

3 METHODEN

3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.1.1 HÄUFIG VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER

LB-Medium	1 % [w/v]	Bacto™ Trypton
(autoklaviert)	0,5 % [w/v]	Bacto™ BBL Yeast Extract
	1 % [w/v]	NaCl
LB-Medium mit Ampicillin	100 µg/ml	Ampicillin in LB-Medium
LB-Medium mit Kanamycin	25 µg/ml	Kanamycin in LB-Medium
LB-Medium-Platten	1,5 % [w/v]	Agar in LB-Medium autoklavieren (Agar löst sich) in Petrischalen ausgießen
LB-Medium-Platten mit Antibiotikum	100 µg/ml	Ampicillin oder
(Zugabe nach Abkühlung auf 50 °C)	25 µg/ml	Kanamycin
RNase A	20 mg/ml	RNase A in 10 mM Tris/10 mM EDTA 15 min Inkubation bei 100 °C um DNasen zu inaktivieren
SOB-Medium	2 % [w/v]	Bacto™ Trypton
(autoklaviert)	0,5 % [w/v]	Bacto™ BBL Yeast Extract
	0,05 % [w/v]	NaCl
SOC-Medium (autoklaviert)	20 mM	Glucose in SOB-Medium
1xTE-Puffer pH 7,6	10 mM	Tris/HCl pH7,6
(Tris-EDTA-Puffer)	1 mM	EDTA

3.1.2 HERSTELLUNG KOMPETENTER ZELLEN

Zur Herstellung kompetenter Zellen für die DNA-Transformation wurden die *E. coli*-Stämme HB101 und GM2163 jeweils in 10 ml antibiotikafreiem LB-Medium angeimpft und bei 37 °C für 10 bis 20 h unter starkem Schütteln inkubiert. 2 ml der Suspension wurden anschließend in 250 ml antibiotikafreies LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,5 inkubiert. Bei Erreichen der OD wurde die Kultur in einem vorgekühlten Zentrifugenbecher 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4 °C und 3752 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 50 ml eiskalter 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wurde in 50 ml Tubes umgefüllt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 0 °C und 1351 g für 5 min wurden die Bakterien in 5 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$ /14 % [v/v] Glycerin-Lösung erneut vorsichtig resuspendiert. Abschließend wurden Aliquots zu je 200 µl in vorgekühlte Reagiergefäße abgefüllt und bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.3 TRANSFORMATION CHEMISCH- UND ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN

Die Transformation diente dem Einbringen und somit der Vervielfältigung von Plasmiden in Bakterienzellen. Bei der chemischen Transformation wurden 50 µl chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNA vermischt und 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach 90 sec Hitzeschock bei 42 °C wurde die Suspension erneut für 2 min auf Eis abgekühlt. Abschließend wurden 200 µl auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium ohne Selektionsantibiotikum zur Suspension gegeben und das Gemisch bei 37 °C unter Schütteln für 15 bis 45 min zur Expression der Resistenzgene inkubiert. Eine Abwandlung dieser Methode war die Schnelltransformation, bei der die Zellen nach Zugabe der Plasmid-DNA nur 20 bis 30 min auf Eis inkubiert wurden und auf die oben weiter erwähnten Schritte verzichtet wurde. Diese Methode lieferte deutlich verminderte Transformationseffizienzen, die aber für manche Routineanwendungen ausreichend waren.

Für die Transformation elektrokompeter Zellen wurden 40 µl tiefgefrorene Bakterien-suspension auf Eis aufgetaut. In eine eisgekühlte Elektroporationsküvette wurden die Bakterien und 10 ng Plasmid-DNA pipettiert, welche zur Senkung der Salzkonzentration aus einer Stammlösung (1 µg/µl) 1:100 mit bidest. H_2O verdünnt wurde. Die Elektroporation

erfolgte bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 μF . Nach dem Impuls wurde sofort 37 °C warmes SOC-Medium zu den Bakterien gegeben. Das Gemisch wurde abschließend für 60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Nach Transformation wurden die Zellen ausplattiert oder in Selektionsmedien in Kultur gebracht (s. 3.1.4, 3.1.5, 3.1.6).

3.1.4 AUSPLATTIEREN VON BAKTERIEN

Zur Herstellung von Agarplatten wurde LB-Medium mit 1,5 % [w/v] Agar autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C konnte das Medium unter sterilen Bedingungen mit Ampicillin oder Kanamycin versetzt und in Petrischalen gegossen werden. Die Platten wurden dann bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Ausplattierung wurde die flüssige Bakterienkultur mithilfe einer sterilen Platinöse ausgestrichen. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C zwischen 10 und 15 h inkubiert. Beimpfte Agarplatten wurden zu Lagerungszwecken mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.5 MINIPRÄPARATIONEN VON PLASMID-DNA DURCH KOCHLYSE

Lösungen und Puffer:

STET-Puffer	8 %	Saccharose
(sodium chlorid, Tris, EDTA, Triton-buffer)	5 %	Triton X-100
	50 mM	0,5 M EDTA pH 8
	10 mM	1 M Tris pH 8

Durchführung:

Zur Überprüfung von Plasmiden wurden zunächst Minipräparationen angefertigt. Dazu wurde eine Einzelkolonie von einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum in 3 ml LB-Medium mit demselben Antibiotikum angeimpft. Nach Inkubation über Nacht unter Schütteln bei 37 °C wurde 1 ml der Kultur in ein Reagiergefäß überführt und 5 min bei 20800 g und bei 4 °C zentrifugiert. Die abzentrifugierten Bakterien wurden in 150 μl STET-Puffer resuspendiert und die Suspension mit 12 μl Lysozym (10 mg/ml in 1xTE oder bidest. H₂O) versetzt. Die

Bakterien wurden durch 1 minütiges Erhitzen auf 90 °C lysiert und anschließend für 10 min bei 20800 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mittels Pipettenspitze entfernt und verworfen. Es erfolgte die Zugabe von 150 µl Isopropanol zur Fällung der DNA und eine Inkubation auf Eis für 20 min. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (10 min bei 20800 g und 4 °C), das Pellet in 70 % [v/v] Ethanol gewaschen, erneut wie oben abzentrifugiert und anschließend in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, bevor es in 50 µl 1xTE aufgenommen wurde.

Ein Teil der gewonnenen Plasmid-DNA wurde dann mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und der Verdau durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert, wobei der 10xLadepuffer mit RNase A (20 mg/ml) versetzt war (s. 3.1.10, 3.1.11). Entsprechend dem Restriktionsmuster den Erwartungen, wurde 1 ml der Übernachtskultur in 200 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt, um eine Plasmid-DNA-Präparation in größerem Maßstab durchzuführen (s. 3.1.6).

3.1.6 PRÄPARATION VON *HIGH* UND *LOW COPY PLASMIDS*

Für die Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midi Kit bzw. das Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen verwendet. Als Ausgangsmaterial für die Plasmidpräparation dienten bei *high copy plasmids* 100 ml bzw. 250 ml Übernachtskultur. Die Plasmidpräparation erfolgte nach Angabe des Herstellers.

