

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Bakterienstämme

DH10B	F ⁻ , <i>mcrA</i> λ -(<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>), f80 <i>dlacZ</i> ? M15, λ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , λ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i> (Gibco BRL).
SCS1-pSE111	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> (Stratagene) enthält Plasmid pSE111 mit <i>lacI^q</i> -Repressorgen und <i>argU</i> -Gen für seltene Arginin tRNA (Büssow et al., 1998).

4.1.2 Zelllinien

COS-1	Fibroblasten-ähnliche Zellen, die in adhärennten Monolayern wachsen; Nierenzellen des afrikanischen grünen Affen, transformiert mit einer Replikationsursprungs-defekten Mutante von SV-40; Wirtszelle für die Vermehrung von rekombinanten SV-Viren (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).
293	Fibroblasten-ähnliche Zellen, die in adhärennten Monolayern wachsen; humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit fragmentierter DNA von Adenovirus Typ 5 (DSMZ).
HeLa	Epithelial-ähnliche Zellen, die in adhärennten Monolayern wachsen; humane cervicale Zellen aus einem Adenocarcinom (DSMZ).
293 Tet-Off TM	Fibroblasten-ähnliche Zellen, die in adhärennten Monolayern wachsen; genetisch manipulierte humane embryonale Nierenzellen, die den Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator tTA stabil exprimieren (Clontech).

4.1.3 Plasmidvektoren

pBluescript Klonierungsvektor der Firma Stratagene mit ColE1 Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli*; β -Lactamasegen, T7- und T3-Promotoren sowie *lacZ*-Gen zum Durchmustern von Transformanten nach dem Blau/Weiß-Kriterium; hier als Träger-DNA für die Transfektion von Säugetierzellen verwendet.

pTetCMV-F^o Ein Doppelstrangoligonukleotid, das die Flag-Epitop Sequenz enthält, wurde so in den Vektor pTRE kloniert, daß die ursprüngliche Flag-Sequenz mit zusätzlicher Kinase-Phosphorylierungsstelle ersetzt wurde (Wu and Chiang, 1996). Das resultierende Plasmid, pTetCMV-F^o, ist ein „Antwort“-Plasmid für die Expression von Genen im Tet-Off System mit dem Tet-reaktiven P_{hCMV*-1}-Promotor, der das Tet-reaktive Element TRE aus 7 Kopien der bakteriellen Tet-Operatorsequenz (*tetO*) enthält. Das TRE-Element befindet sich 5' des minimalen CMV-Promotors (P_{minCMV}), dem das Verstärkerelement des vollständigen CMV-Promotors fehlt und daher ohne Bindung von TetR an die *tetO*-Sequenzen nicht aktiv ist (Abbildung 1).

pTetCMV-Hyg

In den Vektor pTetCMV-F^o wurde eine neue Multiple Klonierungsstelle mit den Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *NdeI*, *BamHI*, *SphI*, *Sall*, *EcoRV*, *NotI* und *PstI* 3' des Flag-Tags ligiert. Das Hygromycinresistenzgen wurde zusammen mit dem HSV TK-Promotor aus dem Plasmid pTK-Hyg (Clontech) PCR-amplifiziert und gegen den Uhrzeigersinn in den modifizierten pTetCMV-F^o Vektor in die singuläre *XhoI* Restriktionserkennungsstelle eingesetzt. Der so entstandene Vektor, pTetCMV-Hyg, wurde dazu verwendet, HD Exon 1 Fragmente in Tet-Off Zellen stabil für die induzierbare Expression zu integrieren und gleichzeitig mit Hygromycin auf die stabile Integration des Plasmids in das Zellgenom zu selektionieren.

pTK-Hyg Selektionsvektor, der Hygromycinresistenz für die Selektion von stabil transfektierten Zellen in Säugetierzellen vermittelt (Clontech).

pTL1 Derivat des Vektors pSG5 mit einem SV40 frühen-Promotor für die *in vivo* Proteinexpression und einem T7-Promotor für die *in vitro* Expression (Stratagene). Veränderung durch Einführung einer größeren Multiplen Klonierungsstelle mit Erkennungsstellen für *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *XhoI*, *NotI*, *SmaI*, *PstI*, *SacI*, *KpnI* und *BglII*.

pTL1-HA1, -HA2 und -HA3

pTL1 mit 5' der Klonierungsstelle eingefügtem HA-Epitop für die Detektion von exprimierten Proteinen mit dem monoklonalen HA-Antikörper; in allen drei Leserahmen vorhanden.

pQE30, 31 und 32

Auf pBR322 basierende Expressionvektoren mit dem starken Phagen T5-Promotor und zwei *lac*-Operatorsequenzen für die IPTG-induzierbare Expression rekombinanter Proteine mit einem N-terminalen His₆-tag (Qiagen); in allen drei Leserastern vorhanden.

pQE32N Derivat des Plasmids pQE32 (Qiagen); ein synthetisches Oligonukleotid, das die Restriktionsschnittstellen *BglII* und *NotI* trägt, wurde in die im Multilinker vorhandene *PstI* Schnittstelle eingefügt und diese dabei zerstört.

pGEX-5X-1, pGEX-6P-1

Glutathion S-Transferase (GST)-Genfusionsvektoren mit dem synthetischen *tac*-Promotor für die IPTG-induzierbare, hohe Expression von GST-Fusionsproteinen; enthalten internes *lacI^q*-Repressorgen für die Benutzung in jedem *E. coli* Stamm. Die Fusionsproteine enthalten eine Erkennungsstelle für Faktor Xa bzw. PreScission Protease (Pharmacia Biochem).

4.1.4 Medien und Puffer

LB-Medium

10 g Trypton

5 g Hefe Extrakt

10 g NaCl ad 1 l aqua bidest

Für die Herstellung von LB-Platten 2% Agar zusetzen.

SOB⁻

20 g Trypton

5 g Hefe Extrakt

0,584 g NaCl

0,186 g KCl ad 1l aqua bidest

TY Medium

5 g Hefe Extrakt

10 g Trypton

5 g NaCl ad 1 l aqua bidest

TBS

20 mM Tris/HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

TBS-T

20 mM Tris/HCl, pH 7,5

150 mM NaCl

0,05% (v/v) Tween 20

TE

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

1 mM EDTA (pH 8,0)

10x PBS

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g KH₂PO₄ ad 1 l aqua bidest

Medien für Zellkultur:

- Minimum Essential Medium (MEM), mit Earle`s Salzen, ohne L-Glutamin (Life Technologies)
- Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM), mit Natriumpyruvat und Pyridoxin (Life Technologies)
- Fötales Kälberserum aus Südamerika (Life Technologies)

4.1.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Funktion
pTetCMV-OL3	TATGGGGATCCGCATGCC GTCGACGATATCGCGGCC GCCGCTGCAGA	neue MCS in pTetCMV-F ^o
pTetCMV-OL4	GATCTCTGCAGCGGCGGC CGCGATATCGTCGACGGC ATGCGGATCCCCA	neue MCS in pTetCMV-F ^o
Hyg-P-HSV	CCGCTCGAGGAGTGGTGA ATCCGTTAG	Primer 5´ zum pTK-Hyg-Gen
Hyg-polyA	CCGCTCGAGAGCCCAAGC TTGGCACTG	Primer 3´ zum pTK-Hyg-Gen
OL1-Kozak	CTCGAGGATCCGCCACCA TGC	Kozak-Sequenz und Startcodon für HIP1 (218-604), Sense Strang
OL2-Kozak	GAGCTCCTAGGCGGTGGT ACGCTAGG	Kozak-Sequenz und Startcodon für HIP1 (218-604), Antisense Strang
HIP1-1	CGGGATCCATGGATGTGA GCAAGATGACTG	Sense PCR-Primer für HIP1 ab Codon 1

HIP1-Talin, revers	AAATATGCGGCCGCTCAT TCTTTTTTCGGTTACCACTT CTTGC	Antisense PCR-Primer für HIP1, Codon 1003
HIP1-W, revers	ATAAGAATGCGGCCGCTC AGTCTTGTATCACCTGCTC CGC	Antisense PCR-Primer für HIP1, Codon 604
HIP1-DxF, revers	AAATATGCGGCCGCTCAA CCATTTTGACTGTTGAAAT TGAAGG	Antisense PCR-Primer für HIP1, Codon 333
HIP1-ENTH, revers	ATAAGAATGCGGCCGCTC AGAGGCAGGAGTGGAGTT TGAAGAG	Antisense PCR-Primer für HIP1, Codon 217
HIP1-218	ACGCGTCGACCAGCTGAC ACCCTGCAAGGCCAC	Sense PCR-Primer für HIP1 ab Codon 218
HIP1-333	ACGCGTCGACGTGTGAAC AAGGATGAGAAGGACC	Sense PCR-Primer für HIP1 ab Codon 333
pGEX5-forward	TATAGCATGGCCTTTGCA GG	Sequenzierprimer für pGEX-Vektoren, forward
pGEX5-revers	TGTCAGAGGTTTTACCG TC	Sequenzierprimer für pGEX-Vektoren, revers
CMV	GGCGTGTACGGTGGGAGG CCTATA	Sequenzierprimer für pTetCMV-Vektoren, forward
SV40poly-A	TACAAATAAAGCAATAGC ATCACA	Sequenzierprimer für pTetCMV-Vektoren, revers
pSG5-forward, T7-90	TCTGCTAACCATGTTTCATG CC	Sequenzierprimer für pTL1-Vektoren, forward
pSG5-revers-90	GGACAAACCACAACACTAGA ATG	Sequenzierprimer für pTL1-Vektoren, revers

Die aufgelisteten Oligodesoxyribonukleotide wurden von der MPI Servicegruppe oder der Fa. TIB Molbiol synthetisiert.

