

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 PCR

Zur Generierung von Hint1-, Hint2- und Hint3-Plasmiden, die zur Expression der Proteine in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen verwendet werden sollten, wurde die jeweilige cDNA mit Hilfe der Pwo-DNA-Polymerase amplifiziert.

Reaktionsansatz:	Template-DNA (1 µg/µl)	0,5 µl
	Pwo-Polymerase	0,25 µl
	PCR-Puffer 10x	5 µl
	dNTPs (je 2 mM)	5 µl
	Primer (je 10 pmol/µl)	2 µl
	dd H <sub>2</sub> O (steril)	ad 50 µl

Als Template-DNA wurden die unter 2.3.2 beschriebenen Plasmide verwendet. Die zur Amplifikation verwendeten Primer sind in der Tabelle 3.1 zusammengestellt. Die PCR wurde mit Hilfe des Gene Amp PCR-System 2400 mit folgendem Programm durchgeführt.

4 °C	2 min	} 35 Zyklen
94 °C	15 sec	
65 °C	30 sec	
72 °C	45 sec	
72 °C	3 min	
15 °C	∞	

Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgte mit dem Montage<sup>®</sup> PCR Kit nach Angaben des Herstellers.

Protein	Primerpaar forward, reverse	Konstrukt(e)
Hint2	1, 2	pGEX4T1-Hint2, pMALstop-Hint2, pcDNA3-NCFP-Hint2, pcDNA3-NYFP-Hint2
Hint2	9, 2	pMAL-Hint2 C-Term AA 92-160
Hint2	1, 7	pMAL-Hint2 DKN1 AA 1-54
Hint2	7, 8	pMAL-Hint2 DKN2 AA 47-99
Hint2	3, 2	pQE30-Hint2
Hint2	4, 2	pCMV4-FLAG-Hint2, pCS2+ myc <sub>6</sub> -Hint2
Hint2	1, 5	pCMV4-Hint2-FLAG, pcDNA3-Hint2-YFP
Hint3	18, 19	pCS2+myc <sub>6</sub> -Hint3
Hint3	18, 21	pcDNA3-Hint3-YFP
Hint3	20, 22	pcDNA3-NYFP-Hint3

**Tabelle 3.1: Primer für die Pwo-PCR**

### 3.1.2 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Zur sequenzspezifischen Spaltung nach Aufreinigung der amplifizierten cDNA wurden Restriktionsendonucleasen eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde gemäß den Herstellerangaben zusammenpipettiert und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Trennung der DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Herstellung von Agarosegelen erfolgte mit folgenden Puffern.

TBE-Puffer (analytische Gele):	90 mM Tris/HCl, pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TAE-Puffer (präparative Gele):	40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,5 2 mM EDTA

Je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8 - 1,2 % (w/v) Agarose in 50 ml der Puffer unter Erwärmen gelöst und nach Abkühlen der Lösung und Zugabe von 0,01 % (w/v) Ethidiumbromid in eine Elektrophoresekammer ausgegossen. Nachdem das

Gel vollständig auspolymerisiert war, wurde die zu analysierende DNA-Lösung mit folgendem Ladepuffer versetzt.

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

Nach dem Auftragen der Proben und einer als Größenstandard dienenden 1 kb-Basenleiter erfolgte die Elektrophorese mit einer Spannung von 80 V, zur Dokumentation wurden die Gele mit einem Videosystem aufgenommen.

### **3.1.4 Isolation von DNA aus Agarosegelen**

Die zur weiteren Verwendung vorgesehenen DNA-Fragmente wurden nach der Elektrophorese aus den Gelen ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit extrahiert. Die vom Hersteller mitgelieferten Puffer mit hohen und niedrigen Salzkonzentrationen wurden gemäß der Gebrauchsanweisung eingesetzt.

### **3.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Handelte es sich bei der extrahierten DNA um Plasmid-DNA, so wurde diese unmittelbar nach der Gelextraktion mit der alkalischen Phosphatase CIP dephosphoryliert. Die Behandlung erfolgte für 30 min bei 37 °C. Danach wurde das Enzym von der Nukleinsäurelösung mit Hilfe der Ultrafree<sup>®</sup>-MC Zentrifugationsfilter gemäß den Herstellerangaben abgetrennt.

### **3.1.6 Ligation von cDNA in Vektoren**

Die Ligation der spezifisch vorbehandelten cDNA in die entsprechend angepassten Expressionsvektoren wurde mit der Quick T4-DNA-Ligase durchgeführt. Zur Erhöhung der Ligationsausbeute erfolgte der Einsatz von Insert-cDNA und Vektor-DNA in einem

Verhältnis von ca. 3:1. Zur Kontrolle des vorangegangenen Isolations- und Aufreinigungsprozesses wurden vor der Ligation gleiche Volumina cDNA und Plasmid auf einem Agarosegel anhand der Bandenintensität analysiert.

Reaktionsansatz:	Insert-cDNA	ca. 600 ng
	Vektor-DNA	ca. 200 ng
	Ligase-Puffer (5x)	5 µl
	Quick T4-DNA Ligase	0,5 µl
	dd H <sub>2</sub> O (steril)	ad 10 µl

Die Ligationsreaktion erfolgte durch Inkubation bei 20 °C für 20 min, unmittelbar darauf wurde eine Transformation in *E. coli*-Bakterien vorgenommen (3.1.7).

### 3.1.7 Transformation

Die Transformation in kompetente *E. coli*-Bakterien wurde nach der von Hanahan 1983 beschriebenen Hitzeschock-Methode durchgeführt [Hanahan et al., 1983]. Die folgende Tabelle (3.2) fasst zusammen, welche Expressionsplasmide, Bakterienstämme, Fusionsproteine und selektionierende Resistenzen verwendet wurden.

Plasmid	Bakterienstamm	Fusionsprotein	Resistenz
pGEX-4T1	<i>E. coli</i> BL21 RE4	GST	Ampicillin + Kanamycin
pMal-p2s	<i>E. coli</i> XL-1, <i>E. coli</i> BL21 DE3	MBP	Ampicillin
pQE30	<i>E. coli</i> XL-1 <i>E. coli</i> BL21 RE4	6 x Histidin	Ampicillin Ampicillin + Kanamycin

**Tabelle 3.2: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme zur Expression von Fusionsproteinen**

Die bei -80 °C gelagerten Bakterien wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut und davon 150 µl auf die 10 µl Ligationsansatz pipettiert. Nach einer 10-minütigen Ruhephase des Gemisches auf Eis folgte ein einminütiger Hitzeschock in einem 42 °C-warmen Heizblock. Bei *E. coli* BL21 RE4-Bakterien dauerte der Schritt zwei Minuten, bei *E. coli* BL21 DE3-Bakterien wurde ein 45 sek dauernder Hitzeschock vorgenommen, auf den ein einminütiger Inkubationsschritt auf Eis folgte. Danach wurden dem Ansatz 300-500 µl LB-Medium zugegeben und dieser für 45 min in einem auf 37 °C temperierten Brutschrank inkubiert.

LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract 86 mM NaCl, pH 7,5
-----------	--

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transformationsansatz zur Pelletierung der Bakterien zentrifugiert (3 min, 2.700 x g), 200-400 µl des Überstandes entnommen und das Pellet mit der Restflüssigkeit vorsichtig resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde auf LB-Agar-Amp-Platten (*E. coli* XL-1 und *E. coli* BL21 DE3) bzw. LB-Agar-Amp-Kan-Platten (*E. coli* BL21 RE4) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

LB-Agar-Amp	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium 50 µg/ml Ampicillin
LB-Agar-Amp-Kann	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium 50 µg/ml Ampicillin 25 µg/ml Kanamycin

### 3.1.8 Isolierung von Plasmid aus *E. coli*

Für die Aufreinigung von kleinen Mengen an Plasmid (20 µg) wurden 2 ml LB-Medium-Amp mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C für 16 h bei 200 rpm in einem Schüttler kultiviert.

LB-Medium-Amp	1 % (w/v) Bacto-Trypton 5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract 86 mM NaCl, pH 7,5 50 µg/ml Ampicillin
---------------	---

Nach Zentrifugation (3 min, 2.700 x g) erfolgte der Aufreinigungsprozess unter Einsatz der folgenden Puffer.

Puffer P1 (Resuspensions-Puffer):	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 100 µg/ml RNase A 10 mM EDTA
Puffer P2 (Lysis-Puffer):	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer P3 (Neutralisations-Puffer):	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
TE-Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,1 mM EDTA

Das Bakterienpellet wurde in 150 µl Puffer P1 resuspendiert, durch Zugabe von 150 µl Lysis-Puffer (Puffer P2) lysiert und anschließend mit 150 µl Puffer P3 neutralisiert. Nach Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile durch zweimaliges Zentrifugieren (20 min, 20.800 x g, 4 °C) wurde die Vektor-DNA mit 900 µl 100 % (v/v) Ethanol (eiskalt) präzipitiert und durch Zentrifugation (20 min, 20800 x g, 4 °C) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde vom Überstand befreit und mit 70 % (v/v) Ethanol durch erneute Zentrifugation (10 min, 20.800 x g, 4 °C) gewaschen. Nach der Abtrennung des Ethanols wurde das Pellet bei 42 °C getrocknet und in 20 µl TE-Puffer gelöst. Es folgte eine Kontroll-PCR zur Überprüfung der richtigen Orientierung des Inserts in den Vektoren. Zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Plasmid DNA Purification Kit entsprechend der mitgelieferten Gebrauchsanweisung verwendet.

### **3.1.9 Kontroll-PCR**

Zur Überprüfung wurden die vorher gewonnenen Plasmide für eine Kontroll-PCR mit Taq-DNA-Polymerase benutzt. Dabei wurden als Primer jeweils ein für den eingesetzten Vektor spezifisches Oligonukleotid und ein Insert-spezifisches Oligonukleotid verwendet, um somit die Ligation der cDNA in den Vektor und die Orientierung des Inserts zu überprüfen. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen der PCR mit Pwo-Polymerase (3.1.1), für den Reaktionsansatz wurde jeweils 1 µl des aufgereinigten Plasmids als Template-DNA genommen.

Nach Ablauf der PCR folgte eine Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.3). Anhand der Fragmentgröße konnte die richtig insertierte cDNA identifiziert werden. Die detaillierte Überprüfung der Basensequenz im Plasmid erfolgte mittels Sequenzierung.

### **3.1.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die Basensequenz der Plasmid-DNA wurde nach der Didesoxymethode [Sanger et al., 1992] überprüft und somit die Basenfolge und das Leseraster der insertierten cDNA überprüft. Dazu wurde das ABI Prism™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Version 1.1 Reaction Kit verwendet, die Sequenzierungs-PCR wurde in einem Gene Amp PCR

System 2400 durchgeführt, der entsprechende Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen sind in den folgenden Übersichten zusammengestellt.

Reaktionsansatz:	Plasmid-DNA	1 µl
	Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
	Sequenzier-Puffer (5x)	2 µl
	Big Dye Mix (Reaktionskit)	2 µl
	dd H <sub>2</sub> O (steril)	ad 10 µl

PCR-Bedingungen:	94 °C	1 min	
	94 °C	10 sec	]
	55 °C	5 sec	25 Zyklen
	60 °C	4 min	]
	15 °C	∞	

Nach Ablauf der Sequenzierungsreaktion wurde der Ansatz mit dem NucleoSEQ<sup>®</sup> Kit nach Angaben des Herstellers von überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Der Überstand der Sequenzierung wurde nach der Reinigung in der Speed-Vac eingengt und in 20 µl Template Suppression Reagent aufgenommen. Darauf folgte ein Denaturierungsschritt im Heizblock (3 min, 95 °C) und die Sequenzanalyse mit dem ABI Prism<sup>™</sup> Genetic Analyzer 310. Die vollautomatisch generierten Sequenzen wurden ausgewertet und die positiven Plasmide zur präparativen Vervielfältigung in *E. coli*-Bakterien herangezogen (3.1.8). Nach diesem Schritt und erfolgter DNA-Konzentrationsbestimmung (3.1.11) wurden die Expressionsvektoren erneut wie beschrieben sequenziert, dabei wurden Primer ausgewählt, die eine vollständige Sequenzierung der insertierten cDNA ermöglichen.

### 3.1.11 Konzentrationsmessung von DNA-Lösungen

Die Konzentration und der Reinheitsgrad der Plasmide wurden photometrisch in Quarzküvetten mit einem UV-Spektrometer DU640 bestimmt. Die Berechnung erfolgte nach der Formel  $Konzentration\ der\ DNA\ [\mu g/\mu l] = (A_{260} \times 50 \times Verdünnung) / 1000$ , der Grad der Verunreinigung wurde über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA. Reine DNA weist einen Quotienten  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  zwischen 1,8 und 1,9 auf.

### 3.1.12 Ortspezifische Mutagenese

Zur Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von Hint2 wurden ortsspezifische Mutationen im aktiven Zentrum generiert. Ausgehend vom pQE30-Hint2 Plasmid erfolgte die Mutagenese mit Hilfe des QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit und den in Tabelle 3.3 angegebenen Oligonukleotiden (2.3.3).

<b>Protein</b>	<b>Primerpaar forward, reverse</b>	<b>Konstrukt</b>
Hint2-S144A	12, 13	pQE30-Hint2-S144A
Hint2-H147N	14, 15	pQE30-Hint2-H147N
Hint2-H149N	16, 17	pQE30-Hint2-H149N
Hint2-H151N	18, 19	pQE30-Hint2-H151N

**Tabelle 3.3: Primer für die ortsspezifische Mutagenese**

Die Plasmide wurden nach der Mutagenese aufgereinigt (3.1.8), die DNA-Konzentration bestimmt (3.1.11) und abschließend zur Überprüfung sequenziert (3.1.10).