Bei *low copy plasmids* wurde von einer 250 ml Übernachtskultur ausgegangen. Die ersten Schritte entsprachen der Anleitung von Qiagen. Die Zellen wurden mit den Puffern P1 bis P3 versetzt und nach Protokoll abzentrifugiert. Während an dieser Stelle das Originalprotokoll die Aufreinigung des Überstands über Säulen vorsah, wurde bei dieser Methode der Überstand vorher mit 20 ml Isopropanol versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 15008 g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 500 µl 1xTE und 4,5 ml Puffer QBT resuspendiert und dann erst über eine Säule gereinigt. Die folgenden Schritte entsprachen dann wieder dem Qiagen-Protokoll.

Die zum Schluss gewonnenen Pellets wurden in 50 bis 100 µl 1xTE aufgenommen und die Nukleinsäurekonzentration mittels Absorptionsspektrometrie bestimmt (s. 3.1.7).

3.1.7 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA

Durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer konnte die DNA-Konzentration in einer Probe ermittelt werden. Dazu wurden die Proben 1:50 mit 1xTE verdünnt und in eine 1 cm dicke Quarzglasküvette gefüllt. Den Vergleichswert bildete eine reine 1xTE-Probe. 1 OD_{260nm} entspricht per Definition 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml ssDNA (Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Konzentration ließ sich also wie folgt berechnen:

$OD_{260nm} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor} = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g/ml}$

einzelsträngige DNA und RNA	Faktor 40
doppelsträngige DNA	Faktor 50

Durch das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} konnte der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Eine Nukleinsäurelösung wies im Idealfall ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0 auf.

Bei sehr kleinen DNA-Mengen wurde die Konzentration mithilfe eines analytischen Agarosetrenngels geschätzt. Durch das Auftragen eines Markers konnte die Bandenintensität der Probe mit der bekannten DNA-Menge einer Markerbande verglichen werden (s. 3.1.11).

3.1.8 PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION VON DNA

Die Phenol-Chloroform-Extraktion diente der Aufreinigung der DNA, z.B. zur Entfernung von Proteinen. Die Probe wurde mit 1 Volumenanteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) versetzt und gemischt. Nach 5 min Zentrifugation bei 3500 g in Tubes oder nach 2 min bei 20800 g in Reaktionsgefäßen wurde die wässrige Oberphase abpipettiert und die darin enthaltene DNA mit Ethanol gefällt (s. 3.1.9). Durch die Ethanol-fällung wurden restliche Phenol- und Chloroformreste entfernt.

3.1.9 ETHANOLFÄLLUNG VON DNA

Die Ethanol-fällung diente der Aufkonzentrierung von DNA oder der Entfernung von Verunreinigungen wie beispielsweise störenden Salzen. In einem ersten Schritt wurde die

Probe mit 1/50 Volumen 5 M NaCl-Lösung oder 1/10 Volumen 3 M NaAcetat pH 5,2 sowie mit 2,5 Volumen absolutem Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder von 20 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die DNA für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 20800 g pelletiert. Dann wurde das Pellet in 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Bevor die DNA in einem angemessenen Volumen 1xTE Puffer gelöst wurde, wurde sie in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

3.1.10 RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA

0,2 bis 1 μg DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 10 bis 20 μl (aufgefüllt mit bidest. H_2O) mit 2 bis 10 *units* Restriktionsenzym/ μg DNA und 1/10 Volumen des vom Hersteller empfohlenen 10xInkubationspuffers versetzt. Bei Ansätzen mit einem oder mehreren Enzymen betrug die Gesamtmenge des Enzyms bzw. der Enzyme nicht mehr als 20 bis 30 % des Gesamtansatzes. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei der für das jeweilige Enzym empfohlenen Temperatur, in der Regel bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, für mindestens 1 h. Der Ansatz wurde anschließend mit 10xLadepuffer versetzt und in einer Agarosegelelektrophorese (s. 3.1.11) aufgetrennt.

Beim Partialverdau, beispielsweise bei der Generierung von Vektoren für Klonierungen verwendet, sollten nicht alle Erkennungssequenzen für ein spezifisches Restriktionsenzym auf der jeweiligen DNA geschnitten werden. Dafür wurde die DNA mit unterschiedlichen Mengen des Enzyms im Bereich von 0,05 *units* bis 1 *unit* Enzym/ μg DNA für 1 h inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von EDTA in einer Endkonzentration von 20 mM gestoppt.

3.1.11 HORIZONTALE AGAROSEGELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Lösungen und Puffer:

50xTAE-Puffer pH 8,5	2 M	Tris
(<i>Tris-acetate/EDTA electrophoresis buffer</i>)	50 mM	EDTA
	5,71 % [v/v]	Eisessig (100 % Essigsäure)

10xDNA-Ladepuffer	0,25 % [w/v]	Bromphenol blau
	25 % [w/v]	Ficoll Typ 400
	10 mM	EDTA
10xDNA Ladepuffer mit EDTA	100 mM	EDTA
10xDNA Ladepuffer mir RNase A	100 ng/μl	RNase A

Durchführung:

Bei dieser Methode wurde die DNA nach ihrer Größe, Ladung und Konfiguration getrennt. Dazu wurde 1xTAE-Puffer mit einer je nach DNA-Fragmentgröße unterschiedlichen Agarosekonzentration aufgeköcht. Bei 100 bis 200 bp wurden 2 % [w/v] Agarose verwendet, bei 1000 bp 1 % [w/v] Agarose. Die leicht abgekühlte aber noch flüssige Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen. Nach dem blasenfreien Einsetzen eines Kammes zur Aussparung von Taschen wurde bis zur Polymerisierung des Gels gewartet. Nach Entfernung des Kammes wurde das feste Gel in eine Elektrophoresegelkammer gesetzt. Anschließend wurde die Kammer mit 1xTAE-Puffer so weit gefüllt, dass eine dünne Schicht das Agarosegel bedeckte. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10xLadepuffer versetzt. Kleine Gele (70 ml, Schichtdicke 8 mm) wurden bei einer Spannung von bis zu 70 V für 1 h, mittlere Gele (125 ml, Dicke 8 mm) bis zu 130 V für 2 h und große Gele (300 ml, Dicke 8 mm) bis zu 42 V für 20 h bei 4 °C betrieben. Nach der Auftrennung der DNA wurden die Gele für 20 bis 30 min auf einem Schaukelschwenker mit Ethidiumbromid (1 μg/ml in bidest. H₂O) gefärbt und anschließend für 10 bis 20 min in bidest. H₂O entfärbt.

Das in der doppelsträngigen DNA interkalierende Ethidiumbromid erlaubte unter kurzwelligem UV-Licht eine Dokumentation der einzelnen DNA-Banden. Diente die Elektrophorese nicht nur der Analyse, sondern sollte mit der aufgetrennten DNA weitergearbeitet werden, so wurde die entsprechende Bande unter langwelligem UV-Licht (366 nm) herausgeschnitten. Die entsprechende DNA wurde dann mit der *Freeze and Squeeze*-Methode aus dem Gel gewonnen (s. 3.1.12).

