 400mM Imidazol: 2x 0,5ml.

Die Eluate werden zum Aufbewahren bei -20°C eingefroren.

### **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Proteine wurden durch die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli et al., [1970] aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde mit Sammelgelen von 3% Acrylamid und Trenngelen von 10% Acrylamid (mit jeweils 2,6% Bisacrylamid) in der Mini-Protean II-Kammer (BioRad) in einer Dimension von 80x55x1,5mm (Trenngel) durchgeführt. Die Gele wurden anschließend mit Coomassie gefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

Sammelgel (3%): 2,5ml Sammelgelpuffer (500mM Tris/ HCl, pH 6,8), 1ml Acrylamid (30%)/ Bisacrylamid (0,8%), 6,5ml H<sub>2</sub>O, 100µl SDS (10%), 40µl APS, 10µl Temed

Trenngel (10%): 5ml Trenngelpuffer (1,5M Tris/ HCl, pH 8,8), 6,7ml Acrylamid (30%)/ Bisacrylamid (0,8%), 8,3ml H<sub>2</sub>O, 200µl SDS (10%), 100µl APS, 10µl Temed

Probenpuffer: 62,5mM Tris/ HCl, pH 6,8, 2% SDS, 10% Saccharose, 5% β-Mercaptoethanol, 3% Bromphenolblaulösung (gesättigt)

Elektrodenpuffer: 25mM Tris, pH 8,8, 192mM Glycin, 0,1% SDS

### **Tricin- Gelelektrophorese** [Schägger und Jagow, 1987]

Die TP-Fusionspeptide besitzen ein Molekulargewicht um 6,2k Da. So kleine Proteine werden am besten durch eine Tricin-Gelelektrophorese getrennt. Diese Methode erlaubt eine Auftrennung kleiner Proteine bei einer niedrigeren Acrylamid-Konzentration als in Glycin-SDS-PAGE-Systemen und ist besonders im Bereich zwischen 5 und 20 kDa erfolgreich.

#### **Gelelektrophorese:**

- Acrylamid-Stammlösung: 48% Acrylamid, 1,5% Bisacrylamid in destilliertem Wasser
- Glycerin-Stammlösung: 33% Glycerin in destilliertem Wasser
- Gelpuffer: 3M Tris/ HCl, 0,3% SDS, pH 8,45
- Anodenpuffer: 0,2M Tris/ HCl, pH 8,9
- Kathodenpuffer: 0,1M Tris, 0,1M Tricin, 0,1% SDS, pH 8,25

	<b>Trenngel</b> (16% T, 3,125% C)	<b>Spacergel</b> (9,6% T, 3,125% C)	<b>Sammelgel</b> (4% T, 3,125% C)
<b>Acrylamid-Stammlösung</b>	10ml = 16%	2ml = 9,6%	0,8ml = 3,84%
<b>Gelpuffer</b>	10ml = 1M Tris/ HCl, 0,1% SDS, pH 8,45	3,3ml = 1M Tris/ HCl, 0,1% SDS, pH 8,45	2,5ml = 750mM Tris/ HCl, 0,075% SDS, pH 8,45
<b>Glyzerin-Stammlösung</b>	9,92ml = 10,9%	-	-
<b>destilliertes Wasser</b>	-	4,67ml	6,65ml
<b>10% APS</b>	80µl	25µl	50µl
<b>TEMED</b>	8µl	4µl	7µl

Die Lösungen von Trenngel und Spacergel werden übereinander geschichtet und polymerisieren gemeinsam. Die Trenngel-Lösung enthält Glycerin und ist dadurch schwerer, so dass ein Ineinanderfließen verhindert wird. Es entsteht eine "weiche" Stufe.

Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 30 V über Nacht durchgeführt.

#### **Färbung des Gels:**

- Fixierlösung: 50% v/v Methanol, 10% v/v Essigsäure
- Färbelösung: 10% v/v Essigsäure, 0,025% m/v Serva Blue G
- Entfärbelösung: 10% v/v Essigsäure
  1. Das Gel wird für 1 h fixiert,
  2. für 2 h gefärbt und
  3. für 2 - 4 h entfärbt.
  4. Anschließend kann das Gel bis zum Einscannen und/ oder bis zum Trocknen in destilliertem Wasser aufbewahrt werden.