## **3.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **3.2.1 Rekombinante Proteinexpression**

#### **3.2.1.1 Induktion der Proteinexpression**

Für die Vorkulturen wurden Einzelklone der über Nacht kultivierten Bakterien gepickt und mit 100 ml LB-Medium-Amp für 12-14 h bei 37 °C konstant im Inkubator geschüttelt (120 Upm). Bei *E. coli* BL21 RE4 kamen Vorkulturen mit 100 ml LB-Medium-Amp und 25 µg/ml Kanamycin (Mediumbezeichnung: LB-Medium-Amp-Kan) zum Einsatz. 300-400 ml Expressionsmedium wurden mit 20 ml der Vorkulturen und frischem LB-Medium angesetzt und bei 37 °C (*E. coli* BL21 RE4: 30 °C) unter Schütteln (160 Upm) bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,7-1,0 kultiviert. Die Induktion erfolgte für MBP- und His<sub>6</sub>-Fusionsproteine mit 1 mM IPTG für 1 h bei 37 °C, für Proteine mit GST-Tag wurde mit 0,5 mM IPTG für 1 h bei 30 °C induziert. Die Inkubation der Expressionskultur während der Induktion verlief in einem Schüttler, der auf eine konstante Umdrehungsgeschwindigkeit von 120 Upm eingestellt war.

#### **3.2.1.2 Lyse der Bakterien und Aufreinigung der Proteine**

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (20 min, 6.000 x g, 4 °C) pelletiert und der Überstand verworfen. Die Isolation der rekombinanten Proteine erfolgte jeweils mit verschiedenen Puffersystemen, die in der nachfolgenden Tabelle (3.4) zusammengefasst sind.

Fusionsprotein	Lysispuffer	Waschpuffer	Elutionspuffer
GST	100 mM NaCl 40 mM Tris/HCl, pH 8,0 200 µl Complete™ *	100 mM NaCl 40 mM Tris/HCl, pH 8,0	100 mM NaCl 40 mM Tris/HCl, pH 8,0 20 mM Glutathion
MBP	100 mM NaCl 40 mM Tris/HCl, pH 8,0 200 µl Complete™ *	100 mM NaCl 40 mM Tris/HCl, pH 8,0	100 mM NaCl 40 mM Tris/HCl, pH 8,0 20 mM Maltose
His <sub>6</sub> (nativ)	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 20 mM Imidazol, pH 8,0 200 µl Complete™ **	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 20 mM Imidazol, pH 8,0	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 250 mM Imidazol, pH 8,0
His <sub>6</sub> (denaturierend)	8 M Harnstoff 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl 20 mM Imidazol, pH 8,0	8 M Harnstoff 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl 20 mM Imidazol, pH 6,3	8 M Harnstoff 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Tris/HCl 20 mM Imidazol, pH 4,5

**Tabelle 3.4: Puffersysteme zur Isolation der rekombinanten Proteine.** \* Complete™- Protease Inhibitor Mix, mit EDTA; \*\* Complete™- Protease Inhibitor Mix, ohne EDTA

Zur Vorbereitung der Ultraschall-Lyse wurde das gewonnene Pellet in 5 ml eisgekühltem Lysispuffer resuspendiert und die Bakterien mit einem Branson Sonifier in drei Phasen mit je 25 Ultraschall-Pulsen unter permanenter Kühlung mit einer Intensität von 40 % aufgeschlossen. Durch kurze Pausen zwischen den Pulsphasen wurde einer Denaturierung der Proteine durch zu starke Wärmeentwicklung entgegengewirkt. Nach der Ultraschall-Lyse folgte ein Zentrifugationsschritt zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile (30 min, 20.800 x g, 4 °C).

Je 0,5 ml Glutathion-Agarose-Beads (GST-getaggte Proteine), Amylose-Beads (MBP-Fusionsproteine) oder Nickel-NTA-Agarose (His<sub>6</sub>-getaggte Proteine) wurden in PolyPrep<sup>®</sup> Chromatographiesäulen pipettiert und mit 2 x 10 ml Lysispuffer äquilibriert. Der Überstand der Zentrifugation wurde auf die entsprechende Säule gegeben, mit 2 x 10 ml Waschpuffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit 10 ml Elutionspuffer in 5 x 0,5 ml Fraktionen eluiert. Der gesamte Aufreinigungsprozess wurde bei 4 °C durchgeführt. Jeweils 10 µl der gesammelten Fraktionen wurden zur qualitativen Analyse mittels SDS-PAGE (3.2.3) und Coomassie-Färbung (3.2.4) verwendet. Proteinhaltigen Fraktionen wurden gepoolt, einer Dialyse (3.2.1.3) unterzogen und die Ausbeute mit der BCA-Methode (3.2.2) bestimmt.

### 3.2.1.3 Dialyse

Zur Entfernung des Glutathions oder des Imidazols wurden die Eluatfraktionen einer Dialyse unterzogen. Hierbei kamen Dialyse-Schläuche mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa zum Einsatz, in der Tabelle 3.5 sind die angewendeten Dialysepuffer dargestellt.

Fusionsprotein	Dialysepuffer	Dialysedauer
GST	50 mM NaCl 20 mM Tris/HCl, pH 8,0	48 h
His <sub>6</sub>	100 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 10 mM Imidazol, pH 8,0	72 h

**Tabelle 3.5: Dialysepuffer**

Die Dialyse erfolgte bei 4 °C, in deren Verlauf wurde der Dialysepuffer dreimal durch frischen Puffer ersetzt. Nach Beendigung der Dialyse erfolgte die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen (3.2.2).

### 3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Proteinkonzentrationen wurden anhand der BCA-Methode bestimmt [Smith et al., 1985]. 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung wurden mit 10 µl dd H<sub>2</sub>O versetzt. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen (50, 100, 200, 300, 400 und 500) mg/ml in dem Puffersystem, das dem zu bestimmenden Protein entsprach. Die Proben und Standards wurden nach Versetzen mit 200 µl BCA-Reagenz 30 min bei 37 °C inkubiert, im Multiplate Reader gemessen und die Proteinkonzentrationen mittels der aus den Standardlösungen ermittelten Kurven bestimmt.

### 3.2.3 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Geleelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen fand die Methode der diskontinuierlichen SDS-PAGE [Laemmli, 1970] Anwendung, um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Es kamen Gele der Größe 80 x 85 x 0,75 mm (H x B x T) zum Einsatz, die

in Sammelgel (H = 20 mm) und Trenngel (H = 60 mm) unterteilt waren. Die Lösungen für das Sammelgel und die Trenngele setzten sich folgendermaßen zusammen (Angaben beziehen sich auf jeweils zwei Sammel- und Trenngele).

Lösungen	Sammelgel 5 %	Trenngel 10 %	Trenngel 14 %
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	0,5 ml	3,3 ml	4,6 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	0,83 ml	-	-
10 % SDS	33,33 µl	100 µl	100 µl
10 % APS	33,33 µl	100 µl	100 µl
dd H <sub>2</sub> O	1,57 ml	3,8 ml	2,7 ml
TEMED	6 µl	10 µl	10 µl
SUMME	2,97 ml	9,81 ml	10,01 ml

**Tabelle 3.6: Zusammensetzung der Lösungen für Sammel und Trenngel der SDS-Gele**

Nachdem die Acrylamidgele vollständig polymerisiert und in den Elektrophoresekammern des Typs Dual Vertical Mini Gel fixiert waren, wurden diese mit SDS-Elektrophoresepuffer befüllt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 4x oder 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 95 °C erhitzt und nach Zentrifugation (1 min, 20.800 x g) 20 µl in die Taschen des Gels aufgetragen.