3.1.12 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN NACH DER *FREEZE AND SQUEEZE*-METHODE

Lösungen und Puffer:

<i>Freeze-Squeeze</i> -Puffer	0,3 M	Natriumacetat pH 7,0
	1 mM	EDTA

Durchführung:

Das aus einem Agarosegel gewonnene Gelstück (s. 3.1.11) wurde für 30 min in 1 ml *Freeze-Squeeze*-Puffer in einem Überkopfschwenker äquilibriert. Während dieser Zeit wurde in den Boden eines 0,5-ml-Reaktionsgefäßes mit einer heißen Nadel eine Öffnung gestochen. Anschließend wurde diese Öffnung mit Glaswolle gestopft. Das äquilibrierte Gelstück wurde in das präparierte Reaktionsgefäß überführt, welches wiederum in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß gesetzt wurde. In dieser Konstruktion wurde das Gelstück mindestens für 30 min, meist jedoch über Nacht, bei -80 °C eingefroren, was zur Zerstörung der Gelmatrix führte. Noch während des Auftauens wurde das Gelstück abzentrifugiert (666 g, 15 min). Nach der Zentrifugation befanden sich im kleineren Reaktionsgefäß die Reste des Gelstücks, welche den Glaswollefilter nicht passieren konnten, und im größeren Reaktionsgefäß die DNA. Zur Aufreinigung und Konzentrierung der DNA wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt, allerdings ohne Zugabe von NaCl oder NaAcetat (s. 3.1.9), da NaAcetat bereits im Äquilibrierungspuffer vorhanden war. Das Pellet wurde dann in 20 μl 1xTE gelöst.

3.1.13 LIGATION VON DNA

Zur Ligation von mittels PCR-Mutagenese (s. 3.1.14) oder Restriktionsverdau (s. 3.1.10) gewonnenen DNA-Fragmenten in die entsprechenden Vektoren wurden sowohl die zu inserierenden Fragmente als auch der Vektor zunächst über eine Agarosegelelektrophorese gereinigt (s. 3.1.11, 3.1.12). Um eine Selbstligation des Vektors während der Ligationreaktion zu verhindern, wurde dieser in der Regel vor der Elektrophorese noch mit alkalischer Phosphatase (0,5 *units*/ μg DNA) für 60 min bei 37 °C behandelt. Für die eigentliche Ligationreaktion wurden 50 bis 100 ng des dephosphorylierten Vektors mit einem 5- bis 10-fachen Überschuss des Restriktions- oder PCR-Fragments sowie mit 1/10 Volumen

10xLigationspuffer und 200 *units* T4 DNA Ligase in einem Endvolumen von 8 bis 16 μl für 3 bis 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann für die Transformation in kompetente *E. coli* verwendet (s. 3.1.3).

3.1.14 PCR-MUTAGENESE

3.1.14.1 SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

Die PCR(s) wurden mit dem Expand High Fidelity PCR System von Roche durchgeführt. In der ersten PCR wurden 2 überlappende Reaktionsprodukte mit jeweils einem äußeren und einem inneren Primer, der die gewünschte Mutation trug, synthetisiert (s. Abb. 3.1). Die beiden PCR-Produkte wurden mithilfe der Agarosegelelektrophorese (s. 3.1.11) aufgetrennt und mit der *Freeze and Squeeze*-Methode (s. 3.1.12) isoliert. Die Produkte wurden anschließend mit den äußeren Primern I und IV in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt. Dieses PCR-Produkt wurde ebenfalls mittels Agarosegelelektrophorese und *Freeze and Squeeze*-Methode isoliert und anschließend einem Restriktionsverdau (s. 3.1.10) unterzogen, wobei die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme teilweise durch die verwendeten äußeren Primer generiert wurden. Im Anschluss an den Restriktionsverdau wurde das PCR-Fragment mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit absolutem Ethanol und NaCl gefällt (s. 3.1.8, 3.1.9). Die in 20 μl 1xTE aufgenommene DNA wurde dann in einen Vektor kloniert (3.1.13).

Reaktionsansätze für die beiden ersten PCR(s):

30 μl bidest. H_2O , autoklaviert
 10 ng Template-DNA
 5 μl 10xPuffer [1,5 mM MgCl_2]
 1 μl dNTP [200 μM je dNTP]
 300 nM äußerer Primer I bzw. IV
 300 nM innerer Primer II bzw. III
 0,5 μl thermostabile Taq Polymerase
 [1,73 U/Reaktion]

Reaktionsansatz für die 2. PCR:

30 μl bidest. H_2O , autoklaviert
 5-10 ng Template-DNA aus 1. PCR
 5-10 ng Template-DNA aus 2. PCR
 5 μl 10xPuffer [1,5 mM MgCl_2]
 1 μl dNTP [200 μM je dNTP]
 300 nM äußerer Primer I bzw. IV
 300 nM innerer Primer II bzw. III
 0,5 μl thermostabile Taq Polymerase
 [1,73 U/Reaktion]

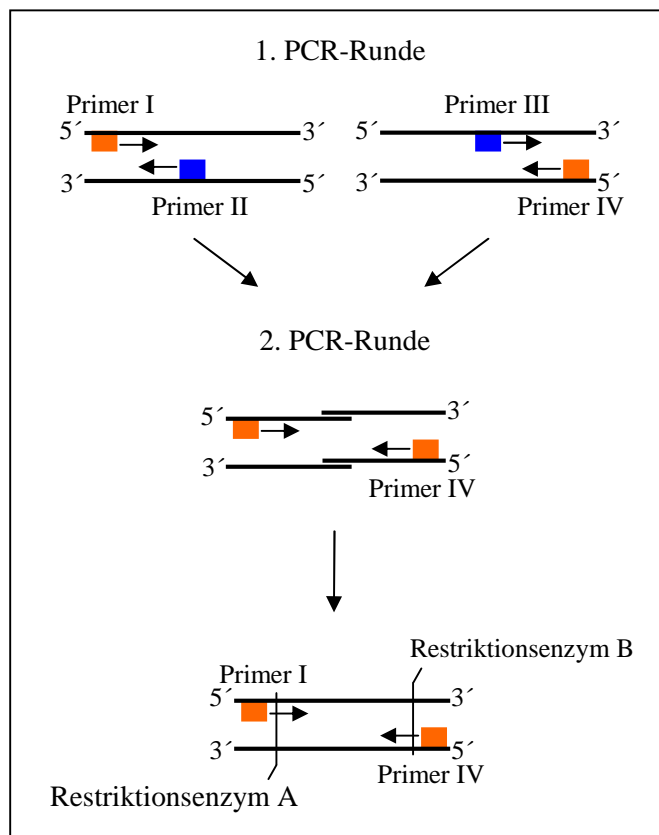


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Site-directed mutagenesis. Die inneren Primer sind blau und die äußeren Primer orange dargestellt.

