

Material und Methoden

Material

Chemikalien und Zellkulturmaterial

Laborchemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich (Deisenhofen), Amersham-Biosciences (Uppsala, Schweden), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Pierce (Rockford, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen. Zellkultur-Materialien wurden von den Firmen BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Biochrom KG (Berlin), Corning (New York, USA), Nunc (Wiesbaden), PAA (Cölbe) und TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Geräte

Alle hier nicht aufgeführten Geräte sind unter ihrer spezifischen Anwendung angegeben. Brutschrank (Hraeus 6000, Kendro); Coulter Particle Counter Z1 (Coulter); Feinwaage (Adventurer, Ohaus); Kühlzentrifuge (Sorvall RC-5B, Kendro Laboratory Products); Magnetrührer (IKAMAG, Roth); Lichtmikroskop (Diavert, Leica); Photometer (BioPhotometer, Eppendorf); Schüttel-Inkubator (Innova 4230 Shaker, Memmert); Sterilbank (Gelaire Class 100, Gelman Instruments); Thermomixer (5436, Eppendorf); Tischzentrifuge (Biofuge pico Heraeus, Kendro Laboratory Products); Transilluminator (MWB-Biotech); Ultraschall (SonicatorTM W-375, Heat Systems-Ultrasonics, Inc.); Ultrazentrifuge (Sorvall CombiPlus, Kendro Laboratory Products); Waage (CP622, Sartorius); Wasserbad (GFL); Schwenkrotor-Zentrifuge (Megafuge 1.0R, Heraeus);

Antikörper

Der monoklonale anti-Ratten-CEACAM1 Antikörper Be9.2 wurde bereits beschrieben [Becker et al., 1986] (IB: ZKÜ 1:200, IF/FACS 10µg/ml, IP 3-4µg). Anti-E-cadherin mAb (HECD1) wurde uns von Ottmar Huber (Berlin) zur Verfügung gestellt (IB: 2µg/ml, IF 10µg/mlg). Andere benutzte monoklonale Antikörper (je IB: 1:1000, IF/FACS 10µg/ml, IP 3-4µg): anti-CEACAM1/5 (4/3/17, F. Grunert, Genovac, Freiburg); anti-CEACAM6 (16H10, F. Grunert, Genovac, Freiburg); anti-CEACAM1/5 (18/20, AG Reutter, Berlin); anti-CEACAM1/5/6 (2D3, AG Reutter, Berlin); anti-CEACAM1/3/4/5/6/7 (IH4Fc, Immunotools, Friesoythe); anti-CEACAM3/5 (Col-1, Dr J. Schlom NCI, USA) anti-β1 Integrin (#0790), anti-CEACAM8 (80H3) (Immunotech); anti-YY1, anti-αv Integrin (Q-20), anti-β3 Integrin (F11), anti-Phosphotyrosin (PY99) (Santa Cruz); anti-α3 Integrin (mAb1952, Chemicon); anti-Paxillin (#349, IB: 1:5000), anti-β1 Integrin (#18); anti-FAK (#77), anti-N-Cadherin (#32), anti-α6 Integrin (GoH3), Anti-RalA, anti-SHP-2 (79) (BD/Transduction Laboratories/Pharming); anti-Vinkulin (hVIN-1); anti-beta-Aktin (AC-74, IB: 1:5000), anti-Talin (8d4); (Sigma); anti-P-glykoprotein (#C219, Calbiochem), anti-Phospho-Tyrosin

(4G10, Upstate). Polyklonale Antikörper: Kaninchen-anti-Human CEA (IB: 1:2500, IF/FACS 10µg/ml, IP 3-4µg); Ziege-anti-Maus Cy-2- bzw. RhodamineRed-X-konjugiert; Ziege-anti-Kaninchen Cy-2- bzw. RhodamineRed-X-konjugiert (Dako) (je: IF 1:50); Ratte-anti-Maus IgG HRPO-konjugiert; Ratte-anti-Ziege IgG HRPO-konjugiert; Ziege-anti-Kaninchen HRPO-konjugiert; Ziege-anti-Human HRPO-konjugiert (Jackson ImmunoResearch) (Je: IB: 1:5000). Kontroll-IgG aus Kaninchen Präimmenserum wurde mit Protein A-Sepharose gereinigt. Das polyklonale Kaninchen-anti-Poldip2-Antiserum D8R2 wurde über eine Protein-G-Säule gereinigt und wie im Ergebnisteil aufgeführt charakterisiert.