SDS-Elektrophoresepuffer:	192 mM Glycin 24,8 mM Tris 0,01 % (w/v) SDS
2x SDS-PAGE-Probenpuffer:	65 mM Tris/HCl pH 6,8 30 % (w/v) Glycerin 5 % (w/v) 2-Mercaptoethanol 3 % (w/v) SDS 4 mg/ml Bromphenolblau 4 mg/ml Pyronin G
4x SDS-PAGE-Probenpuffer:	100 mM Tris/HCl pH 6,8 40 % (w/v) Glycerin 20 % (w/v) 2-Mercaptoethanol 8 % (w/v) SDS 4 mg/ml Bromphenolblau 4 mg/ml Pyronin G

Anfangs wurde die Elektrophorese mit einer Stromstärke von 10 mA/Gel durchgeführt, um eine effiziente Konzentrierung der Proteine im Sammelgel zu ermöglichen. Zur Kontrolle des Fortschritts der Auftrennung diente der im Probenpuffer enthaltene Farbstoff

Bromphenolblau. Sobald die Proben den Anfang des Trenngels erreicht hatten, wurde die Stromstärke auf 20 mA/Gel erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, nachdem die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

### **3.2.4 Coomassie Brillant Blue-Färbung**

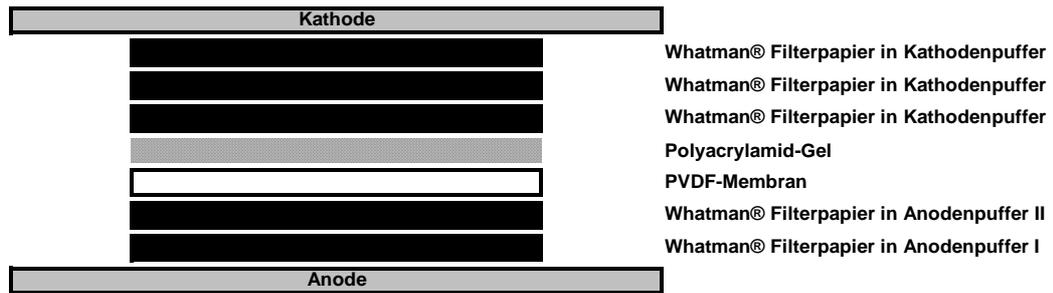
Zur Visualisierung der aufgetrennten Proteine wurden die Gele mit Coomassie Brillant Blue angefärbt.

Färbelösung:	30 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 96 % 0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250
Entfärbelösung:	40 % (v/v) Methanol 20 % (v/v) Essigsäure 96%

Das zu färbende Gel wurde für ca. 10 min mit der Färbelösung inkubiert. Anschließend folgte die Entfärbung mit der Entfärbelösung bis die proteinfreie Region des Gels keine Blaufärbung mehr aufwies. Dazu wurde die Entfärbelösung zwei- bis dreimal gewechselt.

### **3.2.5 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membran**

Mit Hilfe des Elektrotransfers können Proteine nach SDS-PAGE unter Erhalt des Trennmusters auf Membranen übertragen werden [Tobwin et al., 1979]. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry Verfahren bei einer Stromstärke von 0,2 mA/cm<sup>2</sup> pro Gel für 15-20 min. Im Folgenden ist der Aufbau des Blots dargestellt (Abb. 3.1).



**Abb. 3.1:** Schema zum Aufbau des Blots beim Semi-Dry Verfahren

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

### 3.2.6 Immundetektion

Nach der Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membranoberfläche für 30 min mit 10 ml TST-Puffer folgte der Inkubationsschritt mit dem Primärantikörper für 30 min.

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

Anschließend wurde die PVDF-Membran 3 x mit je 10 ml TST-Puffer für 20 min gewaschen, gefolgt von der 20-minütigen Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach erneutem Waschen wurde die Membran gemäß den Angaben des Herstellers mit dem Lumi-Light Western Blotting Substrate versetzt. Die Lumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms für 10 sek bis zu 1 h dokumentiert. Sämtliche Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt.

### **3.3 Zellbiologische Methoden**

#### **3.3.1 Zellkultur**

Die für den experimentellen Einsatz verwendeten, adhärent wachsenden Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden in einer sterilen Werkbank mit steril verpackten Einwegmaterialien oder durch Wasserdampf autoklavierten Gegenständen vorgenommen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturschalen mit dem speziell modifizierten Kultivierungsmedium.

Kultivierungsmedium	DMEM High Glucose + 10 % (v/v) FKS + 100 Units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin
---------------------	--

#### **3.3.2 Passagierung von HEK293-, HeLa- und SW480-Zellen**

Zur Passagierung von HEK293-Zellen wurde alle zwei bis drei Tage eine konfluent bewachsene Schale nach Absaugen des Mediums mit 10 ml PBS (+/+) gewaschen und anschließend für ca. 3 min mit PBS (-/-) + 0,05 % (v/v) EDTA inkubiert. Nach Absaugen der Lösung wurden die HEK293-Zellen in 10 ml frischem, vorgewärmten Kultivierungsmedium aufgenommen. Resuspendierung und Vereinzeln der Zellen erfolgte durch mehrfaches schonendes Auf- und Abpipettieren. Unmittelbar danach wurden die Zellen in neue Zellkulturschalen ausgesät. Die Bestimmung einer genau definierten Zelldichte wurde mit einer Neubauer Zählkammer durchgeführt und die gewünschte Zellkonzentration durch Zugabe von Kultivierungsmedium eingestellt. HeLa- und SW480 Zellen wurden nach dem oben beschriebenen Waschschrift für 3 min mit 5 ml einer 0,25 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach vorsichtigem Absaugen der Lösung wurden die Zellen vereinzelt und zur weiteren Kultivierung ausgesät.

### 3.3.3 Transfektion von Zellen

#### 3.3.3.1 Transfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert, wobei folgende Lösungen zum Einsatz kamen:

2 x HBS-Puffer (HEPES buffered saline)	55 mM HEPES/NaOH, pH 7,03 274 mM NaCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2,5 M CaCl <sub>2</sub>

Die Bildung von Calciumphosphat-DNA-Kristallen gelang durch tropfenweises Einbringen von 250 µl einer 250 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung in 250 µl 2 x HBS. Dieser Transfektionsansatz wurde für ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gleichmäßig auf die Zellen in den Multiwell™-6-well Zellkulturplatten verteilt. Nach Inkubation für 6-8 h in einem Begasungs-Brutschrank wurde das Kultivierungsmedium entfernt, die Zellen mit 2 ml PBS (+/+) gewaschen und mit frischem Medium versetzt und für weitere 42 Stunden im Brutschrank kultiviert.

#### 3.3.3.2 Transfektion von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit dem Fugene™ Reagenz nach Angaben des Herstellers transfiziert. Für die Transfektion einer Einzelkammer einer Multiwell™-6-well Zellkulturplatte wurden 200 µl DMEM mit 3 µg Plasmid-DNA und 4,5 µl Fugene™ für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden mit Waschlösung gewaschen, mit 800 µl DMEM versetzt und der Transfektionsansatz hinzu gegeben. Es folgte eine Inkubationsphase von 4-6 h bei 37°C, gefolgt von einem Waschschrift und Zugabe von 2 ml Zellkulturmedium. Anschließend wurden die transfizierten HeLa-Zellen für 48 h im Brutschrank inkubiert.