PCR-Programm:

94 °C 3 min

10 Zyklen :

94 °C 30 sec

42 °C 30 sec

72 °C 1 min

20 Zyklen :

94 °C 30 sec

42 °C 30 sec

72 °C 1 min [Verlängerung
um 5 sec/Zyklus]

72 °C 7 min

4 °C ∞

3.1.14.2 QUIKCHANGE SITE-DIRECTED MUTAGENESIS KIT

Mithilfe der QuikChange-Methode von Stratagene wurden gezielt Mutationen in methylierter Plasmid-DNA eingefügt. Die Durchführung der Experimente erfolgte mit 2 komplementären Primern, die die gewünschte Mutation trugen. Während der PCR entstanden nicht methylierte, punktmutierte Kopien des Ausgangsplasmids.

Reaktionsansatz:

27 µl bidest. H₂O, autoklaviert

15 ng Template-DNA

5 µl 10xReaction Puffer

1 µl dNTP [200 µM je dNTP]

125 ng Primer I

PCR-Programm:

94 °C 3 min

18 Zyklen:

95 °C 30 sec

55 °C 1 min

68 °C 9 min

125 ng Primer II	72 °C	10 min
1 µl <i>Pfu Turbo</i> DNA polymerase	4 °C	∞

Im nächsten Schritt wurden durch einen Restriktionsverdau mit DpnI die methylierten Ausgangsplasmide geschnitten (s. 3.1.10), sodass nur noch die punktmutierten Amplifikate übrig blieben. Der Ansatz wurde mit 1xTE auf 100 µl aufgefüllt. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion (s. 3.1.8) und anschließender Ethanol-fällung mit NaCl (s. 3.1.9) wurde das Pellet in 20 µl 1xTE gelöst. Die DNA-Amplifikate wurden dann in XL1-Blue supercompetent cells transformiert (s. 3.1.3), in denen dann auch die Ligation des 5'-Ende des Primers und des sich anschließendes Amplifikats stattfand.

3.1.15 SEQUENZIERUNG

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-BIOTECH AG durchgeführt. Dazu wurden je Probe 10 µg DNA in der Vakuumzentrifuge getrocknet und im Reaktionsgefäß, welches zusätzlich mit Parafilm versiegelt wurde, eingeschickt.

3.1.16 SOUTHERN BLOT-ANALYSE

Lösungen und Puffer:

Hybridisierungslösung	45 % [v/v]	Formamid
	1 mM	EDTA/NaOH pH 8,0
	250 mM	NaCl
	0,125 M	Phosphatpuffer pH 7,2
	5 % [w/v]	SDS
0,5 M Phosphatpuffer pH 7,2	0,5 M	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,5 M	NaH ₂ PO ₄ zur Titration
20xSSC pH 7,0	3 M	NaCl
	0,3 M	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 10 N NaOH zur Titration

20xTransferpuffer pH 6,5	0,17 M	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	0,33 M	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
Waschlösung I	0,1 % [w/v]	SDS in 2xSSC
Waschlösung II	0,1 % [w/v]	SDS in 0,1xSSC

Durchführung:

Mittels der Southern Blot-Analyse konnten gesuchte DNA-Sequenzen durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten komplementären Sonde nachgewiesen werden (Southern, 1975).

Agarosegelelektrophorese und Vorbehandlung des Gels

Für die Southern Blot Analyse wurden 6 µg DNA mit 2 µl RNase A (2 mg/ml) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mittels eines 24 cm langen 0,7 % Agarosegels mit einer Schichtdicke von 0,8 cm (s. 3.1.11).

Zu Dokumentationszwecken wurde das in Ethidiumbromid gefärbte und in H₂O gewaschene Gel mit einem Lineal unter UV-Licht photographiert. Um die DNA effizient auf eine Nylonmembran zu transferieren, musste zuerst die DNA partiell depurinieren werden, wodurch sie in kleinere Fragmente gespalten wurde. Dazu wurde das Gel genau 10 min in 0,25 M HCl_{aq} gelegt. Anschließend wurde das Gel kurz in bidest. H₂O gewaschen, bevor die DNA durch dreimaliges Schwenken für jeweils 20 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl denaturiert wurde. Nach Waschen in bidest. H₂O wurde das Gel durch dreimaliges Schwenken für 20 min in 0,5 M Tris-HCl/1,5 M NaCl neutralisiert. Nach erneutem Waschen in H₂O konnte dann die DNA mittels Kapillarkräften auf eine Nylonmembran transferiert werden.

Kapillartransfer

Für den Kapillartransfer wurde in eine Glasschale, die als Reservoir diente, Transferpuffer gefüllt. Als Unterlage für den Blot diente eine Glasplatte auf der Schale. Über diese wurden wiederum zwei Lagen in Transferpuffer getränkte 3MM-Filterpapiere (Whatmann) so gelegt, dass die Enden der Filterpapiere in die Schale mit dem Transferpuffer ragten. Die Taschen des vorbereiteten Gels wurden mit einem Skalpell abgeschnitten, bevor es mit der Oberseite nach unten auf die Filterpapiere luftblasenfrei gelegt wurde. Damit später kein Flüssigkeitsstrom am Gel vorbeilaufen konnte, wurden die Ränder des Gels mit Parafilm abgedichtet. Auf das Gel wurde jetzt die Nylonmembran (HybondTM-N, Amersham Biosciences), die zuvor in

absolutem Ethanol benetzt und dann in Transferpuffer gewaschen wurde, luftblasenfrei aufgelegt. Auf die Membran wurden noch zwei in Transferpuffer getränkte und zwei trockene 3MM-Filterpapiere deponiert. Auf die Filterpapiere wurde dann ein ca. 8 bis 10 cm hoher Stapel aus Papierhandtüchern gelegt. Den Abschluss bildete eine zweite Glasplatte, die mit einem Gewicht beschwert wurde. Mittels Klebeband wurde die Konstruktion stabilisiert.

Durch die in das Reservoir reichenden Filterpapiere entstand ein Flüssigkeitsstrom, der sich durch das Agarosegel und die aufgelegten Filterpapiere bis in die Handtücher erstreckte. Die DNA wurde dabei vom Transferpuffer mitgenommen, blieb aber in der Nylonmembran hängen. Der ganze Vorgang dauerte bei Raumtemperatur 12 bis 20 h.

Danach wurde die Membran mit der Unterseite nach oben kurz getrocknet, bevor die DNA durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert wurde. Die Membran konnte dann in Haushaltsfolie bei 4 °C aufbewahrt oder direkt hybridisiert werden.