4.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper	Spezies	Herkunft
anti-RGS-His	Maus	Qiagen
anti-Huntingtin (CAG53b)	Kaninchen	eigene Herstellung
anti-Huntingtin (HD1)	Kaninchen	eigene Herstellung
anti-14-3-3ε	Kaninchen	eigene Herstellung
anti-α-Synuclein	Kaninchen	eigene Herstellung
anti-GST	Ziege	Sigma
anti-γ-Tubulin	Maus	Sigma
anti-Vimentin, Klon V9	Maus	Sigma
anti-Flag	Maus	Sigma
anti-11S, regulatorische Untereinheit α (PA28α)	Kaninchen	Affiniti Research
anti-19S, Regulator (nicht ATPase S10a)	Kaninchen	Affiniti Research
anti-20S, Proteasomenkernkomponente	Kaninchen	Affiniti Research
anti-BiP/Grp78 IgG2A	Maus	Transduction Laboratories
anti-Hsp40 (C-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
anti-Hsp70 (CA)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
anti-TIA-1 IgG1 (ML-29)	Maus	Dr. N. Kedersha, Boston
anti-α-Mannosidase II	Kaninchen	Dr. M. G. Farquhar, San Diego
anti-Ubiquitin	Kaninchen	Dako
anti-Clathrin HC	Maus	Biodesign
anti-Clathrin HC (C-20)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
anti-α-Adaptin A und C (A-19)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology
anti-α-Adaptin A	Maus	Transduction Laboratories

Sekundäre Antikörper	Konjugiert mit	Spezies	Herkunft
anti-Maus IgG	CY3 oder FITC	Esel	Jackson ImmunoResearch
anti-Kaninchen IgG	CY3 oder FITC	Esel	Jackson ImmunoResearch
anti-Ziege IgG	Alexa546	Esel	Molecular Probes
anti-Kaninchen IgG	alkalischer Phosphatase	Ziege	Boehringer Mannheim
anti-Kaninchen IgG	kolloidalem Gold, 5 oder 10 nm	Ziege	British BioCell
anti-Ziege IgG	kolloidalem Gold, 10 nm	Kaninchen	British BioCell

4.1.7 Enzyme, Proteine und DNA

1 kb DNA-Marker	Gibco BRL
Albumin aus Rinderserum, Fraktion V (BSA)	Sigma
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm	Boehringer Mannheim
Benzonase	Merck
DNaseI	Boehringer Mannheim
Lysozym	Boehringer Mannheim
pBluescript	Stratagene
Polymerasen:	
AmpliTaq DNA Polymerase FS zur Sequenzierung	Perkin Elmer
Expand TM Long Template PCR System, Mischung aus den thermostabilen Taq und Pwo DNA Polymerasen für die PCR	Boehringer Mannheim
Proteingrößenstandard	Boehringer Mannheim
Protein Größenstandard, vorgefärbt	Gibco BRL

Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Trypsin	Gibco BRL

4.1.8 Chemikalien und Säulenmaterialien

30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth
Agarose	Gibco BRL
Ammoniumpersulfat	BioRad
Ampicillin-Trihydrat	Sigma
AttoPhos	JBL Scientific
Bis-Benzimid (DAPI)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck
Cäsiumchlorid	Gibco BRL
Chloroform	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithioerythritol (DTE)	Serva
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Essigsäure	Merck
Ethanol, absolut	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ficoll Typ 400	Pharmacia Biochem
Freund Adjuvans, komplett	Difco Laboratories
Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml	Sigma
G418-Sulfat, Geneticin	Calbiochem
Glutathion, reduziert	Sigma
Glutathion-Agarose	Sigma
Glycerin, wasserfrei	Merck
Guanidiumhydrochlorid	Sigma
Hi-Trap Protein A-Säule	Pharmacia Biochem
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma

Imidazol	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Sigma
clasto-Lactacystin- β -Lacton	Affiniti Research Products
Kanamycin A-Monosulfat	Sigma
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma
3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumfluorid	Merck
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Paraformaldehyd	Sigma
10000 Einheiten/ml Penicillin G und 10000 μ g/ml	
Streptomycinsulfat in 0,85% Saline	Life Technologies
Phenol, in TE äquillibriert	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Poly-L-Lysin Lösung, 0,1% (w/v) in aqua bidest	Sigma
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma
Ponceau S-Lösung	Fluka
2-Propanol	Merck
Propylgallat	Aldrich
Serva Blau G	Serva
TEMED	Life Technologies
Thiamin, Vitamin B1	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma
p-t-Octylphenyl-polyoxyethylen (Triton X-100)	Sigma
Trypan Blau	Sigma
XTT	Roche Molecular Biochemicals
Xylencyanol FF	Serva

Alle anorganischen Salze, Säuren, Basen, Lösungsmittel und Alkohole waren „pro analysi“ Qualität von Merck.

4.1.9 Kits

ABI PRISM™ Dye Terminator, Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
Bradford Proteinassay Kit	BioRad
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Western Blot Chemilumineszenz Reagenz Plus	NEN™ Life Science Products

4.1.10 Laborausstattung, Geräte und Zubehör

Agarosegelkammer (Flachbett)	Pharmacia Biotech
Analysenwaage AT 250	Mettler Analytik
Ausstattung für SDS-Gelelektrophorese und Blotten von Gelen	BioRad
Autoklav GE 666 AC-1	Getinge
Brutschränke	Heraeus
Celluloseacetatmembran (0,2 µM)	Schleicher und Schüll
Dialysefilter (0,025 µM)	Millipore
Dialyseschläuche, Molekulargewichtausschlußgröße 3500 Da	Spectra/POR
Einmal-Impfösen	Nunc
Einschweißgerät für Zentrifugenröhrchen	Beckmann
Einweg-Säulen, 1,6 cm im Durchmesser	Qiagen
Einweg-Skalpell	Braun
Elektroporationsküvetten	BioRad
Elisa-Reader Spectra Max 250	Molecular Devices
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa

Faltenfilter	Schleicher und Schüll
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Zeiss
Glasplatten	Glasbläser, MPI
Heizblock	Eppendorf
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific
Kanülen, 20G	Becton-Dickinson
Kryo Einfriercontainer	Nalgene
Kunststoffküvetten	Sarstedt
Laborhandschuhe	Latech
Leighton Röhrchen	Costar
Lichtmikroskop CK2	Olympus
Magnetrührer	IKA-Combimag- REO
Massenspektrometer Reflex II MALDI-TOF	Bruker Franzen
Mikrotiterplatten	Genetix
Mikrowelle	AEG
Nitrocellulosemembran (0,2 µM)	Schleicher und Schüll
Objektträger, Deckgläschen	Brand
Pasteurpipetten	Brand
PCR Maschine PTC-200	MJ Research
Petrischalen (Ø 60, 100, 145 mm)	Greiner
pH-Meter	Radiometer Copenhagen
Pipetboy	Hirschmann
Pipetten, einstellbar	Gilson
Pipettenspitzen	Gilson
Plastikplättchen (Ø 13 mm)	Thermanox
Power Supply	Werkstatt MPI
Präzisionswaage PM3000	Mettler
Quarzglasküvetten	Hellmer
Reaktionsgefäße	Eppendorf

Röntgenfilme X-OMAT AR	Kodak
Saran Verpackungsfolie	The Dow Chemical
Schüttler für Westernblots (Rocky)	CTF Labortechnik Scientific
SpeedVac SC110	Savant
Spektralphotometer Ultraspec 3000	Pharmacia Biotech
Spritzen, 1 ml und 5 ml	Once
Sterile Pipetten	Becton-Dickinson
Thermocycler für Sequenzierung	ABI
Tiefkühler, -20°C	Bosch
Tiefkühler, -80°C	ReCon
Ultrastab Homogenisierer W250	Branson
UV-Tisch (365 nm)	Vilbert Lourmat
UV-Transilluminator mit Videokamera	Herolab
Vortex	Scientific Industries
Wasserbad	Haake S
Wasserbadschüttler	New Brunswick Scientific
Whatman Papier, 3MM Chr	Whatman
Zählkammer nach Neubauer, geschliffenes Deckgläschen	neo-Lab
Zell Elektroporator Gene Pulser II	BioRad
Zellenkratzer	Costar
Zellkulturflaschen, 75 und 25 cm ²	Biochrom
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge Z361	Hermle
Sorvall Super T21	Sorvall
Sorvall Superspeed RC2-b (Rotoren: GSA, SS34)	Sorvall
Beckmann J6-HC (Rotor JS-4.2)	Beckmann
Airfuge	Beckmann
Ultrazentrifuge L8-M (Rotoren: TI50, NVT 65.2)	Beckmann
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Zentrifugenröhrchen, Polyallomer, 13 x 51 mm	Beckmann

4.2 Methoden

4.2.1 Grundlegende molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 DNA-Plasmidpräparation mit Qiagen-Kits

Plasmid-DNA wurde aus Bakterienkulturen mittels des Qiaprep spin Miniprep Kits oder Qiafilter Plasmid Maxi Kits nach Angaben des Herstellers gewonnen. Das Bakterienpellet wird dabei mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, die Proteine gefällt und anschließend die DNA über eine Säule gereinigt und konzentriert.

Für die Minipräparation wurden 2 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin (bei Amplifikation eines Plasmids mit β-Lactamasegen), für die Maxipräparation 200 ml LB + 100 µg/ml Ampicillin mit einer Bakterieneinzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C und 250 rpm im Warmluftschüttler inkubiert. Die Bakterien wurden 10-15 min bei 14000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge) beziehungsweise 7000 rpm (Sorvall Zentrifuge, GSA-Rotor) sedimentiert und in 250 µl bzw. 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 250 µl bzw. 10 ml Puffer P2, und anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 350 µl bzw. 10 ml Puffer P3 präzipitiert. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation oder einen Filter entfernt. Bei der Minipräparation wurde der Überstand auf eine Säule mit einer Matrix aus mit Diethylaminoethanol (DEAE) beschichteten Silicakugeln gegeben, durchzentrifugiert und die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Der PE-Puffer wurde durch einen zweiten Zentrifugationsschritt restlos entfernt und die Plasmid-DNA mit 50 µl H₂O eluiert. Bei der Maxipräparation wurde die Säule zunächst mit 10 ml Puffer QBT äquillibriert, dann erfolgte der Auftrag des Überstandes nach der Proteinfällung. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die eluierte DNA wurde mit 10,5 ml Isopropanol gefällt und bei 15000 x g 30 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend in 1x TE aufgenommen.

Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

Puffer 1

50 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNaseA

Puffer 2

200 mM NaOH
1% SDS

Puffer 3

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Puffer QBT

Puffer QC

Puffer QF

750 mM NaCl	1 M NaCl	1,25 M NaCl
50 mM MOPS/NaOH, pH 7,0	50 mM MOPS/NaOH, pH 7,0	50 mM Tris/HCl, pH 8,5
15% Isopropanol	15% Isopropanol	15% Isopropanol
0,15 % Triton X-100		

4.2.1.2 DNA-Plasmidpräparation über CsCl-Gradient

Für die Transfektion von Säugetierzellen mit der Calciumphosphat-DNA-Präzipitationsmethode wird DNA hoher Reinheit und ohne kontaminierende bakterielle DNA sowie ohne bakterielle Endotoxine benötigt, um die Bildung eines gleichmäßigen Präzipitats zu gewährleisten. Aus diesem Grunde wurden diese Plasmide auf einem CsCl-Gradienten gereinigt.

Bakterien aus 200 ml einer Übernachtskultur wurden bei 4000 rpm (Sorvall Zentrifuge, GSA-Rotor) für 10 min abzentrifugiert und das Pellet wurde in 7,5 ml Puffer I resuspendiert. 4 mg Lysozym in 0,5 ml Puffer I wurden zugegeben und die Zellen 15 min bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zugabe von 16 ml Puffer II wurde die Probe 5 min auf Eis inkubiert, dann wurden 8 ml kalter Puffer III zugegeben und nach sofortigem Vermischen wurde erneut 15 min auf Eis inkubiert. Es wurden 2 ml aqua bidest zugegeben, und die Proteinpräzipitate 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Gaze in 50 ml Falcon Röhrchen filtriert und die DNA mit 0,6 Volumen Isopropanol gefällt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA 15 min bei 4000 rpm abzentrifugiert und in 3,5 ml TE, dem 22 µl 1 M Tris-Base, 27 µl 0,5 M EDTA und 4,4 g CsCl zugesetzt wurden, gelöst. Es wurden 150 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung zugegeben, und die Lösungen in Polyallomerröhrchen überführt, sorgfältig gegeneinander austariert und verschweißt. Es folgte eine Zentrifugation für 18-20 h bei 47500 rpm (Beckmann Ultrazentrifuge L8-M, Rotor NVT 65.2) und 20°C ohne Abbremsung des Rotors am Ende des Laufes. Die DNA-Bande wurde mit einer 5 ml Spritze durch seitliches Anstechen des Röhrchens geerntet und zunächst etwa viermal mit Isopropanol, das mit NaCl gesättigt war, ausgeschüttelt, um das Ethidiumbromid zu entfernen. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA für 30 min bei -20°C, und nach Waschen des DNA Pellets wurde dieses in 400 µl TE aufgenommen. Einer Behandlung mit 0,1 mg/ml RNase für 30 min bei 37°C folgte eine Behandlung mit Proteinase K (1 mg/ml) für weitere 60 min. Nach Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanol-fällung wurde die DNA lyophilisiert und je nach Pelletgröße in 200-400 µl TE resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Puffer I

Puffer II

Puffer III

50 mM Sucrose	1% SDS	3 M Kaliumacetat
25 mM Tris/HCl, pH 8,0	0,2 M NaOH	2 M Essigsäure
10 mM EDTA		

4.2.1.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration wäßriger DNA-Lösungen wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Basen der Nukleinsäuren haben bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum, die meisten Proteine jedoch bei einer Wellenlänge von 280 nm. Eine Adsorption (A_{260}) von 1,0 entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA. Ist der Quotient $A_{260}/A_{280} \sim 2$, gilt die DNA-Lösung als rein.

4.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsenzyme wurden in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Für den Verdau von 1 µg DNA wurde 1 U Enzym verwendet. Die Reaktionsansätze (10-20 µl) wurden 1-2 h bei 37°C inkubiert. Bei einem präparativen Verdau wurden 5 µg DNA mit 5 U Enzym in einem Reaktionsvolumen von 100 µl inkubiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 10x Probenpuffer wurde der Reaktionsansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und die DNA-Fragmente wie unter 4.2.1.7 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt.

4.2.1.5 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Um die Selbstligation eines Vektors, der durch Öffnung mit einem Restriktionsenzym identische Enden enthält, zu verhindern, wurden die DNA 5'- Phosphatester hydrolysiert. Der Reaktionsansatz (50 µl) enthielt: 5 µl 10x CIP-Puffer, 1 µl (1 U) Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) und ca. 2 µg DNA. Nach Inkubation von 30 min bei 37°C wurde ein weiterer µl Phosphatase zugegeben und noch einmal 30 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit dem Qiagen PCR-Purification-Kit gereinigt.

10x CIP-Puffer

0,5 M Tris/HCl, pH 8,5
1 mM EDTA

4.2.1.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Mit dem PCR-Purification-Kit kann Einzel- und Doppelstrang-DNA mit einer Größe von 100 bp bis 10 kb aus Reaktionsansätzen von kontaminierenden Enzymen und Salzen abgetrennt werden. Der Reaktionsansatz wurde mit 5 Volumen PB-Puffer versetzt, auf eine Spin-Säule aufgetragen und durchzentrifugiert. Nach Waschen der Säule mit 750 µl Puffer PE wurde die DNA mit 50 µl H₂O eluiert.

Säulenmaterial, PB und PE-Puffer: Produktgeheimnis der Firma Qiagen

4.2.1.7 DNA Agarose-Gelelektrophorese

In einem horizontalen Agarosegel können DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Konzentration des Agarosegels variierte je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwischen 0,8-1,5% (w/v). Zusätzlich zum Laufpuffer enthielt das Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei Raumtemperatur mit konstanter Spannung (10 V/cm) für 0,5-1,5 Stunden. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen 10x Probenpuffer versetzt, der die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol FF enthält, mit deren Hilfe sich die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente abschätzen läßt. Als Größenstandard wurden 0,5 µg der 1 kb-Leiter von Gibco BRL mitaufgetragen. Nach erfolgter Auftrennung wurde die DNA auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht und mit dem Herolab Geldokumentationssystem photographiert.

1x TAE

40 mM Tris-Acetat, pH 8,0

1 mM EDTA

10x Probenpuffer

0,42% Bromphenolblau

0,42% Xylencyanol FF

25% Ficoll Typ 400

in aqua bidest, lagern bei 4°C

DNA-Größen-Standard

50 µl 1 kb-Leiter (1 µg/ml)

10 µl 4 M NaCl

100 µl 10x Probenpuffer

840 µl 1x TE

4.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolierung von Fragmenten zur Klonierung wurden die Reaktionsansätze nach dem Verdau auf ein präparatives Agarosegel mit einer 10 cm langen Trennstrecke aufgetragen. Nach erfolgter Trennung wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus dem Gel ausgeschnitten, um keine UV-induzierten Mutationen in die DNA einzuführen. Mit Hilfe des Gel-Extraktionskits der Firma Qiagen wurde die DNA aus der Agarose isoliert. Dazu wurde die Agarose in 3 Volumen Puffer QX1 aufgenommen, und nach Zugabe von 20 µl einer Glasmilchsuspension (QIAEX II) wurde die Agarose durch Inkubation für 10 min bei 50°C geschmolzen. Die an die Glasmilch gebundene DNA wurde abzentrifugiert und nacheinander mit Puffer QX1 und PE gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und die DNA mit 20 µl H₂O von der Glasmilch eluiert.

Puffer QX1, PE und QIAEX II: Produktgeheimnisse der Firma Qiagen

4.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor mit identischen kohäsiven Enden zu ligieren, wurden Fragment und Vektor in einem molekularen Verhältnis von ungefähr 3:1 gemischt. Ein typischer Reaktionsansatz (10 µl) enthält 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl (400 U) T4-Ligase und ca. 1 µg DNA. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16°C. Zur Kontrolle wurde der Vektor alleine mit T4-Ligase inkubiert, um die Religationsrate zu bestimmen.

Die Ligationsansätze wurden anschließend 1-2 h auf Dialysefilter (0,025 µm Porengröße), die in Petrischalen gefüllt mit destilliertem Wasser schwammen, pipettiert und 1-2 h bei 4°C dialysiert. Ein Teil des Ligationsansatzes wurde dann in *E. coli* Zellen transformiert.

10x Ligasepuffer

500 mM Tris/HCl, pH 7,5

100 mM MgCl₂

100 mM DTT

10 mM ATP

250 µg/ml BSA

4.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird die DNA, die als Vorlage dient, zunächst für Sekunden bis Minuten bei hoher Temperatur denaturiert. Nach Abkühlen auf die Annealingtemperatur können dann Oligonukleotide, die komplementär zur Vorlage sind und einen bestimmten Abschnitt der DNA flankieren, an die denaturierte DNA binden. Im nächsten Schritt wird jedes gebundene Oligonukleotid von einer temperaturstabilen DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für die Synthese eines komplementären DNA-Einzelstranges benutzt. Dieser Prozeß wird 30-40mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnittes kommt.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden die thermostabilen Polymerasen AmpliTaq DNA Polymerase FS (Perkin Elmer) oder eine Mischung aus Taq und Pwo DNA Polymerasen (Boehringer Mannheim) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen eingesetzt.

4.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode von Sanger mit dem ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit der Firma Perkin Elmer. Die Dideoxy-Analoga der vier verschiedenen Desoxyribonukleotide (dNTPs) sind jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff kovalent verbunden. Die Kettenverlängerungsreaktion kann somit in einem einzigen Reaktionsgefäß mit allen vier ddNTPs durchgeführt werden und in einer einzigen Laufspur auf einem Sequenzierungsgel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei entsteht eine Serie von Banden, deren Fluoreszenzspektren sukzessive die Basenfolge der sequenzierten DNA repräsentiert.