## **3.4 Anti-Hint2-Antikörper-Aufreinigung**

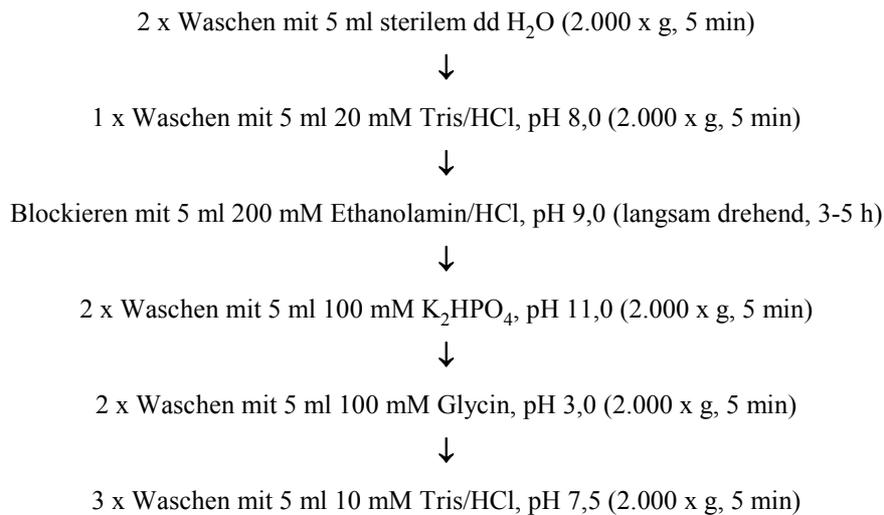
### **3.4.1 Immunisierung von Kaninchen**

Zur Gewinnung des anti-Hint2-Antikörpers wurden Kaninchen mit rekombinant exprimiertem und denaturierend aufgereinigtem His<sub>6</sub>-Hint2 (3.2.1) mit drei sequentiellen Injektionen im Abstand von zwei bis drei Wochen immunisiert. Die Aufreinigung der Hint2 spezifischen polyklonalen Antikörper erfolgte affinitätschromatographisch aus dem Serum (Tag 81).

### **3.4.2 Vorbereitung der Affinitätschromatographiesäulen**

Denaturierend aufgereinigtes His<sub>6</sub>-Hint2-Protein (3.2.1) wurde mit Hilfe von PD10-Sephadex-Säulen umgepuffert. Dazu wurden die Säulen mit 25 ml 300 mM NaHCO<sub>3</sub> äquillibriert und anschließend mit 2,5 ml des Proteineluats beladen. Die mit 3,5 ml 300 mM NaHCO<sub>3</sub> eluierten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (3.2.3) und Coomassie-Färbung (3.2.4) analysiert.

Um die Antikörper selektiv aus dem Kaninchenserum zu isolieren, wurde His<sub>6</sub>-Hint2 an Mini-Leak™-Beads immobilisiert. Die Beads wurden zunächst mit 3 x 5 ml sterilem dd H<sub>2</sub>O gewaschen (2.000 x g, 5 min) und anschließend für 18 h mit der vorbereiteten His<sub>6</sub>-Hint2 Proteinlösung unter konstantem Drehen auf einem Rotator inkubiert, um die Beads gleichmäßig in Suspension zu halten. Am Ende dieses Prozesses wurden die Mini-Leak™-Beads pelletiert (2.000 x g, 5 min), der Überstand mit dem ungebundenen Protein bei 4 °C eingelagert und die Beads wie in Abbildung 3.2 dargestellt weiter präpariert.



**Abb. 3.2: Schema zur Präparation der Mini-Leak™-Beads**

### 3.4.3 Isolation des anti-Hint2-Antikörpers

Zur Isolation des Antikörpers wurde das Kaninchenserum (Rabbit-anti-Hint2, Tag 81) mit den vorbereiteten Mini-Leak™-Beads bei 4 °C für ca. 18 h im Überkopfschüttler inkubiert und anschließend in PolyPrep®-Chromatographiesäulen überführt. Die Säule wurde 3 x mit 10 ml PBS (+/+) gewaschen und der Antikörper mit 100 mM Glycin (pH 2,5) in Fraktionen zu je 500 µl eluiert. Sofortige Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 25 µl 1 M Tris/HCl (pH 8,8). Für eine erneute Verwendung des Säulenmaterials wurden die Beads mit PBS (+/+) gewaschen und in 0,1 % (w/v) Natriumazid-Lösung bei 4 °C gelagert.

Die Ausbeute der Antikörperisolation wurde mittels SDS-PAGE (3.2.3) und Coomassie-Färbung (3.2.4) analysiert und die proteinhaltigen Fraktionen gegen PBS (+/+) dialysiert. Nach der Bestimmung der Konzentration (3.2.2) wurde der Antikörper mit 3 % (w/v) PEG, 3 % (w/v) Saccharose und 1 % (w/v) Methylisothiazolon stabilisiert.

### 3.4.4 Charakterisierung des anti-Hint2-Antikörpers

Zur Analyse der Spezifität des anti-Hint2-Antikörpers wurden GST, GST-Hint1, GST-Hint2 und GST-Hint3 exprimiert, aufgereinigt und jeweils 1 µg der Proteine mit SDS-

PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und mit dem anti-Hint2-Antikörper (2  $\mu\text{g/ml}$ ) immundetektiert (3.2.6).

In einem weiteren Test wurden 10  $\mu\text{g}$  GST und GST-Hint2 mit je 20  $\mu\text{l}$  anti-Hint2-Antikörper mit PBS (+/+) auf ein Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 1 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden den Ansätzen 50  $\mu\text{l}$  in PBS (+/+) äquilibrierte Glutathion-Agarose-Beads zugegeben und wiederholt inkubiert. Nach diesem Schritt folgte die Sedimentierung der GSH-Beads (3 min, 2.700 x g, 4 °C), der Überstand wurde abgenommen und mit TST-Puffer auf 10 ml aufgefüllt. Die beiden so erhaltenen Lösungen wurden als Primärantikörperlösungen für die Immundetektion verwendet. Durch die Inkubation mit GST-Hint2 sollten die gegen Hint2 gerichteten Antikörper aus dem Serum entfernt werden, so dass im nachfolgenden Western Blot folglich kein Signal mehr erhalten werden dürfte.

## 3.5 Interaktionsstudien

### 3.5.1 Immunpräzipitation

#### 3.5.1.1 Passagieren von Zellen für die Immunpräzipitation

HEK293-Zellen wurden für die Durchführung von Immunpräzipitations-Experimenten nach dem Waschen mit Waschlösung für 3 min mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen in 10 ml Kultivierungsmedium vereinzelt, gezählt und jeweils  $1 \times 10^6$  HEK293-Zellen in jede Einzelkammer einer Multiwell™-6-well Zellkulturplatte pipettiert.