Herstellung einer radioaktiven Sonde

Die Sonden (für AAV ein aus pTAV2-0 mittels HincII gewonnenes Fragment [AAV-2-Nukleotidpositionen 2398 und 3988] und für HSV der *oris*, gewonnen aus pH10 mittels der Restriktionsenzyme Eco-RI und XhoI) wurden mit dem RediprimeTMII Random Prime Labeling System von Amersham Pharmacia Biotech hergestellt. Zuerst wurden etwa 50 bis 100 ng DNA in 45 µl 1xTE-Puffer gelöst und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde die Probe in ein Reaktionsgefäß des Kits pipettiert. Das Gefäß enthielt dATP, dGTP, dTTP, das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I sowie ein Zufallsgemisch von Hexanukleotiden. Die zufällig an die DNA bindenden Hexanukleotide dienten in der Gegenwart des Klenow-Fragments als Primer für die DNA-Synthese. Durch die Zugabe von 5 µl [α -³²P]dCTP (50 µCi) wurde die neu synthetisierte DNA radioaktiv markiert (Feinberg *et al.*, 1983). Der gesamte Ansatz wurde bei 37 °C 1 h inkubiert. In der Zwischenzeit wurde eine Biogel® P10-Säule hergestellt. Dazu wurde in den Boden eines 0,5-ml-Reaktionsgefäßes mit einer heißen Nadel ein Loch gestochen. Anschließend wurde dieses mit Glaswolle ausgestopft. Das Reaktionsgefäß wurde dann in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß gestellt und mit 800 µl in 1xTE äquilibriertem Biogel® P10 gefüllt. Durch Zentrifugation in einer Ausschwingzentrifuge für 8 min bei 666 g wurde das Biogel® gepackt. Das 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde gegen ein neues ausgetauscht. Die radioaktive Probe wurde dann nach der Inkubation auf die Säule gegeben und 15 min zentrifugiert. Dadurch wurden nicht eingebaute Nukleotide abgetrennt. 1 µl des Eluats wurde

mit einem Kontaminationsmonitor ausgezählt. 1 µl sollte mindestens 500 IPS aufweisen. Das restliche Eluat wurde mit 500 µl Hybridisierungslösung 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt.

Hybridisierung

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine Prähybridisierung mit ca. 10 bis 20 ml vorgewärmter Hybridisierungslösung in einer Hybridisierungsröhre, die für mindestens 2 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen inkubiert wurde. Die Lösung enthielt SDS zur Absättigung unspezifischer Bindungen und Formamid zur Senkung der Schmelztemperatur der DNA/DNA-Hybride. Nach dieser Zeit wurde die Hybridisierungslösung durch 5 bis 10 ml frische Hybridisierungslösung ersetzt, welche die radioaktiv markierte Sonde enthielt. Die Membran wurde über Nacht bei 42 °C mit der Sonde hybridisiert. Die DNA-Sonde konnte wieder verwendet werden. Sie wurde bei 4 °C aufbewahrt und vor erneutem Einsatz bei 95 °C aufgekocht und auf Eis abgekühlt.

Am nächsten Tag wurde die Membran 4-mal jeweils 5 min mit 10 bis 15 ml Waschlösung I bei 42 °C gewaschen. Dann erfolgten, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen, zwei Waschungen für 30 min bei 55 °C mit Waschlösung II (stringentes Waschen). Anschließend wurde die Membran auf einem 3MM-Filterpapier getrocknet und für die nachfolgende Autoradiographie in Haushaltsfolie verpackt.

Autoradiographie

Eine Abschätzung der Signalstärke erfolgte mithilfe eines Kontaminationsmonitors. Je nach Messwert erfolgte eine Exposition in einer Expositionskassette mit einem Röntgenfilm zwischen 1 bis 14 Tagen. Bei schwachen Signalen erfolgte die Exposition bei –80 °C mit Verstärkerfolien.

Bei bestimmten Fragestellungen wurde die Menge der entstandenen monomeren und dimeren Replikationsformen mithilfe des Phosphorimagers Storm 840 quantifiziert. Hierfür wurde die Nylonmembran nach Exposition mit einem Röntgenfilm für 1 bis 2 Tage bei Raumtemperatur in eine Expositionskassette mit einem Storage Phosphor Screen (Kodak) gelegt.

3.2 ZELLKULTURTECHNIK

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden HeLa-Zellen, ephitelartige, adhären in Monolayern wachsende humane Cervixcarcinomzellen, verwendet.

Die Zellen wurden in mit FCS und Penicillin/Streptomycin supplementierten Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM, s. 3.2.1) bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5 % in einem Inkubator kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten zum Schutz vor Kontaminationen unter einer Sterilbank.

3.2.1 FÜR DIE ZELLKULTUR VERWENDETE LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN

10xPBS pH 7,4	80 mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
(<i>Phosphate buffered saline</i> ,	20 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
autolaviert für Zellkultur)	1,5 M	NaCl
PBS-T	+ 0,1 % [w/v]	Tween® 20
Vollmedium für HeLa-Zellen	500 ml	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)
	10 %	fetales Kälberserum (hitzeinaktiviert)
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
Trypsin/EDTA	1x	Trypsin/EDTA in autoklaviertem bidest. H ₂ O

3.2.2 AUFTAUEN UND EINFRIEREN VON ZELLEN

Tiefgefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Das Aliquot wurde in eine Kulturflasche mit Vollmedium überführt. Nach Absetzen der Zellen wurde das Medium erneut gewechselt.

Zum Einfrieren wurde eine Zellsuspension (s. 3.2.2) bei 107 g für 5 bis 10 min in einer Ausschwingzentrifuge abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einer eiskalten Lösung aus 10 % Dimethylsulfoxyd in fetalem Kälberserum (FCS) gelöst und zu 1 ml pro Kryoröhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden für 1 bis 2 min auf Eis gestellt und anschließend in Zellstoff gewickelt sowie in einer Plastiktüte verpackt, um ein schonendes Einfrieren zu gewährleisten. Nach einer Inkubation von 24 h bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.2 HALTUNG, PASSAGIEREN UND AUSSÄEN VON HELA-ZELLEN

Zur Zellhaltung von HeLa-Zellen dienen Zellkulturflaschen. Die Zelldichte wurde mit einem Lichtmikroskop bestimmt. Bei Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurde das Vollmedium abgenommen und die Zellen mit auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmtem 1xPBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA überschichtet (4 ml bei einer 75 cm^2 -Flasche und 6 ml bei einer 175 cm^2 -Flasche). Das überschüssige Trypsin/EDTA wurde wieder abgenommen und die Zellen 5 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Abklopfen vom Flaschenboden gelöst und in vorgewärmtem Vollmedium resuspendiert (10 ml bei einer 75 cm^2 -Flasche und 20 ml bei einer 175 cm^2 -Flasche). Vor dem erneuten Aussäen wurde die Zelldichte in einer Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen mit Medium auf die gewünschte Dichte eingestellt. Die verwendeten HeLa-Zellen besaßen eine Verdoppelungszeit von ca. 20 bis 22 h.

3.2.3 CALCIUM-PHOSPHAT-KOTRANSFEKTION NACH CHEN UND OKAYAMA

Lösungen, Puffer und Medien:

2xBBS pH 6,87 - 6,91 (sterilfiltriert)	50 mM	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2- aminoethansulfonsäure (BES)
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
		NaOH zur Titration

DNA/CaCl ₂ /2xBBS-Lösung	12/4/1,5 µg	DNA
(Mengen für 10/6/3,5 cm durch-	450/150/60 µl	220 mM CaCl ₂ (autoklaviert)
messende Zellkulturschalen)	450/150/60 µl	2xBBS pH 6,87 – 6,91

Durchführung:

Die Calcium-Phosphat-Kotransfektion diente dem Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen (Chen *et al.*, 1987, 1988). Für die Transfektion wurden HeLa-Zellen in einem Gesamtvolumen von 10/3/1 ml in 10/6/3,5-cm-Zellkulturschalen ausgesät und für 4 bis 5 h im Brutschrank kultiviert. Sobald sich die Zellen abgesetzt und die ersten Fortsätze ausgebildet hatten, wurde die Transfektion angesetzt.