Oligonukleotide und Matrizen-cDNA

Tabelle 4: Oligonukleotide und Matrizen-cDNA für PCR und RT-PCR. Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Abkürzungen: hs: Homo sapiens, rn: Rattus norvegicus, mm: Mus musculus, CC1: CEACAM1-4L, ExD: extrazelluläre Domäne, SP: Signalpeptid, ΔN: Extrazelluläre Domäne mit deletierter N-terminaler Ig-Domäne, N: N-terminale Ig-Domäne, A1: zweite Ig-Domäne, B: dritte Ig-Domäne, A2: vierte Ig-Domäne, FcH: Konstante Region der schweren Kette eines humanen IgG gamma3 inklusive der Hinge-Region, FcO: Konstante Region der schweren Kette eines humanen IgG gamma3 ohne die Hinge-Region, Poldip2: Polymerase delta interacting protein 2.

| Konstrukt | Sense Oligonukleotid (Bezeichnung) | Reverse Oligonukleotid (Bezeichnung) | Matrix cDNA (Acc.-Nr.) |
|--------------------------|---|---|---------------------------|
| rn CC1-ExD | AAG CTT AAG CTT TAG CAG GCA GCA GAG ACT ATG G (CCAM-18 s Hind NEU) | GAA TTC GAA TTC AGA ATT TCC TTG TGT TGG ATC AGG (CCAM-1257r Eco NEU) | rn CEACAM1 (J04963) |
| rn CC1-N/A1/B (= ΔA2) | AAG CTT AAG CTT TAG CAG GCA GCA GAG ACT ATG G (CCAM-18 s Hind NEU) | GAA TTC GAA TTC CTG AGT CAC TGG CTC AAA GAC TG (CCAM1-972r Eco NEU) | rn CEACAM1 (J04963) |
| rn CC1-N/A1 (= ΔB/A2) | AAG CTT AAG CTT TAG CAG GCA GCA GAG ACT ATG G (CCAM-18 s Hind NEU) | GAA TTC GAA TTC ATA GAT AAC GTC CAG GTT GAA TGG (CCAM-704r Eco NEU) | rn CEACAM1 (J04963) |
| rn CC1-N (=ΔA1/B/A2) | AAG CTT AAG CTT TAG CAG GCA GCA GAG ACT ATG G (CCAM-18 s Hind NEU) | GAA TTC GAA TTC GGG GTA TAC ACG AAA TTG CAC AG (CCAM-424r Eco NEU) | rn CEACAM1 (J04963) |
| rn CC1-ΔN | CTG CAG CTG CAG GCA TTA CAA AAG CCC AAC GTC ACA GG (CCAM425 S Pst NEU) | GAA TTC GAA TTC AGA ATT TCC TTG TGT TGG ATC AGG (CCAM-1257r Eco NEU) | rn CEACAM1 (J04963) |
| rn CC1-SP | AAG CTT AAG CTT TAG CAG GCA GCA GAG ACT ATG G (CCAM-18 s Hind NEU) | CTG CAG CTG CAG GGC AGT GGT GAG AGG GCT CCA G (CCAM 102 r Pst NEU) | rn CEACAM1 (J04963) |

Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 4

| Konstrukt | Sense Oligonukleotid (Bezeichnung) | Reverse Oligonukleotid (Bezeichnung) | Matrix cDNA (Acc.-Nr.) |
|--|---|---|--|
| hs FcH | GAA TTC GAA TTC ATG GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA AC (hFc Hinge s Eco NEU) | CTC GAG CTC GAG TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GC (hFc r Xho NEU) | hs IgG γ 3, schwere Kette (BC014258; RZPD IMAGp958B041622) |
| hs FcO | GAA TTC GAA TTC ATG GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CC (hFc Ohne s Eco NEU) | CTC GAG CTC GAG TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG GC (hFc r Xho NEU) | hs IgG γ 3, schwere Kette (BC014258; RZPD IMAGp958B041622) |
| hs CC1-ExD | AAG CTT AAG CTT ACC ATG GGG CAC CTC TCA GCC (hCCAM-3 s Hind) | GAA TTC GAA TTC ACG TGA GAG GCC ATT TTC TTG (hCCAM ExD r Eco) | hs CEACAM1 (X16354) |
| hs CC1- Δ N | CCT GCA GGC CTG CAG GAG CTG CCC AAG CCC TCC ATC TCC (hCC1 427 s Sda) | GAA TTC GAA TTC ACG TGA GAG GCC ATT TTC TTG (hCCAM ExD r Eco) | hs CEACAM1 (X16354) |
| mm Poldip2 | GAC ATG GCT GGT TGT GTG GC (m DKFZ s) | CTA CCA GTG AAG GCC TGA GG (h+m DKFZ r) | mm Poldip2 (BC12879) |
| Prohibitin (PHB), cDNA für Sonde (Northern) | GCT GAG GAC ATT GCT TAT CAG C (pro741s) | TAA GAC AGA CCA CTT CCT CAG G (pro1265r) | rn PHB (M61219) |
| LIM domain kinase 1 (LIMK1), cDNA für Sonde (Northern) | ACT ACC AGA CTG TGG TAA CTC C (lim621s) | ATA CTG CAG CTC CTC AAG ACA G (lim1104r) | rn LIMK1 (D31873) |
| Stromelysin 3 (ST3, SL3, MMP11), cDNA für Sonde (Northern) | CTT CCA AGG TGC TCA GTA CTG G (strom1092s) | AGT TGT TGG CAG GTG ACC ATG G (strom1668r) | rn MMP1 (U46034) |
| Interleukin 6- Rezeptor (IL6R), cDNA für Sonde (Northern) | CAC AGA GCA GAG AAT GGA CTA CC (IL6R302s) | CAA CTG ACT TTG AGC CAA CGA GG (IL6R808r) | rn IL6R (NM_017020) |
| c-jun N-Terminale Kinase (JNK, SAPK), cDNA für Sonde (Northern) | GAA GCA GAG CAT GAC CTT GAA CC (cjun/2356s) | CTC CTG AGA CTC CAT GTC GAT GG (cjun/3016r) | rn JNK (X17215) |
| PB-Cadherin (short type, CDH22), cDNA für Sonde (Northern) | AAG ATC CAC TCG GAT TCT GAC G (pbcad763s) | AAC CAC GAT GGT CAC TGT AGT G (pbcad1311r) | rn CDH22 (D83349) |
| Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransf- erase, Kontroll-cDNA für Sonde (Northern) | GCT TTC CTT GGT CAA GCA GTA C (hyp646s) | GAG ATC TGT CTG TCT CAC AAG G (hyp921r) | rn Hypoxanthin- Guanin-Phosphoribo- syltransferase (X62085) |
| β -Aktin, Kontroll-cDNA für Sonde (Northern) | ACA CGG CAT TGT AAC CAA CTG G (bact1546s) | CTC ATT GCC GAT AGT GAT GAC C (bact2553r) | rn β -Aktin (V01217) |