#### 3.5.1.2 Lyse der Zellen

Es wurden  $10^6$  HEK293-Zellen mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert (3.3.3.1), die Plasmide führten zu einer Überexpression von FLAG- und myc<sub>6</sub>-fusionierten Varianten der untersuchten Proteine in den Zellen. Pro Transfektion wurden insgesamt 2 µg Plasmide verwendet. Um bei jedem Experiment die gleiche Menge DNA in die Zellen einzuschleusen, wurde mit Leervektor aufgefüllt. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit 200 µl 1x Interaktionspuffer A oder B, die zusätzlich Complete™-Protease Inhibitor Mix (ohne EDTA) enthielten, für 20 min bei 4 °C inkubiert.

2x Interaktionspuffer A:	40 mM HEPES, pH 8.0 100 mM NaCl 600 mM Saccharose 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub> 0,4 % (v/v) Triton X-100
--------------------------	---

2x Interaktionspuffer B:	50 mM HEPES, pH 6,8 300 mM NaCl 600 mM Saccharose 0,1 mM ZnCl <sub>2</sub> 0,4 % (v/v) Triton X-100
--------------------------	---

Die Zellen wurden mit einem Zellschaber aus den Multiwell™-6-well Zellkulturplatte abgelöst und die unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (10 min, 20.800 x g, 4

°C) sedimentiert. Die Überstände wurden erneut zentrifugiert (10 min, 20.800 x g, 4 °C) und mit 10 µl des klaren Lysats der Proteingehalt bestimmt (3.2.2).

### **3.5.1.3 Durchführung der Immunpräzipitation**

Für die Immunpräzipitation wurden 100 µl des HEK293-Zelllysates (ca. 100 µg) mit 100 µl 1x Interaktionspuffer A oder B für 30 min mit 2 µg anti-FLAG- oder 2 µg anti-myc-Antikörper bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Es wurden 30 µl Protein-A-Sepharose™ CL-4B pro Ansatz zugegeben, die zuvor im Verhältnis 1:1 mit dem jeweiligen 1x Puffer durch dreimaliges Waschen (1 min, 2.700 x g, 4 °C) äquilibriert worden war. Nach 1 h im Überkopfschüttler bei 4 °C wurde die Protein-A-Sepharose™ CL-4B mit den gebundenen Antikörper-Proteinkomplexen sedimentiert (1 min, 2.700 x g, 4 °C), 3x in 300 µl 1x Interaktionspuffer resuspendiert und durch Zentrifugation (1 min, 2.700 x g, 4 °C) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 15 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt, durch Zentrifugation (3 min, 20.800 x g) sedimentiert und für 5 min bei 96 °C erhitzt. Die präzipitierten Proteine im Zelllysate wurden durch SDS-PAGE (3.2.3) aufgetrennt und nach dem Elektrottransfer (3.2.5) durch Immundetektion (3.2.6) analysiert.

### **3.5.1.4 Endogene Immunpräzipitation**

Der Nachweis von endogenen Hint2/β-Catenin-Komplexen erfolgte mit Lysaten von SW480-Zellen. Dazu wurde eine konfluent gewachsene Schale mit 600 µl 1x Interaktionspuffer B inklusive Complete™-Protease Inhibitor Mix (ohne EDTA) zur Lyse wie unter 3.5.1.2 beschrieben inkubiert. Die aufbereiteten Lysate wurden mit 2 µg anti-Hint2-Antikörper versetzt und eine Immunpräzipitation (3.5.1.3) durchgeführt. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem anti-β-Catenin-Antikörper.

### **3.5.2 Nachweis der direkten Interaktion mittels Pull-down**

Zum *in vitro* Nachweis der direkten Interaktion der Hint-Proteine wurden GST- und MBP-Varianten rekombinant exprimiert. Im weiteren Verlauf wurden die zu untersuchenden

Proteine gemeinsam in einem Überkopfschüttler für 30 min bei 4 °C inkubiert, um eine direkte Assoziation zu ermöglichen. Dabei setzte sich die Reaktionslösung aus 100 µl Interaktionspuffer A oder B und 4 µg der jeweiligen Proteine zusammen. Um bei jeder Probe ein Gesamtvolumen von 200 µl zu erreichen, wurde zum Auffüllen jeweils die erforderliche Menge einer 10 mM HEPES (pH 6,8 oder 8,0)-Lösung verwendet. GSH-Beads wurden mit 0,02 % (w/v) BSA über Nacht in einem Überkopfschüttler bei 4 °C abgesättigt und mit 1x Interaktionspuffer A oder B 3x gewaschen (1 min, 2.700 x g, 4 °C). Nach Ablauf der 30-minütigen Inkubationszeit wurden die Reaktionsansätze zur Abtrennung eventuell ausgefallener Proteinkomplexe zentrifugiert (5 min, 20.800 x g, 4 °C), 180 µl Überstand wurden mit 30 µl GSH-Beads versetzt und für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Glutathion-Agarose-Beads mit den gebundenen Proteinkomplexen durch Zentrifugation (1 min, 2.700 x g, 4 °C) pelletiert, der Überstand abgesaugt und im Anschluss 5x mit 300 µl 1x Interaktionspuffer A oder B versetzt, zentrifugiert (1 min, 2.700 x g, 4 °C) und vom Überstand befreit. Dem letzten Waschriff folgend wurden die pelletierten Beads mit 15 µl 2x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 96 °C erhitzt und pelletiert (1 min, 20.800 x g). Die Proteinkomplexe wurden auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen (3.2.3), geblottet (3.2.5) und mit Hilfe von anti-MBP- und anti-GST-Antikörpern (3.2.6) immundetektiert. Die Bildung von Proteinkomplexen zwischen MBP-Hint2 und GST-getaggtten Proteinen des Wnt-Signalweges wurde ebenfalls *in vitro* mit einem vergleichbaren Pull-down-Assay untersucht. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

### 3.5.3 Gelfiltration

Der Nachweis der Homodimerisierung von rekombinant hergestelltem His<sub>6</sub>-Hint2-WT und His<sub>6</sub>-Hint2-H149N erfolgte mit einer Äkta™ Explorer Chromatographieanlage, an die eine Superdex® 75HR 10/30 Gelfiltrationssäule angeschlossen war. Die Detektion der Proteinkomplexe erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Anhand der erhaltenen Retentionszeiten konnte das apparente Molekulargewicht der Proteine durch Vergleich mit dem Elutionsverhalten von Standardproteinen abgeleitet werden. Als Puffersystem für die Gelfiltrationsanalysen wurde der folgende Laufpuffer verwendet:

Gelfiltrationspuffer:           20 mM Imidazol, pH 8,0  
  300 mM NaCl  
  5 mM MgCl<sub>2</sub>

Zur Analyse wurden 150 µl His<sub>6</sub>-Hint2-WT (0,1 mg/ml) und His<sub>6</sub>-Hint2-H149N (0,05 mg/ml) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt, die erhaltenen Chromatogramme wurden zur Auswertung mit Referenzläufen der Standardproteine Carboanhydrase (2 mg/ml, 29 kDa) und BSA (0,2 mg/ml, 66 kDa) verglichen.

### **3.5.4 Reporteranalysen**

Für die Experimente mit den Reportergenkonstrukten wurde das luciferase reporter gene assay (constant light)-Kit und das β-Galactosidase reporter gene assay-Kit nach Herstellervorgaben verwendet. Dafür wurden 5 x 10<sup>5</sup> HEK293 Zellen wie beschrieben (3.3.2) ausgesät und mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert (3.3.3.1). Um immer die gleiche Gesamtmenge DNA in die Zellen zu transfizieren, wurde mit pCS2+-Leervektor aufgefüllt. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und sowohl die Luziferase- als auch die β-Galactosidaseaktivität in Doppelbestimmungen gemessen. Das Enzym β-Galactosidase (Vektor pCH110) diente als interner Standard zur Ermittlung der Transfektionseffizienz und zur Normalisierung der Luziferasewerte.