Hierfür wurde die zu transfizierende DNA mit den entsprechenden Volumina (s.o.) 220 mM CaCl₂-Lösung und 2xBBS-Puffer gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation bildeten sich die Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitate aus, die dann später durch Endozytose in die Zellen gelangten. Anschließend wurde der Ansatz tropfenweise in die Zellkulturschale, welche während des Vorgangs vorsichtig geschwenkt wurde, pipettiert. Nach 20 h im Brutschrank wurde das alte Medium durch frisches Vollmedium ersetzt. Nach weiteren 20 h wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte bzw. die DNA gewonnen.

Um die Transfektionseffizienz beurteilen zu können, wurde in einem Parallelansatz das Plasmid pEYFP-C1 transfiziert, welches das *yellow fluorescent protein* (YFP) codiert, dessen Expression nach ca. 20 bis 40 h unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden konnte. Mit dieser Methode wurden standardmäßig Transfektionseffizienzen von 40 bis 45 % erreicht.

3.2.4 LIPOFEKTION

Für die Lipofektion wurde das Lipofectamine-System der Firma Invitrogen verwendet. Für eine 3 (6) cm durchmessende Kulturschale wurden zwischen 1 bis 2 µg (2 bis 3 µg) DNA mit 100 (250) µl serumfreien Medium und 6 (8) µl PlusTM Reagent gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden 4 (12) µl LipofectamineTM Reagent mit 100 (250) µl serumfreien Medium gemischt und nach der 15 minütigen Inkubationszeit zum Ansatz

hinzugegeben. Während der sich anschließenden zweiten 15 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das serumhaltige Medium von den Zellen genommen und durch 1 (2) ml serumfreies Medium ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde dann tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach einer 3 stündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurden die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und in Vollmedium weiter kultiviert.

3.2.5 INFEKTION VON ZELLEN

HeLa-Zellen wurden mit 50 % der zum Zeitpunkt der Infektion gewünschten Zelldichte in einer Zellkulturschale ausgesät (s. 3.2.2). 24 h später wurde das Medium vollständig abgenommen und die Zellen mit einer entsprechenden Verdünnung des Virusstocks (verdünnt in DMEM ohne Zusätze) in einem Gesamtvolumen von 200 µl für eine 6-cm-Schale für 1 h im Brutschrank kultiviert. Dabei wurden die Zellkulturschalen alle 10 bis 15 min geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Anschließend wurde das virushaltige Medium abgenommen und durch 3 ml Vollmedium bei einer 6-cm-Schale ersetzt.

Nach einer entsprechenden Inkubationszeit im Inkubator konnten die Zellen geerntet und eine Protein- bzw. DNA-Extraktion durchgeführt werden.

3.2.6 TRANSFEKTION MIT ANSCHLIEßENDER INFEKTION

Bei diesem Versuchsansatz wurde eine Transfektion mit einer Infektion kombiniert. Dazu wurden zuerst Zellen in einer Zellkulturschale ausgesät und nach dem Protokoll der Calcium-Phosphat- bzw. Lipofectamintransfektion transfiziert (s. 3.2.3, 3.2.4). 20 bis 23 h später wurde das alte Medium durch frisches Vollmedium ersetzt. Nach einer erneuten Stunde wurde die Infektion, wie sie in 3.2.5 beschrieben wurde, durchgeführt.

3.2.7 EXTRAKTION GENOMISCHER DNA

Lösungen, Puffer und Medien:

3xDNA-Lysepuffer	3 %	N-Lauryl-Sacrosin-Natriumsalz
	70 mM	Tris pH 8,5
	25 mM	EDTA pH 8,0

Durchführung:

Diese Methode diente zur Gewinnung und Reinigung von zellulärer und viraler DNA aus Kulturzellen. Nach ausschließlicher Transfektion konnten die Zellen direkt in den Zellkulturschalen 2-mal mit auf 37 °C aufgewärmten 1xPBS gewaschen und anschließend mit Zellschabern in 1 bis 3 ml 1xPBS abgeschabt werden. Nach Zentrifugation bei 135 g für 5 min wurde das Zellpellet in 300 µl 1xTE resuspendiert. Nach Infektionen lösten sich teilweise die Zellen aufgrund der zytopathologischen Veränderungen durch die Viren. Um diese Zellen nicht zu verlieren, wurden die Zellen direkt im Medium mittels Zellschaber abgelöst, in ein 15-ml-Falcon-Tube überführt und abzentrifugiert (135 g für 5 min). Die Zellen wurden durch 2-malige Resuspension in 1xPBS und erneute Zentrifugation gewaschen. Das nach der dritten Zentrifugation gewonnene Zellpellet wurde dann in 300 µl 1xTE aufgenommen.

Die Zellsuspension wurde anschließend mit 150 µl DNA-Lysepuffer und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) gemischt und bei 56 °C für 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 3 M NaAcetat pH 9,2 und zur Entfernung von Proteinen 500 µl H₂O-gesättigtes, doppelt destilliertes Phenol in den Ansatz gegeben. Der Ansatz wurde 10 min auf dem Überkopfschwenker gemischt und dann bei 3500 g für 5 min abzentrifugiert. Die Oberphase wurde auf 500 µl Phenol/CIA (CIA: Chloroform/Isoamylalkohol 24:1) pipettiert und erneut auf dem Überkopfschwenker gemischt und abzentrifugiert. Zum dritten Reinigungsvorgang wurde die Oberphase mit 500 µl CIA auf dem Überkopfschwenker durchmischt. Nach Zentrifugation (3500 g für 5 min) wurde dann die Oberphase mit dem 2,5-fachen Volumen absolutem Ethanol und 1/10 Volumen NaAcetat pH 5,2 gefällt (s. 3.1.9). Das getrocknete Pellet wurde in 60 µl 1xTE gelöst. 20 µl der DNA-Suspension wurden dann mit DpnI verdaut, wodurch die transfizierte DNA gespalten wurde, während die neu replizierte DNA DpnI-resistent war. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mittels Spektrophotometer bestimmt (s. 3.1.7). 6 µg DNA wurden für die Southern Blot-Analyse eingesetzt (s. 3.1.16).

3.2.8 HIRT-EXTRAKTION (NACH HIRT, 1976)

Lösungen, Puffer und Medien:

Lysepuffer	10 mM	Tris pH 8,0
	1 mM	EDTA
	1 % [w/v]	SDS
	50 µg/ml	Proteinase K

Durchführung:

Bei der Hirt-Extraktion erfolgte eine Anreicherung extrachromosomaler viraler DNA gegenüber chromosomaler hochmolekularer DNA durch eine Salzpräzipitation der letzteren. Dieses Verfahren verbesserte die Ergebnisse der Southern Blot-Analyse, da die Konzentrationsmessungen der DNA in geringerem Maße von hochmolekularer zellulärer DNA verfälscht wurden. Wie bei der Extraktion genomischer DNA wurden bei Transfektionsansätzen die Zellen in der Zellkulturschale 2-mal mit 1xPBS gewaschen, bevor sie in 1 bis 3 ml 1xPBS abgeschabt wurden. Bei Infektionsansätzen wurden die Zellen hingegen zuerst im Medium abgelöst und dann in einem 15-ml-Falcon-Tube 2-mal mit 1xPBS gewaschen (vgl. 3.2.7).