4.2.1.12 Plasmidkonstruktionen

4.2.1.12.1 pTet-CMV-Hyg-CAG20, -CAG51 und -CAG83

HD Exon 1 Fragmente mit 20, 51 und 83 CAG Wiederholungen wurden aus den Plasmiden pCAG20, pCAG51 und pCAG83 (Scherzinger et al., 1997) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I ausgeschnitten und in die *Bam*HI und *Sal*I Stellen des pTetCMV-Hyg Vektors kloniert, was zu den Plasmiden pTetCMV-Hyg-CAG20, -CAG51 und -CAG83 führte. Die in den neuen Plasmiden vorhandene Anzahl von CAG-Wiederholungen wurde durch Sequenzierung bestätigt.

4.2.1.12.2 HIP1-Plasmide

4.2.1.12.2.1 pTL1-HIP1 (218-604)

Das Plasmid pGAD-HIP1,2 (Wanker et al., 1997) wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I geöffnet und nach Zugabe der Linker OL1-Kozak und OL2-Kozak (siehe Tabelle Oligonukleotide) religiert. Aus dem entstandenen Plasmid wurde das mit einer Kozak-Sequenz versehene HIP1 Fragment mit *Bam*HI und *Hind*III ausgeschnitten und in den Vektor pTL1 in dieselben Schnittstellen eingesetzt.

4.2.1.12.2.2 pGEX-HIP1 (218-604)

Aus dem Plasmid pQE32-HIP1 (Wanker et al., 1997) wurde ein 1,2 kb HIP1 cDNA Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I ausgeschnitten und in den Vektor pGEX-5X-1 in dieselben Schnittstellen eingesetzt.

4.2.1.12.2.3 pGEX-6P-1-HIP1, pQE32-HIP1 und pTL1-HA3-HIP1 (1-1003), (1-604), (1-333), (1-217), (218-604) und (334-604)

Für die Herstellung dieser Plasmide wurden die entsprechenden HIP1 DNA-Segmente aus einem Plasmid mit der vollständigen HIP1 DNA-Sequenz, die für die Aminosäuren 1-1003 kodiert und freundlicherweise von M. Hayden (Centre for Molecular Medicine and Therapeutics, University of British Columbia, Canada) zur Verfügung gestellt wurde, mit geeigneten Primern (siehe Tabelle Oligonukleotide) mittels PCR amplifiziert und in die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Not*I der Vektoren pGEX-6P-1, pQE32 bzw. pTL1-HA3 eingesetzt. Die Sense-Primer ab Codon 218 und 334 enthalten eine *Sal*I-Schnittstelle, die mit der Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *Xho*I kompatibel ist. Entsprechend wurden

diese amplifizierten DNA Fragmente in die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *NotI* der Vektoren eingesetzt.

4.2.1.12.3 pGEX-a-Adaptin

Mittels PCR wurde die DNA, die für die α -Adaptin C Aminosäuren 695-938 kodiert, aus der vollständigen α -Adaptin C cDNA amplifiziert und in den Vektor pGEX-6P-1 zwischen den Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *NotI* eingesetzt. Diese DNA-Sequenz kodiert für die α C-Ohren- oder α C-Appendage-Domäne sowie für 6 zusätzliche N-terminale Aminosäuren, die einen vorhergesagten β -Strang im Protein vervollständigen und so zu einem Protein mit einer höheren Löslichkeit führen (Owen et al., 1999).

Für die Herstellung des Plasmids pGEX- α -Adaptin A wurde aus der vollständigen α -Adaptin A cDNA die DNA-Sequenz, die für die Aminosäuren 691-977 kodiert und der α A-Appendage-Domäne entspricht, mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *BamHI* und *NotI* in den Vektor pGEX-6P-1 eingesetzt.

4.2.1.12.4 pSE111 Helferplasmid für Proteinexpression

Das Helferplasmid für die Proteinexpression enthält das *argU*-Gen für die Translation der in *E.coli* selten vorhandenen Arginincodons AGG und AGA, so daß es bei der Expression von heterologen rekombinanten Genen in *E.coli* mit diesen Codons nicht zu verzögerter oder gar zum Abbruch der Translation der RNA aufgrund eines erschöpften internen tRNA Pools in der Wirtszelle kommen kann. Weiterhin trägt das Helferplasmid ein *lacI^q*-Gen für die Überexpression eines Repressorproteins, das durch Bindung an die Operatorregion des Promotors die Expression verhindert, bis die Induktion mit IPTG erfolgt. Das Kanamycinresistenzgen dient der Selektion des Plasmids.

Dieses Plasmid wurde von Eberhard Scherzinger aus pSBETc (Brinkmann et al., 1989), einem pACYC177-basierenden Expressionsvektor, der das *argU*-Gen, ein Kanamycinresistenzgen und eine T7-RNA Polymerase Promotorstelle für rekombinante Proteinexpression enthält, in zwei Schritten hergestellt. Dazu wurde zunächst ein *XmnI*-*EcoRV* Fragment aus pSBETc ausgeschnitten, um die T7-Promotorregion mit der anschließenden Multiplen Klonierungsstelle zu entfernen. In einem zweiten Schritt wurde dann ein 1,2 kb *EcoRI* Fragment mit dem *lacI^q*-Repressorgen in die singuläre *EcoRI* Schnittstelle des veränderten pSBETc Plasmids eingesetzt. Es entstanden Plasmide mit *lacI^q* Fragmenten in beiden möglichen Orientierungen. In pSE111 ist die Transkription des *lacI^q*-

Gens in derselben Richtung wie die des Kanamycinresistenzgens in der publizierten pSBETc Karte.

4.2.2 Grundlegende mikrobiologische Methoden

4.2.2.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Die Präparation erfolgte nach Angaben von BioRad und beinhaltet das Waschen von Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase mit 10%igem Glycerin. Dabei werden Elektrolyte aus dem Medium entfernt, die die Elektroporation stören können.

1 ml einer stationären Übernachtskultur des gewünschten Bakterienstammes in SOB⁻-Medium (ohne Magnesium) wurde in 1 l SOB⁻-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,6-0,8 inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C und 5000 rpm für 10 min in einem vorgekühlten Rotor (GSA, Sorvall) abzentrifugiert, in 1 l eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und erneut bei 5000 rpm für 10 min pelletiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Die Zellen wurden in 10-15 ml 10% Glycerin aufgenommen und in einem kleineren Zentrifugenröhrchen (Corex 15) für 10 min bei 7000 rpm (Sorvall, SS34-Rotor) sedimentiert. Der Überstand wurde nicht vollständig verworfen, sondern etwa 1-2 ml des Rücklaufs wurden dazu benutzt, die Zellen zu resuspendieren. Nach Aliquotierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien mittels Elektroporation

Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Elektroporation, bei der die Bakterienzellwand durch kurze, elektrische Impulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht wird.

Für die Transformation wurden 30 µl der aufgetauten elektrokompenten Zellen mit 3 µl des dialysierten Ligationsansatzes gemischt und in einem Genepulser (BioRad) bei 200 O, 25 mF und 1,68 kV elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml Antibiotikum-freiem LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um die Expression der Antibiotikumresistenz zu erlauben. Von dieser Bakteriensuspension wurden 20 und 200 µl auf LB+Amp (150 µg/ml)-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Um die kompetenten Zellen auf eine mögliche Kontamination mit einem Fremdplasmid zu untersuchen, wurde ein Scheintransformationsansatz mit nur H₂O + kompetenten Zellen durchgeführt.

4.2.2.3 Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien

Nach der Transformation und dem Ausplattieren der Bakterien auf selektiven Agarplatten wurden resistente Kolonien mittels sterilen Impfüsen von der Platte in 2 ml (Mini-Prep) oder 200 ml (Maxi-Prep) LB+Amp Medium überführt und in Greinerröhrchen oder Erlenmeyerkolben mit Schikanen und luftdurchlässigem Deckel über Nacht bei 37°C geschüttelt. Ein Teil der Kolonie wurde zuvor noch einmal auf eine LB+Amp-Agarplatte ausgestrichen, um eine Kopie der zu untersuchenden Kolonie zu sichern.

Für die langfristige Lagerung transformierter Bakterien wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl einer Mischung von 1 Teil LB und 4 Teilen Glycerin versetzt, in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3 Grundlegende proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1 Expression von rekombinanten GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Das Glutathion S-Transferase (GST)-Genfusionssystem ist ein System für die Expression, Reinigung und Detektion von Fusionsproteinen, die in *E. coli* produziert werden. Die pGEX-Plasmide sind für die induzierbare, intrazelluläre Expression von Genen oder Genfragmenten als Fusionen mit dem *Schistosoma japonicum* GST entwickelt worden. Dabei findet die Expression unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors statt. Die enge Kontrolle der Expression wird durch ein internes *lacI^L*-Gens erreicht, dessen Genprodukt ein Repressorprotein ist, das an die Operatorsequenz des *tac*-Promotors bindet und die Expression bis zur Induktion mit IPTG verhindert. Die Fusionsproteine können aus den bakteriellen Lysaten mittels Affinitätschromatographie mit Glutathion S-Sepharose gereinigt werden. Mit einer spezifischen Protease, deren Erkennungssequenz 3' der Multiplen Klonierungsstelle im pGEX-Plasmid liegt, kann das gewünschte Protein von dem GST-tag abgespalten werden. Fusionsproteine mit dem GST-tag können durch Western blotting mit einem anti-GST Antikörper nachgewiesen werden.