#### **3.5.4.1 Beeinflussung der TCF-β-Catenin-Transkriptionsaktivität durch Hint2**

Zur Untersuchung des Einflusses von Hint2 auf die TCF-β-Catenin-Transkriptionsaktivität wurden entweder die S5/S0-Siamois-Luziferase-Konstrukte [Brannon et al., 1997] oder die Topflash/Fopflash (pGL3-OT/OF)-Reportersysteme [He et al., 1998] verwendet. Diese Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. David Kimelman und Dr. Bert Vogelstein zur Verfügung gestellt. Das pcDNAI-hTCF4-Plasmid stammte von Dr. Hans Clevers, folgende Plasmidmengen wurden für die Messungen eingesetzt.

Konstrukt	S5/S0	pGL3-OT, pGL3-OF	pcDNAI-hTCF4	pCS2+ $\beta$ - Catenin	pCMV4-Hint2- FLAG	pCH110
Menge ( $\mu$ g)	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5 - 2,0	0,1

**Tabelle 3.7:** Plasmidmengen für Reporteranalysen mit den S5/S0-Siamois-Luziferase- und den Topflash/Fopflash- Konstrukten

### 3.5.4.2 Untersuchungen mit LEF-1-Konstrukten

Um die Aktivitätsänderung der S5/S0-Siamois-Luziferase in Abwesenheit von  $\beta$ -Catenin zu analysieren, wurden LEF-1-, LEF-VP16- und  $\Delta$ N-LEF-1-Plasmide [Aoki et al., 1996] verwendet. Die Transfektion erfolgte wie oben beschrieben mit folgenden Plasmidmengen.

Konstrukt	S5/S0	LEF-1	LEF-VP16	$\Delta$ N-LEF-1	pCS2+ $\beta$ -Catenin	pCMV4-Hint2- FLAG
Menge ( $\mu$ g)	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0

**Tabelle 3.8:** Darstellung der transfizierten Plasmidmengen bei den LEF-1-Reporterexperimenten

### 3.5.4.3 Experimente zur Cyclin D1-Promotorregulierung

Die potentielle Regulierung des Cyclin D1-Promotors durch Hint2 wurde mit Cyclin D1-Luziferase (Cyclin D1-Luc)- und Cyclin D1- $\Delta$ N-Luziferase (Cyclin D1- $\Delta$ N-Luc)-Plasmiden [Tetsu et McCormick, 1999] untersucht. In der nachfolgenden Tabelle ist angegeben, wie viel DNA bei diesen Versuchen eingesetzt wurde.

Konstrukt	Cyclin D1-Luc	Cyclin D1- $\Delta$ N-Luc	pCMV4-Hint2-FLAG	pCH110
Menge ( $\mu$ g)	1,0	1,0	0,5 - 2,0	0,1

**Tabelle 3.9:** Die angegebenen Plasmidmengen wurden für die Reporteranalysen mit Cyclin D1-Luziferasekonstrukten transfiziert

## 3.6 Enzymatische Aktivitätsanalysen

### 3.6.1 Allgemeine Versuchsbedingungen

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität von rekombinant exprimiertem His<sub>6</sub>-Hint2 erfolgte mittels einer HPLC-Anlage vom Typ HP Agilent 1100 mit einer Reversed-Phase-Säule (Bezeichnung: C-18 Nucleosil-100-3, Partikelgröße von 3 µm, Länge 125 mm, interner Durchmesser 4 mm). Die einzelnen Ansätze wurden mit einem linearen Gradientenprogramm aus den HPLC-Puffern A und B (s.u.) bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt. Edukte und Produkte der Reaktion wurden durch Messung der Absorption bei 254 nm detektiert.

Gradientenpuffer:

HPLC-Puffer A:	10mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 mM TBA 3 % (v/v) Acetonitril, pH 5,0
HPLC-Puffer B:	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 mM TBA 30 % (v/v) Acetonitril, pH 7,5

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	Anteil HPLC-Puffer A (%)	Anteil HPLC-Puffer B (%)
0	100	0
4	100	0
12	0	100
17	0	100
19	100	0

Vor der Injektion auf die HPLC-Säule wurde aus jedem Reaktionsansatz das eingesetzte Enzym durch Zentrifugation über Ultrafree<sup>®</sup>-MC Zentrifugationsfilter (20 min, 5.100 x g, 4 °C) abgetrennt. Die resultierende Lösung wurde in die 20 µl fassende Injektionsschleife gefüllt und auf die zuvor mit HPLC-Puffer A äquilibrierte Säule injiziert. Die Substrate und die Produkte der Reaktionen wurden mit Hilfe von Standards identifiziert.

### 3.6.2 Analyse verschiedener Substrate

Für die Identifizierung potentieller Substrate kam rekombinant in *E. coli* XL-1 exprimiertes und nativ aufgereinigtes His<sub>6</sub>-Hint2 zum Einsatz (3.2.1). 1 µg des Enzyms wurde jeweils mit 100 µM Adenosin 5'-monophosphoramidat (Synonyme: AMP-NH<sub>2</sub>, AMA), AMP, ADP, ATP, Ap<sub>3</sub>A oder Ap<sub>4</sub>A für 30 min bei 37 °C inkubiert. Als Reaktionslösung dienten 100 µl des unten angegebenen 2x Enzympuffers, der mit den erforderlichen Volumina an Enzymlösung, Nukleotidlösung und dd H<sub>2</sub>O auf 200 µl aufgefüllt wurde

2x Enzympuffer:        50 mM Hepes, pH 8,0  
                              2 mM MgCl<sub>2</sub>

Nachdem die 30-minütige Inkubationszeit abgelaufen war, wurde das Reaktionsgemisch analog der unter 3.6.1 beschriebenen Methode weiterbehandelt und anschließend mit der HPLC analysiert. Zur Identifikation der Nukleotide und deren Reaktionsprodukte wurden Referenzchromatogramme mit AMA, AMP, ADP, ATP, Ap<sub>3</sub>A und Ap<sub>4</sub>A (jeweils 100 µM) erstellt.

### 3.6.3 Einfluss von Mg<sup>2+</sup> - und Zn<sup>2+</sup>-Ionen

Der Einfluss von Zink- und Magnesium-Ionen wurde mit dem 2x Enzympuffer bestimmt, der entweder 2 mM Magnesiumchlorid oder 2 mM Zinkchlorid enthielt. Die Bestimmung der Hydrolaseaktivität erfolgte bei pH-Werten zwischen 6,6 und 7,8. Die Reaktionsvolumina umfassten 200 µl, bestehend aus 100 µl des jeweiligen Puffers, 125 ng His<sub>6</sub>-Hint2, 100 µM AMA und der noch nötigen Menge dd H<sub>2</sub>O. Es wurde für 5 min bei 37°C inkubiert und die Proben danach wie unter 3.6.1 beschrieben analysiert.