Nach dem zweiten Waschgang wurde das Pellet direkt in 2 ml Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C wurde die Probe auf Eis abgekühlt und unter Vortexen tröpfchenweise mit 500 µl 5 M NaCl-Lösung versetzt. Während der sich anschließenden Übernachtinkubation bei 4 °C setzte sich die hochmolekulare DNA als weißer Niederschlag ab und wurde bei 21612 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand mit der viralen DNA wurde mit 2 ml Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 für 5 min gut gemischt und anschließend für 5 min bei 3500 g zentrifugiert. Die Oberphase wurde dann mit NaAcetat und absolutem Ethanol gefällt (s. 3.1.9). Das gefällte und trockene Pellet wurde in 50 µl 1xTE gelöst und mittels Absorptionsspektrometrie die DNA-Konzentration bestimmt (s. 3.1.7). 6 µg DNA wurden dann mit DpnI verdaut (s. 3.1.10) und im Southern Blot eingesetzt (s. 3.1.16).

3.2.9 PROTEINEXTRAKTION

Lösungen, Puffer und Medien:

2xSDS-Proteinprobenpuffer	0,1 M	Tris/HCl pH 7,5
	2 mM	EDTA
	20 % [v/v]	Glycerin
	4 % [w/v]	SDS
	10 % [w/v]	2-Mercaptoethanol
	0,02 % [w/v]	Bromphenolblau

Durchführung:

Mit dieser Methode wurden Gesamtzellextrakte für die Western Blot-Analyse hergestellt. Bei Transfektionen wurden die Zellen 2-mal mit auf 37 °C vorgewärmten 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen direkt in der Kulturschale mit 2xSDS-Proteinprobenpuffer lysiert (600 µl bei einer 10-cm-Schale, 200 µl bei einer 6-cm-Schale) und nach 10 min mit einem Zellschaber in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Extrakte für 5 min bei 95 °C aufgeköcht und danach auf Eis abgekühlt. Durch Ultraschallbehandlung (Sonifier 450, Branson, Stufe 5, 20 sec) wurde die DNA geschert, wodurch sich das Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel erleichterte (s. 3.3.1).

Nach Infektion wurden die Zellen im Medium abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt, pelletiert und durch Resuspension und erneute Zentrifugation (107 g für 5 min) 2-mal mit 1xPBS gewaschen. Nach der dritten Zentrifugation wurde das Zellpellet direkt in einem entsprechenden Volumen 2xProteinprobenpuffer lysiert und die weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Proben konnten bei -20 °C aufbewahrt werden.

3.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.3.1 DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON PROTEINEN (SDS-PAGE)

Lösungen, Puffer und Medien:

Sammelgel nach Laemmli (10 ml für 4 Mini-Gele):

Acrylamidkonzentration	4,5 %
Rotiophorese Gel 30 (30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid)	1,5 ml
Sammelgelpuffer pH 6,8 (0,75 M Tris/HCl pH 6,8 0,4 % [w/v] SDS)	2,5 ml
bidest. H ₂ O	5,9 ml
10 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS) in bidest. (Polymerisationskatalysator)	100 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Polymerisationsinitiator)	20 µl

Trenngel nach Kornberg (30 ml für 4 Mini-Gele):

Proteingröße in kDA	50 - 200	30 - 120		10 - 60	1,5 - 10	
Acrylamidkonzentration	9 %	10 %	12 %	15 %	18 %	20 %
Rotiophorese Gel 30 (30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid)	9 ml	10 ml	12 ml	15 ml	18 ml	20 ml
Trenngelpuffer pH 8,8 (1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4 % [w/v] SDS)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
bidest. H ₂ O	13,3 ml	12,3 ml	10,3 ml	7,3 ml	4,3 ml	2,3 ml
10 % [w/v] APS in bidest. H ₂ O	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	40 µl	40 µl	40 µl	20 µl	20 µl	10 µl

5xSDS-Laufpuffer pH 8,8	0,25 M	Tris
(pH stellt sich selbst ein)	1,9 M	Glycin
	0,5 % [w/v]	SDS

Durchführung:

Mit dem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidelektrophorese-System nach Laemmli wurden Proteine nach ihrer Molekülgröße elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Hierbei wurden die Proteine zuerst mittels eines Sammelgels vor dem sich anschließendem Trenngel fokussiert, wodurch sich die Proteinbanden im Trenngel schärfer voneinander absetzten.

Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Die Gele wurden mithilfe des Dual Gel Caster Mighty Small SE 246 von Hoefer gegossen. Zuerst wurden die Glasplatte (10 x 8,3 cm) und die Aluminiumplatte (mit Ohren 10 x 8,3 cm) mit Glasreiniger gereinigt. Die Platten wurden dann mit zwei 8,3 cm langen und 1 mm dicken Abstandhaltern in die Gießapparatur eingespannt. Als erstes wurde das noch flüssige Trenngel ca. 5,5 cm hoch zügig zwischen die Platten gegossen. Um die obere Kante des Gels zu begradigen und Luftblasen zu entfernen, wurde das Gel noch mit 1 bis 2 ml Isopropanol überschichtet. Nach ungefähr 30 min war das Gel polymerisiert, sodass das Isopropanol abgegossen werden konnte. Auf das Trenngel wurde jetzt das Sammelgel bis zum Rand der Platten pipettiert. Mittels eines Kammes, der in das noch flüssige Sammelgel kam, wurden Taschen für die Probenbeladung ausgespart. 20 min später war auch das Sammelgel polymerisiert. Das fertige Gel konnte entweder sofort verwendet oder für den späteren Gebrauch in feuchte Tücher und Haushaltsfolie verpackt bei 4 °C bis zu einer Woche gelagert werden.

Gelelektrophorese

Aus dem SDS-Polyacrylamidgel wurde der Kamm gezogen und die obere Kante mit einem feuchten Tuch vorsichtig von Gelresten, welche die Taschen verdeckten, befreit. Anschließend wurde das Gel in eine vertikale Gelkammer eingespannt. Die Puffertanks wurden mit 1xLaufpuffer gefüllt. Nach Beladen der Geltaschen mit den Proteinextrakten wurde für die Fokussierung der Proteine im Sammelgel pro Gel ein Strom von 12 mA angelegt. Bei Erreichen des Trenngels wurde der Strom auf 20 mA pro Gel erhöht. Nach

Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (s. 3.3.2).

3.3.2 WESTERN BLOT MIT IMMUNDETEKTION

Lösungen, Puffer und Medien:

Milch	6 % [w/v]	Milchpulver
	0,3 % [w/v]	Tween® 20 in PBS
Proteintransferpuffer pH 8,0	25 mM	Tris
(pH stellt sich von selbst ein)	192 mM	Glycin
	20 % [v/v]	Methanol

Durchführung:

Beim Western Blot mit Immundetektion wurden die Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, um anschließend einen spezifischen Antigen-nachweis über Antikörper durchzuführen.