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurden 100 ml TY-Medium, das mit 20 mM MOPS/KOH (pH 7,9) gepuffert und mit 0,2% Glucose, 20 µg/ml Thiamin, 100 µg/ml Ampicillin für die Selektion auf das β-Lactamasegen des pGEX-Vektors und gegebenenfalls 25 µg/ml Kanamycin für die Selektion auf das Helferplasmid im Bakterienstamm SCS1-pSE111 ergänzt worden ist, mit einer Einzelkolonie, die das gewünschte Expressionsplasmid enthält, inokuliert und über Nacht bei 30°C kultiviert. Mit dieser Übernachtskultur wurden 1,5 l TY-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 weiterkultiviert. Nach

Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Kultur für weitere 3,5 h bei 37°C geschüttelt und dann rasch auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (20 min bei 4000 rpm, GSA-Rotor, 4°C) geerntet, in Puffer A (50 mM Na-Phosphat, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet kann sofort für die Aufreinigung des exprimierten Proteins weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert werden.

Für die Expression von GST- α -Adaptin A und C Proteinen wurden die Bakterien bei 25°C kultiviert und mit nur 0,2 mM IPTG induziert, da so größere Mengen von löslichem Protein erhalten werden (Owen et al., 1999).

4.2.3.2 Reinigung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine können an immobilisiertem Glutathion affinitätsgereinigt werden. Die gebundenen GSTs werden anschließend mit Glutathion eluiert, das um die Bindung an die aktive Seite des Enzyms kompetitiert.

Die gewaschenen und pelletierten Bakterienzellen, die das gewünschte Protein exprimiert haben, wurden in 25 ml Puffer A mit Zusatz von 1 mM PMSF und 0,5 mg/ml Lysozym resuspendiert und 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit einminütiger Unterbrechung für zweimal 45 Sekunden bei 200-300 W auf Eis sonifiziert und anschließend mit Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,1% (v/v) versetzt. Das resultierende Lysat wurde dann bei 30 000 x g für 30 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 5 ml einer 1:1 Suspension von Glutathion-Agarose, die zuvor über Nacht in aqua bidest gequollen und dann in Puffer A äquillibriert wurde, versetzt und für 30 min auf einem Magnetrührer bei 4°C gerührt. Diese Mischung wurde in eine Säule mit 1,6 cm Durchmesser gegossen, einmal mit 40 ml Puffer A / 1 mM PMSF / 0,1% Triton X-100 und zweimal mit 40 ml Puffer A / 1 mM PMSF gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit 5x 2 ml 15 mM Glutathion (reduziert) in Puffer A eluiert. Die Fraktionen wurden photometrisch bei 280 nm gemessen und Aliquots der Fraktionen auf einem SDS-Gel analysiert. Die Fraktionen, die das GST-Fusionsprotein in hoher Reinheit enthielten, wurden vereinigt, über Nacht gegen Puffer B (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 5% Glycerin) dialysiert und nach Aliquotierung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3.3 Reinigung von rekombinanten His-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen

Das QIAexpress System ist ein System für die Expression, Reinigung und Detektion von in *E.coli* exprimierten Fusionsproteinen, das auf der Selektivität und Affinität der Nickel-

Nitriloessigsäure (Ni-NTA) Matrix für Moleküle, die mit 6 aufeinanderfolgenden Histidinresten markiert sind, basiert. Mit den Vektoren pQE30, 31 und 32 wird N-terminal des gewünschten Proteins ein 6xHis-tag exprimiert. Die Expression findet unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T5-Promotors statt, und der Bakterienstamm, in dem die Expression stattfindet, enthält ein *lacI^l*-Repressorgen auf dem pREP4-Plasmid zur Unterdrückung der Expression ohne IPTG-Induktion. Bei der Reinigung des Fusionsproteins aus dem bakteriellen Lysat mit Hilfe der Metallaffinitätschromatographie besetzt das chelatierende NTA vier der sechs Ligandenbindungsstellen des Nickelions, während die beiden anderen Bindungsstellen mit dem 6xHis-tag interagieren können. Imidazol bei der Elution kompetitiert mit den 6xHis-markierten Proteinen um die Bindung an die Ni-NTA-Matrix und führt zur Dissoziation der His-Fusionsproteine. Die Detektion von 6xHis-markierten Proteinen im Western Blot ist mit dem anti-RGS-His Antikörper möglich.

Für die native Aufreinigung von His-Fusionsproteinen wurden die Bakterienzellen aus 750 ml Kultur, die das His-Fusionsprotein exprimiert haben, wie oben beschrieben lysiert. Der Überstand mit dem löslichen Protein wurde dann mit 5 ml einer 1:1 Suspension von Ni-NTA Agarose versetzt. Nach 30 min Inkubation unter Schütteln wurde die Suspension in eine Säule gegossen und mit Lysispuffer C (50 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 8,0, 300 mM NaCl) mit Zusatz von 20 mM Imidazol gewaschen, um die unspezifische Bindung von Proteinen mit einzelnen Histidinresten an die Ni-NTA-Matrix zu verhindern. Die Elution erfolgte mit 250 mM Imidazol in Puffer C, wobei das Imidazol mit den 6xHis-markierten Proteinen um die Bindung an die Ni-NTA Matrix kompetitiert und die 6xHis-markierten Proteine von der Säule dissoziieren. Die Fraktionen wurden photometrisch bei 280 nm gegen Elutionspuffer gemessen, auf einem SDS-Gel analysiert und die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration vereinigt. Nach Dialyse gegen 40 mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTE wurden die vereinigten Fraktionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.2.3.4 Reinigung von rekombinanten His-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen

Um ein bestimmtes His-Fusionsprotein als Antigen für die Herstellung eines Antikörpers zu verwenden, wurde dieses in den meisten Fällen unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die pelletierten Bakterienzellen aus 1,5 l Kultur wurden in 15 ml Puffer D resuspendiert und durch Vortexen bei Raumtemperatur lysiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min entfernt, und der Überstand wurde zu einer 1:1 Suspension von Ni-NTA

Agarose gegeben (die Menge der Ni-NTA Agarose richtet sich nach der Expressionsstärke des Proteins, wobei die Bindekapazität 5-10 mg Protein/ml Säulenvolumen beträgt). Nach 30 min Inkubation auf einem Rotationsschüttler wurde die Suspension in eine Säule gegossen und mit 4 Säulenvolumen Puffer E und dann solange mit Puffer F gewaschen, bis die A_{280} des Durchflusses niedriger als 0,01 war. Das gebundene Protein wurde mit Puffer G oder H eluiert.

Puffer D

6 M GuHCl
0,1 M NaH_2PO_4
0,01 M Tris
pH 8,0 einstellen mit HCl

Puffer E

8 M Urea
0,1 M NaH_2PO_4
0,01 M Tris
pH 8,0 einstellen mit HCl

Puffer F

wie Buffer E, pH 6,0

Puffer G

wie Puffer E, pH 5,9

Puffer H

wie Puffer E, pH 4,5

4.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden mit der Bradford-Methode bestimmt. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie brilliant blue G-250, der an Proteine bindet, von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit gebundenem Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung. Als Standardreihe wurden BSA-Verdünnungen in PBS verwendet.

4.2.3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekularmasse erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Hierzu wurde die Proteinlösung mit 1/3 Volumen 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt. 20 µl der Probe wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Die anschließende Trennung erfolgte abhängig von der molaren Masse des zu detektierenden Proteins über 8-12,5%ige vertikale Trenngele in einer BioRad Minigelelektrophoresekammer.

Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele:

Trenngel (12,5%)

0,1% SDS
 12,5% Acrylamid
 0,33% Bisacrylamid
 0,38 M Tris-HCl, pH 8,8
 0,05% Ammoniumpersulfat

Sammelgel (4%)

0,1% SDS
 4% Acrylamid
 0,11% Bisacrylamid
 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8
 0,05% Ammoniumpersulfat

Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,05% (v/v) TEMED gestartet.

Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 0,04% (v/v) TEMED gestartet.

Der Elektrophoreselauf erfolgte bei 120V, bis das Bromphenolblau des SDS-Probenpuffers das Trenngel erreicht hatte. Anschließend wurde die Spannung auf 180V erhöht. Der Lauf wurde gestoppt, nachdem das Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte.

4x SDS-Probenpuffer

0,2 M Tris-HCl, pH 7,5
 8% SDS
 40% (v/v) Glycerin
 0,1% Bromphenolblau

5x Laufpuffer

125 mM Tris-Base
 960 mM Glycin
 0,5% SDS

Die Probe wurde vor Zugabe des 4x SDS-Probenpuffers mit 0,1 M DTT (Endkonzentration) versetzt.

4.2.3.7 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel 5 min in Fixierlösung und anschließend 20 min in Coomassie-Blau Färbelösung geschüttelt. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte für 1-2 h durch mehrmaligen Austausch der Entfärbelösung.

Coomassie-Blau Färbelösung

50% Methanol

9,2% Essigsäure

0,179% Coomassie Brilliant Blue G 250

Mischung 2 h rühren und unlösliches Material anschließend durch einen Faltenfilter abtrennen.

Fixierer

10% Essigsäure

45% Methanol

Entfärber

20% Methanol

7% Essigsäure

4.2.3.8 Western Blot

Das SDS-Gel wurde nach der Elektrophorese blasenfrei zwischen eine Nitrocellulosemembran, die zuvor im Blotpuffer befeuchtet wurde, und in Blotpuffer getränkte Whatman 3MM Filterpapiere gelegt. Auf der Nitrocellulosemembran wurde ein weiteres feuchtes Filterpapier hinzugefügt. Der Transfer der SDS-beladenen und somit negativ geladenen Proteine erfolgte in einer Tankblotkammer (BioRad) mit Transferpuffer in Richtung der positiven Elektrode bei 50V für 1 h. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran anschließend mit Ponceau S gefärbt, wobei die in der Färbelösung enthaltene Trichloressigsäure gleichzeitig die Proteine auf dem Blot fixiert.