### 3.6.4 Ermittlung des pH-Optimums

Die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von Hint2 wurde mit 30 ng des Enzyms und 100 µM AMA untersucht. Die Enzymreaktion lief für 5 min bei 37 °C, wobei das Experiment durch Einfrieren der Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff gestoppt wurde.

Zunächst wurde der 2x Enzympuffer auf die pH-Werte 4,0-9,0 eingestellt, darauf folgten Analysen unter den gleichen Bedingungen bei pH-Werten von 4,5 bis 7,0. Die HPLC-Auftrennung erfolgte wie beschrieben (3.6.1).

### **3.6.5 $K_m$ -Wert-Bestimmung**

Für die Ermittlung des  $K_m$ -Wertes von His<sub>6</sub>-Hint2 wurden die im vorherigen Kapitel benutzten Versuchsbedingungen wie folgt angepasst. Der 2x Enzympuffer wurde auf pH 5,5 eingestellt und 100 ng His<sub>6</sub>-Hint2 mit 20, 30, 40, 50 oder 60  $\mu$ M AMA für 5 min bei 25 °C inkubiert.

### **3.6.6 Untersuchung von Hint2-Mutanten**

Da sich die Expression der Hint2-Mutanten unter nativen Bedingungen als problematisch erwies, wurden diese exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen (3.2.1) aufgereinigt. Die Dialyse erfolgte unter renaturierenden Bedingungen mit dem Dialysepuffer für His<sub>6</sub>-getaggte Proteine (3.2.1.3). Die Analyse der enzymatischen Aktivität der His<sub>6</sub>-Hint2-H147N-, His<sub>6</sub>-Hint2-H149N-, His<sub>6</sub>-Hint2-H151N- und His<sub>6</sub>-Hint2-S144A-Mutanten im Vergleich zum ebenso unter denaturierenden Bedingungen exprimierten Wildtyp-Enzym erfolgte wie oben beschrieben (3.6.5). Anhand von Vorversuchen mit jeweils 1  $\mu$ g der mutierten Enzyme wurde untersucht, ob diese noch zur AMA-Hydrolyse in der Lage waren. Da bei den His<sub>6</sub>-Hint2-H147N und His<sub>6</sub>-Hint2-H149N-Proteinen keinerlei Aktivität mehr messbar war, wurden für die darauf folgenden Vergleichsmessungen jeweils 200 ng der Enzyme eingesetzt. Bei den gleichen Vorversuchen mit den His<sub>6</sub>-Hint2-H151N- und His<sub>6</sub>-Hint2-S144A-Mutanten sowie dem unmutierten Enzym war eine AMA-Hydrolaseaktivität detektierbar, deshalb wurden von diesen Enzymen 100 ng für die Vergleichsmessungen verwendet.

## **3.7 Fluoreszenzmikroskopie**

### **3.7.1 Aussäen von Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie**

Für die fluoreszenzmikroskopischen Experimente mit HEK293- und HeLa-Zellen wurden Deckgläschen in Ethanol gewaschen, abgeflammt und auf dem Boden je einer Einzelkammer einer Multiwell™-6-well Zellkulturplatte unter sterilen Bedingungen abgelegt. Anschließend wurden  $10^5$  Zellen/well ausgesät und in 2 ml Zellkulturmedium inkubiert.

### **3.7.2 Nachweis von homodimeren Hint2-Proteinkomplexen in HeLa-Zellen**

HeLa-Zellen wurden wie beschrieben (s.o) auf Objektträgern kultiviert und mit den Plasmiden pcDNA3-NCFP-Hint2 und pcDNA3-NYFP-Hint2 transfiziert (3.3.3.2). Nach 48 h wurden die Zellen mit 2 ml PBS (+/+) gewaschen und in 1 ml 100 %-igem Methanol für 20 min bei -20 °C fixiert. Vor der Inkubation für 10 min mit 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (0,1 µg/ml in Blocklösung) wurden die Zellen 3x mit PBS (+/+) gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit dd H<sub>2</sub>O und Ethanol gewaschen, auf Objektträger überführt und mit ProTaq Mount Fluor eingebettet. Die Analyse der fixierten HeLa-Zellen erfolgte am konfokalen Lasermikroskop Zeiss LSM510 META. Zur Durchführung von Kontrollexperimenten wurden die Zellen mit den pcDNA3-NCFP- oder den pcDNA3-NYFP-Leervektoren analog transfiziert, fixiert und analysiert.

### **3.7.3 Lokalisation von Hint2 in HEK293-Zellen**

Für den Nachweis von endogenem Hint2 in HEK293-Zellen mit dem Hint2-Antikörper durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen wie oben beschrieben fixiert. Nach zweimaligem Waschen wurden unspezifische Bindungen für 30 min durch Inkubation der Zellen mit Blocklösung (0,1 % (v/v) Goat Serum in PBS (+/+/+)) abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit dem anti-Hint2-Antikörper (20 µg/ml in Blocklösung) für 30 min, dreimaliges Waschen mit Blocklösung und 30-minütige Inkubation unter Lichtausschluss mit dem Alexa Fluor™ 488 Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper

(0,2 µg/ml in Blocklösung). Die Anfärbung des Zellkerns erfolgte mit DAPI-Lösung (0,1 µg/ml in Blocklösung), anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS (+/+) gewaschen. Nach der Einbettung der Deckgläschen auf Objektträger (s.o.) erfolgte die Analyse mit dem konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop LSM510 META.

#### **3.7.4 Mitochondriale Lokalisation von Hint2-YFP in HEK293-Zellen**

Auf Objektträgern kultivierte HEK293-Zellen (s.o) wurden mit jeweils 2 µg der Plasmide pcDNA3-Hint2-YFP oder pcDNA3-NYFP-Hint2 transfiziert (3.3.3.1). Nach einem Waschschrift mit 2 ml PBS (+/+) erfolgte die Fixierung in 1 ml 100 %-igem Methanol für 20 min bei -20 °C. Nach zweimaligem Waschen wurden unspezifische Bindungen für 30 min durch Inkubation der Zellen mit Blocklösung (0,1 % (v/v) Goat Serum in PBS (+/++)) abgesättigt. Zur Anfärbung der mitochondrialen Strukturen der fixierten Zellen folgte die Inkubation mit dem anti-OxPhos-Complex 4-Antikörper (0,5 µg/ml in Blocklösung) für 30 min. Nach dreimaligem Waschen mit Blocklösung und 30-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss mit dem Alexa Fluor™ 594 Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (0,5 µg/ml in Blocklösung) wurden die Deckgläschen dreimal mit dd H<sub>2</sub>O und Ethanol gewaschen. Die Einbettung auf die Objektträger wurde mit dem ProTaq Mount Fluor-Reagenz vorgenommen. Die Analyse erfolgte mit dem konfokalen Immunfluoreszenzmikroskop LSM510 META. Die Experimente mit den Hint3-Konstrukten pcDNA3-NYFP-Hint3 und pcDNA3-Hint3-YFP wurden analog durchgeführt. Zur Durchführung von Kontrollexperimenten wurden die Zellen mit den pcDNA3-NYFP bzw. pcDNA3-YFP-Leervektoren analog transfiziert, fixiert und analysiert.