Blotten der Proteine

Der Transfer erfolgte durch das Semi-Dry-Elektroblotting-Verfahren, bei dem die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf die Membran transferiert wurden (Towbin *et al.*, 1979). Es wurden 6 3MM-Filterpapiere (Whatmann) und eine Nitrozellulosemembran auf Größe des Gels zurechtgeschnitten. 3 mit Proteintransferpuffer getränkte Filterpapiere und die ebenfalls in Puffer äquilibrierte Membran (Nitrocellulose-Transfermembran BA-85, Schleicher & Schüll) wurden auf die Anode der Blotapparatur gelegt. Das Sammelgel des SDS-Polyarylamidgels wurde abgetrennt und das Trenngel kurz in Proteintransferpuffer geschwenkt, bevor es luftblasenfrei auf die Filterpapiere positioniert wurde. Den Abschluss bildeten die drei restlichen getränkten 3MM-Filterpapiere. Restliche Luftblasen wurden entfernt, indem man mit einer Glaspipette vorsichtig über den Stapel rollte. Die ausgetretene Flüssigkeit wurde von der Anode mit Einwegpapierhandtüchern abgewischt. Dann wurde der Deckel, die Kathode der Blotapparatur, aufgesetzt. Das Blotten erfolgte bei 4 °C bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Gelfläche für 1,5 h. Da sich der Größenmarker bei allen folgenden

Prozeduren wegwaschen ließ, wurde dieser zunächst nach dem Blotten mit wasserfester Farbe nachgezeichnet. Um evtl. an der Membran haftende Acrylamidreste zu entfernen, wurde sie 10 min in PBS-T geschwenkt.

Ponceaurotfärbung

Ponceau-S färbte Proteine auf Nitrocellulose-Blots reversibel und vertrug sich mit einer anschließenden Immunmarkierung. Durch 1-2 minütiges Schwenken in Ponceau-S (1:10 Stammlösung in bidest. H₂O) färbten sich die geblotteten Proteine rot an, wodurch der Blotvorgang überprüft werden konnte. Die enthaltene Trichloressigsäure fixierte die Proteine gleichzeitig zusätzlich auf dem Blot. Bei Bedarf konnte so auch die Nitrozellulosemembran ohne Beschädigungen der Proteinbanden zerschnitten werden. Für die anschließende Antikörpermarkierung musste der Farbstoff erst ausgewaschen werden. Die groben Reste der Farblösung wurden zuerst mit bidest. H₂O entfernt. Dann folgte ein mehrminütiges Schwenken der Membran in PBS, wobei das PBS mehrmals gewechselt werden musste.

Antigennachweis mittels Antikörper

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Milchlösung geschwenkt. Anschließend wurde die Membran möglichst luftblasenfrei mit einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers in Milch in Folie eingeschweißt und 1,5 h auf einem Überkopfschwenker inkubiert. Die mit Antikörpern versetzte Milch konnte bei -20 °C aufbewahrt und wiederverwendet werden. Es folgten, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, 3 Waschungen für 5 min mit PBS-T, bevor die Membran erneut mit der entsprechenden Verdünnung des sekundären Detektionsantikörpers in Milch in Folie eingeschweißt wurde. Als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter Anti-mouse-AK verwendet. Nach erneuter 1,5 stündlicher Inkubation auf dem Überkopfschwenker erfolgten 3 Waschungen für 5 min mit PBS-T, wodurch nicht gebundene Antikörper entfernt wurden. Mittels des Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrates der Firma Pierce wurde die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase spezifisch nachgewiesen. Hierzu mischte man die beiden Komponenten des Kits, Peroxidase Solution und Enhancer Solution, im Verhältnis 1:1 und inkubierte die Membran für 60 sec in dieser Lösung. Die Membran wurde anschließend in Folie gelegt und durch leichten Druck auf die Folie von überschüssiger Lösung befreit. Durch die lichtaussendende Peroxidase-reaktion, bei der Luminol entstand, konnte ein Röntgenfilm entsprechend den Immunreaktionen belichtet werden. Abschließend

wurde der nachgezeichnete Größenmarker von der Nitrozellulosemembran auf den entwickelten Röntgenfilm übertragen.

3.3.3 IMMUNFLUORESZENZ

Lösungen, Puffer und Medien:

Elvanol pH 7,4 mit DABCO	133 g/l	Polyvinylalkohol 30000–70000
	133 mM	Tris-HCl pH 8,5
	30 % [v/v]	Glycerin
	1 % [w/v]	1,4 Diazobicyclo-[2.2.2.]-octan (DABCO)

Durchführung:

Mittels Immunfluoreszenz wurde die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen in Kulturschalen auf Deckgläschen der Größe 18 x 18 mm ausgesät. Nach Transfektion oder Infektion (s. 3.2.3, 3.2.4, 3.2.5) und einer entsprechenden Inkubationsdauer wurden die Deckgläschen aus der Schale genommen und zum Abtropfen über ein Papiertuch (Kleenex) gehalten. Dann wurden sie in ein Trägernetz überführt und mit 1xPBS pH 7,4 gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen auf den Deckgläschen mittels 3,7 % [v/v] Formaldehyd/1xPBS-Lösung fixiert. Nach erneutem Waschen in 1xPBS wurden die Deckgläschen in 1 % [v/v] Triton X-100/1xPBS-Lösung gelegt. Dadurch wurden die Zellmembranen perforiert, sodass später die Antikörper in die Zellen gelangen konnten. 10 min später wurden die Deckgläschen noch einmal in 1xPBS gewaschen und nach dem Abtropfen in eine feuchte Kammer transferiert. Diese bestand aus einer verschließbaren Plastikschale mit 2 3MM-Filterpapieren (Whatmann), welche mit bidest. H₂O benetzt wurden, und einer Schicht Parafilm. Auf dem Parafilm wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben gelegt und mit 130 µl Primärantikörper/1xPBS/2 % FCS-Lösung pro Deckglas für 45 bis 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläschen wurden auf Kleenex abgetropft, in das Trägernetz transferiert und 3-mal in 1xPBS gewaschen. Die Inkubation mit dem in 1xPBS/2 % FCS verdünnten fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper wurde erneut in einer feuchten Kammer für 15 bis 30 min durchgeführt. Nach 3

abschließenden 5 minütigen Waschgängen in 1xPBS sowie Abtropfen wurden die Deckgläschen mit der Zellschicht nach unten auf Objektträgern in Elvanol eingebettet.

Die Immunfluoreszenzbilder dieser Arbeit wurden mit dem konfokalem Zeiss LSM Fluoreszenzmikroskop angefertigt. Dabei wurden die Zellen in 0,6 µm dicke Schichten unterteilt, diese mit verschiedenen Lasern spezifisch angeregt und durch ein 63x/1,4 oil DIC-Objektiv eingescannt. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit den Programmen IPLab Scientific Imaging Software Version 3.5 (Scanalytics Inc.) und LSM Image Browser (Zeiss).