Für die Immundetektion wurde die Membran für 30 min in Blockierungslösung inkubiert. Die Inkubation mit dem spezifischen, primären Antikörper erfolgte in Blockierungslösung für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran viermal 5 min in Waschpuffer gewaschen und dann für 1 h mit dem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal 5 min mit Waschpuffer und zuletzt einmal 5 min in PBS gewaschen. Die Detektion der immunmarkierten Proteinbanden erfolgte mittels der Chemolumineszenzreaktion (ECL Kit, NEN), die darauf basiert, daß die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation des Substrats Luminol katalysiert. Luminol gelangt durch die Oxidation in einen angeregten Zustand und emittiert beim Rückfall in den Grundzustand Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm, das durch kurze Exposition von Röntgenfilmen detektiert werden kann. Für die Reaktion wurden gleiche Mengen von Lösung A und B frisch gemischt und luftblasenfrei auf die Membran gegeben, die auf eine

Glasplatte gelegt wurde. Nach 2 min Inkubation wurde die überschüssige Lösung mit einem Papiertuch abgesaugt und die Glasplatte mit der Membran in Saranfolie eingeschlagen. Zur Detektion der Lumineszenzsignale wurden in der Dunkelkammer nacheinander Röntgenfilme für verschiedene Zeiten aufgelegt (je nach Stärke des Signals für 1 Sekunde bis zu 20 Minuten) und diese anschließend in der Entwicklermaschine entwickelt und getrocknet.

Westernblot-Puffer:

Transferpuffer: 25 mM Tris-Base, pH 8,0
 192 mM Glycin
 20% Methanol

Waschpuffer: PBS mit 0,05% Triton X-100

Blockierungslösung: 3% Magermilch in PBS

Lösung A und B: Produktgeheimnis der Firma NEN

4.2.3.9 Filtertest

Für die Detektion und Quantifizierung kleiner Mengen Polyglutamin-enthaltender Proteinaggregate wurde eine Filtrationsmethode eingesetzt. Diese Methode beruht auf der Entdeckung, daß die Polyglutaminaggregate in SDS unlöslich sind und auf einem Celluloseacetat-Filter zurückgehalten werden, während die SDS-löslichen, monomeren Formen des HD Exon1 Proteins nicht an dieses Filtermaterial binden (Scherzinger et al., 1997). 40-80 µg eines Totalproteinextraktes aus 293 Tet-Off Zellen wurden dazu in 2% SDS und 50 mM DTT für 3 min bei 98°C erhitzt und anschließend mit einer BRL Dot-Blot Filtrationseinheit durch eine Celluloseacetatmembran (0,2 µm Porengröße), die zuvor mit 2% SDS äquillibriert wurde, gefiltert. Unter die Celluloseacetatmembran wurde noch ein Whatman 3MM Filterpapier gelegt, das ebenfalls mit 2% SDS befeuchtet wurde. Die Filter wurden prinzipiell wie ein Western Blot weiter behandelt, außer daß der eingesetzte sekundäre Antikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert war. Nach dem Waschen in Waschpuffer und PBS wurde der Filter in Attophos-Puffer äquillibriert und anschließend für 3 min im Dunkeln mit dem fluoreszierenden Phosphatase-Substrat Attophos inkubiert. Die Membran wurde kurz mit PBS gewaschen, auf eine Glasplatte gelegt und mit Saranfolie eingeschlagen. Fluoreszierende Signale wurden mit dem Fuji-Imager LAS 2000 sichtbar gemacht und mit der Software Aida quantifiziert.

Attophos Puffer:	0,5 M NaCl
	50 mM Tris/HCl, pH 9,0
	1 mM MgCl ₂
Attophos Stammlösung (250x):	10 mM Attophos in 100 mM Tris, pH 9,0

4.2.3.10 Proteinbindungstest und Peptidkompetitionsstudien

In den Proteinbindungstests wurde ein GST-Fusionsprotein an Glutathion-Agarose immobilisiert und mit einem Proteinextrakt aus humanem Hirn oder mit einem His-markierten Fusionsprotein inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen wurden die an die Glutathion-Agarose gebundenen Proteine eluiert und analysiert.

Für die Herstellung eines humanen Hirnextraktes wurde 1 g Cortexgewebe in 1,5 ml Lysispuffer (50 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 20 mM NaF, 10% Glycerol, 1% NP40) mit Proteaseinhibitoren (2 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Aprotinin und 50 µg/ml Antipain) in einem Potter-Elvehjem Homogenisierer zerkleinert und das unlösliche Material durch Zentrifugation (16 000 x g für 30 min, 4°C) entfernt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Bindungstests so durchgeführt, daß 25 µg an 15 µl gepackter Glutathion-Agarose immobilisiertem GST oder GST-Fusionsprotein entweder mit 5,3 mg/ml humanem Hirnextrakt oder 1 mg/ml Bakterienextrakt, der ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen His₆-Tag enthielt, für 60 min bei 4°C rotierend inkubiert wurde. Alle Bindereaktionen wurden in Lysispuffer mit Zusatz von 0,1% Triton X-100 in einem Totalvolumen von 500 µl durchgeführt. Die Agarose wurde für 1 min bei 10 000 x g sedimentiert, dreimal mit 0,5 ml eiskaltem Lysispuffer gewaschen und in 150 µl 1x SDS-Probenpuffer gekocht. 20 µl der Probe wurden mittels SDS-PAGE und Westernblotting analysiert.

Für Peptidkompetitionsstudien wurden zusätzlich DPF- und SH3-Peptide in einer Endkonzentration von 300 µM und 600 µM zu den 0,5 ml Bindeansätzen gegeben; das Bindeexperiment wurde ansonsten wie oben beschrieben durchgeführt.

4.2.3.11 Protein Overlay-Assay

His₆-HIP1 (218-604) wurde wie unter 4.2.3.3 beschrieben in *E. coli* überexprimiert und ein Gesamtzelllysat präpariert. Die Zellproteine wurden auf einem SDS-Gel getrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Menge des geblotteten His₆-HIP1 Proteins pro Spur betrug ca. 1 µg. Nach Blockieren in 5% Milch wurden die Blots über Nacht bei 4°C mit 2,5 µg/ml GST

oder GST- α -Adaptin C Appendage-Domäne in TBS-Puffer mit Zusatz von 5% fötalem Kalbsserum inkubiert. Nach Waschen der Blots mit TBS-T wurde das gebundene GST- α -Adaptin C mit einem spezifischen anti-GST Antikörper nachgewiesen.

4.2.3.12 Aufreinigung von Clathrin-bedeckten Vesikeln

Clathrin bedeckte Vesikel (CCVs) wurden aus humanem Cortex wie bei Lindner (1994) beschrieben aufgereinigt. Alle Operationen wurden bei 0-4°C durchgeführt.

15 g Cortexgewebe wurden in einem Potter-Elvehjem Homogenisierer mit 50 ml Puffer J (0,1 M MES, pH 6,5, 0,2 mM EGTA, 0,5 mM MgCl₂, 0,02% NaN₃), frisch ergänzt mit 0,1 mM PMSF, zerkleinert und für 50 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden ein weiteres Mal in 50 ml Puffer J homogenisiert und für 50 min bei 8000 x g sedimentiert. Das Pellet, das Zellkerne und Mitochondrien enthielt, wurde verworfen. Die postmitochondrialen Überstände wurden vereinigt und für 1 h bei 100 000 x g zentrifugiert, was ein mikrosomales Pellet und den Überstand S1 ergab. Die mikrosomalen Pellets wurden in 1-2 Volumen Puffer J resuspendiert und in einem Dounce Homogenisator zerkleinert. Die homogenisierten Mikrosomen (Pellet 2) wurden mit dem gleichen Volumen einer 12,5%igen Ficoll-Sucrose Lösung gemischt und für 40 min bei 43 000 x g zentrifugiert, wobei das Pellet P3 erzeugt wurde. Der Überstand, der die CCVs enthielt, wurde mit 4 Volumen Puffer J / 0,1 mM PMSF verdünnt und anschließend bei 100 000 x g für 1 h zentrifugiert. Die entstehenden, gelbbraunen Pellets wurden mit einem Spatel vorsichtig von der Wand abgelöst und in 100 μ l Puffer J / 0,1 mM PMSF resuspendiert und homogenisiert (Fraktion V). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau Färbung oder Westernblotting analysiert. Die Vesikelfraktion wurde ebenfalls wie unter 4.2.3.13 beschrieben im Elektronenmikroskop analysiert.

4.2.3.13 Immunmarkierung der Clathrin-bedeckten Vesikel für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Clathrin-bedeckten Vesikel wurden mit Antikörpern markiert und anschließend mit Ammoniummolybdat negativ gefärbt, um sie im Elektronenmikroskop zu analysieren. Für die Immunmarkierung wurden die aufgereinigten CCVs 2 h bei Raumtemperatur mit den primären Antikörpern gegen HIP1 (1:66), Clathrin (1:40), α -Adaptin (1:40), HAP1 (1:66) und Huntingtin (anti-HD1, 1:66) inkubiert. Die Vesikel-Antikörperkomplexe wurden in einer Beckman Airfuge bei 100 000 x g für 10 min abzentrifugiert und in dem Aufreinigungspuffer J für die CCVs resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 4 h bei Raumtemperatur mit dem

sekundären Antikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG für anti-HIP1, anti-HAP1 und anti-HD1, 1:20 oder Kaninchen anti-Ziege IgG für anti-Clathrin und anti- α -Adaptin, 1:20), der mit 5 oder 10 nm kolloidalem Gold konjugiert war. Die Proben wurden mit 2,5% Ammoniummolybdat auf Kohlefilm nachkontrastiert (Steven et al., 1988) und im EM analysiert.

4.2.4 Grundlegende zellbiologische Methoden

4.2.4.1 Auftauen von kryokonservierten Säugetierzellen

Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden in Stickstoff eingefroren ins Zellkultur-Labor gebracht und dort im Wasserbad bei 37°C schnell angetaut. Noch leicht vereist wurden die Zellen in 10 ml des entsprechenden vorgewärmten Zellmediums überführt und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt, um das DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen.

4.2.4.2 Kultivierung und Lagerung von Säugetierzellen

COS-1-, 293- und HeLa-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FBS, 100 iE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% 1-2 mal pro Woche verdünnt.