#### **Western Blot**

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen wurde mit Hilfe des Western Blots nach dem „*Semi-dry*“-Prinzip durchgeführt.

- Filterpapier: Blotting-Papiere GB 002 (Schleicher& Schüll)
- Nitrocellulose-Membran: Hybond (Amersham)
- Blotting-Puffer: 20% Methanol, 48mM Tris, 39mM Glycin, pH 7,4, 0,037% SDS
- Ponceau S-Lösung: 0,2% Ponceau S in 3% Essigsäure
  1. Einige Minuten vor Ende der Gelelektrophorese werden die Filterpapiere in Blotting-Puffer und die Blotfolie in H<sub>2</sub>O eingeweicht.
  2. Nach Beendigung der Elektrophorese wird ein *Sandwich* gebaut: Anode - 3 Filterpapiere - Membran – Gel - 3 Filterpapiere - Kathode.
  3. Der Transfer erfolgt bei einer Stromstärke von  $I = 1 \text{ mA/cm}^2$  und einer Dauer von 1½h.
  4. Nach dem Transfer wird die Blotmembran für 10 min mit Ponceau S gefärbt und anschließend mit H<sub>2</sub>O entfärbt, bis die Banden gut sichtbar sind. Die Banden der Markerproteine werden mit Kugelschreiber dünn, aber sichtbar markiert.

### **Antikörpernachweis:**

- TBS-T: 20mM Tris/ HCl, pH 7,4, 137mM NaCl, 0,05% Tween 20
- TBS: 20mM Tris/ HCl, pH 7,4, 137mM NaCl
  1. Blockieren: Zu der Blotmembran werden für 1h 20ml 5%iges Magermilchpulver in TBS-T gegeben.
  2. Antikörper: penta His-Antikörper Maus IgG1 (BSA frei, 0,2mg/ml) von QIAGEN  
10µl Antikörper werden für 1h in 20ml 5%iges Magermilchpulver in TBS-T auf den Blot gegeben.
  3. Waschen: Die Magermilchlösung wird verworfen und die Membran 3x 10min mit TBS-T gewaschen.
  4. Antikörper: Anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase vom Schaf, 1:2500 verdünnt, von Amersham Life Science  
8µl Antikörper werden für 1h in 20ml 5%iges Magermilchpulver in TBS-T auf den Blot gegeben.
  5. Waschen: Die Magermilchlösung wird verworfen und die Membran 3x 10 min mit TBS-T und 1x 10 min mit TBS gewaschen.
  6. Der Antikörpernachweis erfolgt mit Hilfe des ECL *Western blotting detection reagents* von Amersham Pharmacia Biotech.

### **Dialyse von Eluaten**

Dieses physikalische Verfahren wird zur Trennung von gelösten Stoffen (Salze des Puffers) von Proteinen aus gemeinsamer Lösung mittels einer halbdurchlässigen Membran verwendet. Zur Dialyse wurden von Perbio Science Deutschland GmbH die *Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> Dialysis* Kassetten (0,5-3ml Volumen) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### **Gelfiltration**

Zur Entfernung von Agenzien wie Harnstoff oder Phosphat aus den Eluatfraktionen wurde die chromatographische Methode der Gelfiltration eingesetzt.

1. 1ml Probe wurde auf eine Sephadex G50-Säule aufgetragen, die zuvor mit dem verwendeten Laufpuffer (H<sub>2</sub>O oder 20mM TEA) äquilibriert wurde.
2. Mit Hilfe einer Pumpe wurde die Durchflussgeschwindigkeit auf 1ml/ min eingestellt.
3. Das Eluat der Säule passierte einen Leitfähigkeitsmesser und ein Spektrophotometer, das die Absorption bei 280nm bestimmte. Beide Parameter wurden durch daran gekoppelte Schreiber dokumentiert.
4. Ab dem ersten Anstieg der Absorption bei 280nm wurden Fraktionen zu je 1ml gesammelt.

## Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Konzentration der Eluate zu bestimmen, wird die Methode nach Bradford angewendet.

1. Eine BSA-Eichreihe (0 bis 3µg) bzw. verschiedene Verdünnungen der Probe werden mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 100µl gebracht.
2. Zu diesen Ansätzen werden je 100µl Bradford-Reagens pipettiert.
3. Nach gründlichem Mischen werden die Extinktionen der einzelnen Ansätze nach 5 bis spätestens 60min photometrisch bei 570nm gemessen.

Anhand der graphischen Darstellung der Extinktionswerte der BSA-Eichreihe gegen die Masse können die Konzentrationen der Proben bestimmt werden.

## Bestimmung des Molekulargewichtes mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie

1. Zu 20 pmol der bis zur Trockne lyophilisierten Probe wurden 100 µl eines 1:2-Gemisches von Acetonitril und 0,1% TFA pipettiert.
2. Es wurde davon 1 µl abgenommen und mit 1 µl Matrixlösung (gesättigte 4-Hydroxy- $\alpha$ -Cyanozimtsäure in Acetonitril-0,1% TFA im Verhältnis 1:2) versetzt.
3. Davon wurden 0,7 µl aufgetragen und gemessen.

Die MALDI-Massenspektrometrie wurde von Peter Franke, AG Prof. Hucho, durchgeführt.

## PKC-Aktivitätstest

Der PKC-Aktivitätstest dient der Untersuchung, zu wieviel Prozent TP die PKC *in vitro* hemmen kann.

- 5xATP/[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP: 20µM ATP, 0,1µCi/ pro assay [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP von NEN Life Science Products
- 5xReaktionsmix: 100 mM Triethanolamin, pH 8,0, 20 mM Magnesiumacetat, 0,5 mM Calciumchlorid, 250 mM Mercaptoethanol, 50 µM Peptidsubstrat
- 5xSuspension der Lipide PS/DG:  
250 µg/ml L- $\alpha$ -Phosphatidyl-L-serin in 80% Chloroform/ 20% Methanol und  
25 µg/ml 1,2-Dioleoyl-sn-Glycerol (C18:1,[cis]-9) in 80% Chloroform/ 20% Methanol werden in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gegeben. Nachdem die Lipide gemischt wurden, wird das organische Lösungsmittelgemisch unter einem sanften Luftstrom abgedampft. Die Lipide werden in der entsprechenden Menge Wasser durch Vortexen und Ultraschallbehandlung resuspendiert.

Ansatz	ATP	PKC	TP	„Pseudosubstrat“ (PsS)
5xReaktionmix	-	10µl	10µl	10µl
Inhibitor (TP oder PsS)	-	-	0,1 - 50µM TP	0,1 - 50µM PsS
GST-PKC	-	0,3µg	0,3µg	0,3µg
H <sub>2</sub> O	-	ad 40µl	ad 40µl	ad 40µl
ATP/[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	10µl	10µl	10µl	10µl

1. Die Ansätze werden bis zur Zugabe von ATP auf Eis gehalten.
2. Die Reaktion wird mit ATP gestartet.
3. Die Inkubation erfolgt für 2 - 5 min bei 30°C.
4. Die Reaktion wird durch je 40 µl des Reaktionsansatzes auf je einen P81 Ionenaustauschfilter gestoppt.
5. Der Filter wird 3x mit 0,5% Phosphorsäure gewaschen. (Ausnahme: der ATP-Ansatz; dieser kommt ungewaschen in ein Szintillationsröhrchen.
6. Die Radioaktivität wird durch Messung der Cerenkov-Strahlung in Wasser im Szintillationsgerät bestimmt.

## **Zellbiologische Methoden**

### **Passagieren der eukaryontischen Zellen**

NIH 3T3- und CHO-Zellen werden in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*; Cytogen), Neuro2a-Zellen in Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (ohne Natriumpyruvat; Invitrogen) und U937-Zellen in RPMI bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Medien enthalten 10% Fötale Kälberserum (FCS; Invitrogen) sowie 100U/ml Penicillin (Invitrogen) und 100µg/ml Streptomycin (Invitrogen).