Die stabil transfektierten 293 Tet-Off Zellen wurden in L-Glutamin-freiem MEM mit Earle's Salzen (Life Technologies), das mit 10% FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 iE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml G418, 150 µg/ml Hygromycin B und 10 ng/ml Doxycyclin ergänzt worden ist, in Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert. Die Expression wurde induziert, indem die Zellen mit PBS gewaschen wurden und neues Medium ohne Doxycyclin zugegeben wurde. Das Medium wurde am folgenden Tag noch einmal erneuert, um das Doxycyclin komplett zu entfernen. Die Expression wurde für unterschiedliche Zeiten induziert, wie für jedes einzelne Experiment angegeben ist.

Für die langfristige Lagerung von Säugetierzellen wurden die Zellen einer 75 cm² Zellkulturflasche mit Trypsin abgelöst und bei 2000 rpm (Heraeus Zentrifuge) für 10 min bei Raumtemperatur pelletiert. COS-1-, 293- und HeLa-Zellen wurden dann in 1 ml Zellkulturmedium mit 20% FBS, die stabilen 293 Tet-Off Zellen in 1 ml Zellkulturmedium mit 50% FBS resuspendiert. Dazu wurden tropfenweise unter Schwenken der Zellsuspension 10% DMSO gegeben. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen in einem Einfrierbehälter, der mit

Isopropanol gefüllt war, langsam bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.4.3 Trypsinieren von Säugetierzellen

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurde so viel 0,25% (w/v) Trypsin / 1 mM EDTA (Life Technologies) zugegeben, daß der Zellrasen gerade bedeckt war und für 2-5 min inkubiert. Bei Ablösung der ersten Zellen wurde die Trypsin/EDTA-Lösung vorsichtig wieder abgesaugt, und die Zellen wurden mit dem entsprechenden Zellkulturmedium von dem Zellkulturgefäß abgespült und in der gewünschten Dichte in neue Zellkulturgefäße mit vorgewärmtem Medium verdünnt.

4.2.4.4 Bestimmung der Zellkonzentration von kultivierten Säugetierzellen

Das Wachstum von eukaryotischen Zellen in Kulturgefäßen wurde täglich mit Hilfe eines Lichtmikroskops kontrolliert.

Darüber hinaus wurde in einigen Experimenten die Zellkonzentration mit Hilfe der Trypan Blau-Färbung bestimmt. Dazu wurden die von der Kulturschale abgelösten Zellen für 10 min bei 2000 rpm (Heraeus Zentrifuge) bei Raumtemperatur abzentrifugiert und in sterilem PBS aufgenommen. Ein Aliquot der resuspendierten Zellen wurde mit 20% Trypan Blau versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um selektiv die toten Zellen anzufärben. Nach Überführung der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer wurden 4 Großquadrate mit jeweils 16 Gruppenquadraten ausgezählt und der Mittelwert für die Berechnung der Zellkonzentration verwertet. Es wurden nur die lebenden, nicht blau gefärbten Zellen gezählt. Jedes Großquadrat enthält ein Volumen von 10^{-4} cm^3 . Da 1 cm^3 äquivalent ist zu 1 ml, wird die Zellzahl pro ml Originalsuspension wie folgt bestimmt:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor der Zellen mit Trypan Blau} \times 10^4$$

4.2.4.5 Transfektion von Säugetierzellen

Die Calciumphosphat-Präzipitation (Graham and van der Eb, 1973) beruht auf der Reaktion von Calciumchlorid mit Natriumphosphat, bei der ein wasserunlösliches Calciumphosphat-Präzipitat gebildet wird, das an DNA bindet. Dieses Präzipitat wird von den Zellen aufgenommen, in denen die DNA dann freigesetzt und transkribiert wird.

Etwa 10^5 Zellen wurden 8 Stunden vor der Transfektion in einer 10 cm Petrischale ausgesät (entspricht etwa 30% Konfluenz). Für die Herstellung des Präzipitats wurden 5 μg DNA mit

15 µg pBluescript als Träger-DNA gemischt. Dazu wurden 190 µl 1 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,05 mM EDTA und 30 µl 2 M CaCl₂ (sterilfiltriert) gegeben und die Lösungen auf dem Vortex vermischt. 240 µl 2x HBS wurden vorsichtig unterschichtet, und die beiden entstehenden Schichten wurden mit Luftblasen aus der Pipette langsam verwirbelt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Präzipitat zu den Zellen gegeben und diese über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 15-20 h wurde das Medium entfernt, die Zellen 30 min in PBS gewaschen und dann frisches Medium zugegeben. 40-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und wie unter 4.2.4.7 beschrieben lysiert. Die Zellysate wurden zur Analyse der Proteinexpression im Western Blot eingesetzt.

2x HBS

280 mM NaCl

50 mM HEPES

1,5 mM Na₂HPO₄, mit NaOH auf pH 7,1 eingestellt, sterilfiltriert

4.2.4.6 Herstellung der stabilen, induzierbaren Tet-Off Zellen

Eine 293 Tet-Off Zelllinie, in die das Regulatorplasmid pTet-Off stabil in das Genom integriert war, wurde von Clontech gekauft und mit den Plasmiden pTetCMV-Hyg-CAG20, -CAG51 und -CAG83 mittels der Calciumphosphat-Präzipitationsmethode transfektiert. Der Vektor pTetCMV-Hyg wurde als Kontrolle verwendet. 4 Tage nach der Transfektion wurde die Selektion mit 150 µg/ml Hygromycin B begonnen, und 10 Tage später wurden von jeder Transfektion einzelne Kolonien isoliert und nacheinander in 12-well und 6-well Platten und dann in 25 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Die Expression der HD Exon 1 Proteine von induzierten und nicht-induzierten Zellen wurde mittels Westernblot Analysen und Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen Huntingtin (HD1, CAG53b) und den Flag-tag überprüft.

4.2.4.7 Herstellung von Zellysaten

Die transient transfektierten oder induzierten Zellen wurden in kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellkratzer von der Petrischale abgelöst, in PBS überführt und bei 4000 rpm (Beckmann, J6-HC) für 10 min bei 4°C pelletiert. Beim Ernten einer 75cm² Zellkulturflasche wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, pelletiert, in PBS gewaschen und repelletiert. Die Lyse erfolgte durch Inkubation für 30 min auf Eis in 50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% NP-40, 1 mM EDTA und Proteaseinhibitoren (2 mM PMSF, 10 µg/ml

Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Aprotinin und 50 µg/ml Antipain). Das unlösliche Material wurde in der Eppendorf Zentrifuge bei 14000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 15 mM MgCl₂ und 0,5 mg/ml DNaseI resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Proteinkonzentration der Überstand- und Pellet-Fractionen wurde mit dem Bradford Proteinassay bestimmt.

Für die Herstellung von Ganzzelllysaten wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet. Die Lyse erfolgte im selben Lysepuffer, jedoch mit dem Zusatz von 250 U/ml Benzonase.

4.2.4.8 Vorbereitung von Zellpräparaten für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Bei der Immunfluoreszenz können Antikörper aus verschiedenen Tierspezies gleichzeitig eingesetzt werden, wodurch es möglich gemacht wird, die Colokalisation bestimmter Zellproteine nachzuweisen.

Für die Vorbereitung der Zellpräparate wurden transient transfektierte COS-1, 293 oder HeLa Zellen oder induzierte 293 Tet-Off Zellen einen Tag vor der Fixierung in Leighton Tubes (für 293 Tet-Off Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet) umgesetzt. Die Zellen wurden kurz in PBS gewaschen und anschließend in 2% Paraformaldehyd für 4 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellwände wurden durch 15 min Inkubation in PBS / 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Die Leighton Tubes wurden bis zur Immunmarkierung in PBS mit Zusatz von 0,05% NaN₃ bei 4°C aufbewahrt.

Für die Immunmarkierung wurden die Leighton Tubes mit den zu untersuchenden Zellen mit einer Schere in Stückchen geschnitten, und auf der Rückseite der Plättchen wurde mit einem Diamantstift zur Kennzeichnung des Plättchens selbst und dessen Rückseite eine Nummer eingeritzt. Ähnlich wie beim Western Blot wurden die Zellpräparate zunächst 30 min in Blockierungslösung (3% BSA in PBS) in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurden verschiedene Verdünnungen der primären, spezifischen Antikörper (in 0,3 % BSA / PBS) aufgetragen und die Plättchen für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Plättchen mit den Zellen wurden dreimal für 10 min in einer 24-well Platte mit PBS / 0,1% Triton X-100 auf einem Schüttler gewaschen und dann mit den entsprechenden sekundären, mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY3- oder FITC- konjugierten Antikörpern (in 0,3% BSA / PBS) für eine weitere Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS / 0,1% Triton X-100 und einem anschließenden Waschschrift in PBS wurden die Zellkerne mit 3 µg/ml DAPI für 20 Sekunden angefärbt. Nach abschließendem Waschen in PBS wurden die Plättchen mit den Zellen nach oben auf einen Objektträger gelegt und mit Montagemedium eingedeckelt.

2%ige Paraformaldehyd-Lösung

2 g Paraformaldehyd wurden in 98 ml PBS gegeben und für 15 min bei 80°C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde die Lösung durch einen Faltenfilter klar filtriert.

Montagemedium: PBS/Glycerol (1:4, v/v) mit Zusatz von 5% Propylgallat als Antibleichmittel

4.2.4.9 Vorbereitung von Zellpräparaten für die Elektronenmikroskopie

Die Einbettung der Zellpräparate in LR Gold Harz und die nachfolgenden Immunmarkierungen wurden in der MPI Elektronenmikroskopie-Gruppe von Rudi Lurz durchgeführt.

293 Tet-Off Zellen wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Thermanox Plastikplättchen (13 mm Durchmesser, Nunc) kultiviert und die transgene Expression der HD Exon 1 Proteine für 3 Tage induziert. Für die Einbettung in LR Gold Harz (London Resin Company) wurden die Plättchen mit PBS gewaschen und 1 h in einer Lösung aus 1% Formaldehyd / 0,2% Glutaraldehyd fixiert. Nach Entwässerung in einer Ethanolreihe wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers mit LR Gold infiltriert. Das Harz wurde unter sichtbarem Licht für 3 Tage in Anwesenheit von 0,1% Benzil bei 4°C polymerisiert. Für die Einbettung in Spurr's „Low Viscosity Medium“ (Epoxid-Harz) wurden die Zellen 0,5 – 1 h in 2% Glutaraldehyd fixiert, dreimal mit PBS gewaschen, 1 h in 2% Osmiumtetroxid inkubiert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer Acetonreihe entwässert. Nach der schrittweisen Überführung aus 100% Aceton in reines Harz wurde die Polymerisation bei 60°C über Nacht durchgeführt. Zur Polymerisation wurden die Plättchen in beiden Fällen kopfüber auf Harzgefüllte Gelatine kapseln gelegt.

Für die Immunmarkierung der eingebetteten Zellen wurden ca. 60 nm dicke Schnitte auf Nickel-Trägernetzchen 10 min in Puffer K (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) und anschließend 10 min in Puffer L [Puffer A mit 6 mg/ml Aurion BSA-c (Wageningen)] inkubiert. Antikörper gegen Huntingtin (HD1, 1:400), Ubiquitin (1:30) oder 14-3-3ε (1:400) wurden zu Puffer L gegeben und die Trägernetzchen 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermal 10 min Waschen in Puffer L wurde der mit 10 nm Gold konjugierte, sekundäre Antikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG für anti-HD1 und anti-14-3-3ε, 1:100 oder Kaninchen anti-Ziege IgG für anti-Ubiquitin, 1:100) in Puffer L zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben ausgiebig in Puffer K gewaschen, für 1 min mit 0,5%

Uranylacetat und für 45 Sekunden mit Bleicitrat nachkontrastiert (Reynolds, 1963) und mit einem Philips CM100 EM (FEI Company) betrachtet.

4.2.4.10 Inhibierung des Proteasoms mit Lactacystin

Das 26S Proteasom enthält den proteolytischen Kernkomplex 20S, der wiederum aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt ist. Lactacystin ist ein selektiver Inhibitor der 20S Proteasomenuntereinheit X (Fenteany et al., 1995).

Um die Aktivität des Proteasoms zu inhibieren, wurde den stabil exprimierenden, für 24 h induzierten 293 Tet-Off Zellen 10 μ M clasto-Lactacystin β -Lacton zugesetzt und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit einer entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO inkubiert. Zellkulturmedium und Proteasomeninhibitor wurden täglich erneuert.

4.2.4.11 Toxizitätstest

Die Lebensfähigkeit von Zellen wurde anhand ihrer Fähigkeit zur metabolischen Spaltung des gelben Tetrazolium Salzes XTT zu einem orangen Formazan Farbstoff gemessen (Roehm et al., 1991).

Einen Tag vor der Messung wurden die Zellen in einer Dichte von etwa 7000 Zellen pro Vertiefung in eine 96-well Platte ausgesät. 4 Tage nach Induktion der HD Exon 1 Expression wurde XTT entsprechend des Protokolls vom Hersteller zugegeben. Nach 5 h Inkubation bei 37°C wurde die optische Dichte des Formazanprodukts bei 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen. Für jede untersuchte Zelllinie wurden 9 unabhängige Werte gemessen.

4.2.5 Grundlegende immunologische Methoden

4.2.5.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Als Antigene sind His₆-markierte Fusionsproteine geeignet, da das 6xHis-tag nicht immunogen ist. In dieser Arbeit wurden His₆-markierte 14-3-3 ϵ - und α -Synuclein-Fusionsproteine für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet. Diese wurden hergestellt, indem die cDNA, die für die Aminosäuren 94-255 der Epsilon Isoform von 14-3-3 (Accession Nummer U54778) bzw. für die Aminosäuren 1-142 von α -Synuclein (Accession Nummer AI739317) kodiert, in den Vektor pQE32 eingesetzt wurde. Die Fusionsproteine wurden in *E. coli* überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen wie unter 4.2.3.4

beschrieben mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Ca. 100 µg Protein wurden mit 1 ml 0,9%iger Kochsalzlösung und 2 ml Freund's komplettem Adjuvans versetzt, durch Auf- und Abziehen in einer 5 ml Spritze emulgiert und subkutan an 6-8 Stellen in Kaninchen injiziert. Die erste Booster Injektion erfolgte nach 21 Tagen, zwei weitere in 12 bis 14 Tage Intervallen. 7 Tage nach der letzten Injektion wurde den Kaninchen aus der Ohrvene Blut entnommen, das über Nacht bei 4°C stehengelassen und anschließend bei 4500 rpm (Sorvall, SS34-Rotor) für 10 min bei 4°C abzentrifugiert wurde. Der sedimentierte Blutkuchen wurde verworfen, der Überstand ein weiteres Mal zentrifugiert und das klare Serum gepoolt. Für die langfristige Lagerung wurden alle Antiseren aliquotiert in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die kurzfristige Lagerung bei 4°C wurden die Seren mit 0,1% NaN₃ versetzt.

4.2.5.2 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern

Die Affinitätsreinigung eines Antiserums erfolgte nach Gu et al (Gu et al., 1994). Dazu wurde zunächst wie unter 4.2.3.4 beschrieben das als Antigen verwendete His₆-markierte Protein in einer 400 ml Kultur exprimiert, in Puffer C lysiert und an Ni-NTA Agarose gebunden. Die Agarose (4 ml gepacktes Volumen) wurde mit jeweils 20 ml Puffer E, F und G gewaschen und anschließend mit 20 ml 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 äquillibriert. 1,5-2 ml des Antiserums wurde zu der Agarose gegeben und die Säule 1 h bei 4°C stehen gelassen. Die Säule wurde nacheinander mit 20 ml 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 und 20 ml 2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 gewaschen. 2 ml einer Lösung von 4 M MgCl₂ (vorher mit Tris-Base auf ca. pH 6,0 eingestellt) wurden zugegeben und die Säule 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der gebundene Antikörper wurde nach weiterer Zugabe von 4 M MgCl₂ in 0,5 ml Fraktionen eluiert und die A₂₈₀ gemessen. Die Peak-Fractionen wurden gepoolt, über Nacht gegen PBS dialysiert und für die Lagerung mit 2 mg/ml BSA versetzt und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.5.3 IgG-Präparation aus Antiserum

1 ml Serum wurde unter Rühren tropfenweise mit 0,675 ml einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt und 1 h im Eisbad weitergerührt. Die gefällten IgG's wurden 15 min bei 15000 rpm (SS34 Rotor) und 4°C abzentrifugiert, in 1 ml PBS gelöst und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Eine 1 ml Hi-Trap Protein A-Säule wurde mit 5 ml 20 mM Na-Phosphat (pH 7,0) äquillibriert und die Probe mit einer Spritze aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 5-7 ml 20 mM Na-Phosphat (pH 7,0) wurden die IgG's mit 0,1 M

Zitronensäure/NaOH, pH 2,9 eluiert. Dabei wurden 0,9 ml Fraktionen in Eppendorfgläser gesammelt, in die 0,1 ml 1 M Tris/HCl, pH 9 vorgelegt worden war. Die Fraktionen mit der höchsten A_{280} wurden gepoolt und über Nacht gegen PBS dialysiert.

4.2.6 Massenspektrometrie

4.2.6.1 Aufbereitung der Gelprobe

Mit der MALDI-TOF-MS Peptide-Mapping Methode wird die Molekularmasse von Peptiden, die durch tryptische Spaltung eines Proteins entstehen, bestimmt. Die Molekularmassen von nur drei Peptiden charakterisieren ein Protein nahezu eindeutig, und Datensammlungen in der SwissProt erlauben den Vergleich mit Fragmenten von mehreren zehntausend Proteinen.

Die Analysen wurden in der Massenspektrometrie-Gruppe des MPI von Christine Gauss und später Eckhard Nordhoff durchgeführt.

Die zu identifizierenden Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und das Gel anschließend 1 h in 0,5% Essigsäure, 20% Methanol und 0,2% Coomassie-Brilliant Blue G 250 gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 30% Methanol. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und alle verwendeten Gefäße sorgfältig gesäubert, um eine Verunreinigung der Probe mit Keratin aus Haut, Haaren oder Kleidungsstücken zu vermeiden. Die zu untersuchenden Banden wurden unter einer Cleanbench mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in 50% Ethanol, 1 mM n-Octyl- β -D-Glucopyranosid gewaschen. Nach Reduktion der Disulfidbrücken in den Proteinen mit 10 mM DTT, 20 mM NH_4CO_3 für 45 min bei 37°C erfolgte eine Alkylierung der Cysteinreste mit 55 mM Iod Acetamid, 20 mM NH_4CO_3 für 30 min im Dunkeln. Der Verdau des Proteins fand mit 20 ng/ μl Trypsin, 20 mM NH_4CO_3 für 15 min und 10 ng/ μl Trypsin, 20 mM NH_4CO_3 über Nacht bei 37°C statt und wurde durch Zugabe von 0,2% TFA, 2 mM n-Octyl- β -D-Glucopyranosid gestoppt (Nordhoff et al., 2001).

4.2.6.2 MALDI-TOF-MS Probenvorbereitung und Analyse

200 μl einer 110 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxycinnamylsäure-Lösung in 90% Aceton, 0,05% TFA wurden als Matrix auf einen Edelstahlträger aufgetragen, mit der anschließend die Peptidlösung inkubiert wurde. Dabei binden die Peptide an die Matrix, während Salze sowie andere wasserlösliche Probenkontaminanten in der Lösung verbleiben und durch Adsorption an ein Papiertuch entfernt werden.

Die Peptide wurden anschließend mit der „matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-Massenspektrometrie“ (MALDI-TOF-MS) auf einem Bruker Scout MTP Reflex III MALDI Massenspektrometer (Bruker Daltonik) analysiert. Mit den identifizierten Peptiden wurde mit der Suchmaschine MASCOT (Matrix Science, UK) eine Suche in der SwissProt Sequenzdatenbank durchgeführt.