### **Transfektion**

Mit Hilfe der Transfektion wird die Plasmid-DNA in die Zellen aufgenommen, aber nicht in das Wirtsgenom eingebaut. Um die Translokation von vTP bzw. VP22 zu bestimmen, werden die Zellen einen Tag nach der Transfektion geerntet. Um die Zellzahl/mm<sup>2</sup> zu bestimmen, werden die Zellen nach ein bis vier Tagen nach der Transfektion geerntet. Die Transfektion wird nach den Angaben von QIAGEN durchgeführt.

1. 1,5x10<sup>5</sup> NIH 3T3-, Neuro2a- und U937-Zellen werden auf Deckgläschen in 24-well-Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ausgesät und transient mit 0,75µg pvTP bzw. pVP22 transfiziert.
2. Dazu werden Superfect (QIAGEN) in einem Verhältnis von 1µg DNA zu 5µl Superfect und das entsprechende Medium ohne FCS in einem Verhältnis von 1µg DNA zu 50µl Medium verwendet.

### **Immunzytochemie**

vTP bzw. VP22 besitzen ein myc-tag, wodurch sie mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden können. Außerdem werden die Zellkerne noch mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenolindol2HCl) gefärbt, um die Zellkern-Translokation besser nachzuvollziehen.

1. Zellen werden für 15min mit 3% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und für 10min mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert.
2. Nach Waschen mit PBS werden die Zellen für 30min mit BSA (*bovine serum albumin*) blockiert und für 1h bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen anti-myc Antikörper (H.Otto, AG Prof. Hucho, FU Berlin) inkubiert.
3. Die Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und für 1h mit dem Cy-3-konjugierten anti-Maus IgG Antikörper (dianova) inkubiert.
4. Nach dreimaligen Waschen mit PBS werden die Zellen für eine kurze Zeit (<5min) mit 0,04% DAPI gefärbt.
5. Das Deckgläschen wird mit den Zellen nach unten auf einen kleinen Tropfen Fluoromount-G gelegt, der sich auf einem Objektträger befindet.

### **Mikroskopie**

Die Deckgläschen mit den immunfluoreszenzgefärbten Zellen werden mit Hilfe eines konventionellen Fluoreszenz-Mikroskops (Leica DM IRB) mit digitaler Kamera zur Aufnahme der Bilder und mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops betrachtet, das eine Zerlegung der subnukleären Kompartimente ermöglicht. Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop Leica TCS 4D ist an ein Leica RBE Mikroskop gekoppelt.

### **Bestimmung der Zellzahl nach der Transfektion**

Ein, zwei, drei und vier Tage nach der Transfektion und Immunzytochemie werden die Zellen gezählt. Zu diesem Zweck werden je 10 Ausschnitte pro Deckgläschen zufällig ausgesucht und mit einer Digitalkamera, die an das Mikroskop gekoppelt ist, aufgenommen. Die Zellzahl/  $\text{mm}^2$  der verschiedenen Proben werden verglichen und statistisch ausgewertet. Da die Zellzahl nicht normalverteilt ist, wird zur Auswertung nicht der Student's t-test, sondern der Mann-Whitney und der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Diese beiden Tests sind nicht-parametrisch (verteilungsfrei) und werden benutzt, um zwei unabhängige bzw. drei und mehr unabhängige Gruppen von Probanden zu vergleichen.

## **Apoptose**

### ***Cell Death Detection ELISA***

1x10<sup>5</sup> NIH 3T3-Zellen werden in 6well-Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ausgesät und transient mit verschiedenen Mengen an pvTP bzw. pVP22 und Superfect (*mock control*) transfiziert. Ein Tag nach der Transfektion werden die Zellen geerntet und für den *Cell Death Detection ELISA* (Roche Diagnostics GmbH) vorbereitet. Dieser Test misst die während der Apoptose im Cytoplasma angereicherten Histon-assoziierten DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen). Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Der nicht-parametrische Wilcoxon-Test wird für die statistische Auswertung verwendet.