Tabelle 5: Oligonukleotide für Linker. Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

| Sense Oligonukleotid (Bezeichnung) | Reverse Oligonukleotid (Bezeichnung) | Beschreibung des Linkers |
|---|---|---|
| AGC TCC ACC TGC AGG TCG (Linker H/Sda/E-S) | AAT TCG ACC TGC AGG TGA (Linker H/Sda/E-R) | Der Linker dient dem Einfügen einer SdaI-Schnittstelle zwischen einer HindIII- und einer EcoRI-Schnittstelle |
| AGC TTG AAT TCT CGA GGA TCC AAG TCT CCC (linker68s) | AAT TGG GAG ACT TGG ATC CTC GAG AAT TCA (linker68r) | Linker für die Klonierung der CEACAM6- und CEACAM8-FcO-Fusionskonstrukte. 5' enthält er einen HindII-Überhang, 3' einen EcoRI-Überhang (die EcoRI-Schnittstelle ist nach der Ligation durch einen Basentausch nicht mehr funktionell). Zwischen den Überhängen beinhaltet Schnittstellen/Sequenzen von 5' nach 3': EcoRI, XhoI, BamHI (gleicher Überhang wie BclI), 7 Nukleotide der restlichen CEACAM6- und CEACAM8-Sequenz (fehlen nach Verdau der cDNA mit BclI) |

Tabelle 6: Oligonukleotide für Sequenzierungen. Alle Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die Primer sind zur Auswertung der Sequenzen im Abi Prism Sequenziergerät mit den Farbstoffen IRD 700 oder IRD 800 konjugiert (Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden).

| Bezeichnung | Oligonukleotid (Modifikation) | erkannte Sequenz, Vektoren |
|------------------|---|---|
| SP6 | ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT A (5' IRD 700) | pcDNA3.1, pRC/CMV (euk. Expressions-Vektoren); pCR-Blunt (PCR Klonierungs-Vektor) |
| T7 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG (5' IRD 800) | pcDNA3.1, pRC/CMV (euk. Expressions-Vektoren) |
| pact2(S)-5122r | CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC (5' IRD 700) | pACT2 (Yeast-Two-Hybrid; enthielt cDNA-Bibliothek) |
| pact2(R)-4848s | GGC CAA GAT TGA AAC TTA GAG G (5' IRD 800) | pACT2 (Yeast-Two-Hybrid; enthielt cDNA-Bibliothek) |
| pRC/CMV764s | ATT GAC GCA AAT GGG CGG TAG G (5' IRD 700) | pRC/CMV, pcDNA1/NEO, pcDNA3.1 (euk. Expr.-Vektoren) |
| pRC/CMV1113r | TTC CAG GGT CAA GGA AGG CAC G (5' IRD 800) | pRC/CMV, pcDNA1/NEO, pcDNA3.1 (euk. Expr.-Vektoren) |
| pGEX 870 seq S | GGC TGG CAA GCC ACG TTT GGT GG (5' IRD 700) | pGEX-4T (bakterieller Expr.-Vektor für GST-Fusionsproteine) |
| pGEX 1041 seq R | CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG (5' IRD 800) | pGEX-4T (bakterieller Expr.-Vektor für GST-Fusionsproteine) |
| rCEACAM 590r SEQ | GTT GCC CTC AGA GAA CGT CAC CCT GTC ACC (5' IRD 800) | Ratten CEACAM1 cDNA, reverse, ab Basenpaar 590 |
| CEACAM-seq-441s | CAA CGT CAC AGG TAA CAA CTC C (5' IRD 800) | Ratten CEACAM1 cDNA, sense, ab Basenpaar 441 |
| FcCC-seq-81r | GAG ATC ATG AGG GTG TCC TGG G (5' IRD 800) | Schwere Kette eines humanen IgG γ 3, reverse, ab Basenpaar 81 |
| FcHCC-seq-400r | CTG CCT TGC TGC CCT GGA CTG G (5' IRD 800) | Schwere Kette eines humanen IgG γ 3, reverse, ab Basenpaar 400 |

Vektoren

Der eukaryote Expressionsvektor pCDNA1 mit der humanen cDNA von CEACAM1-4L, CEACAM1-4S, CEACAM1-3L und CEACAM1-3S wurden unserem Labor von Björn Öbrink (Stockholm, Schweden) zur Verfügung gestellt. pdKCR-NEO-CEACAM3, pdKCR-NEO-CEACAM6 und pdKCR-NEO-CEACAM8 wurden unserem Labor von Motomo Kuroki (Fukuoka, Japan) zur Verfügung gestellt. Die eukaryoten Expressionsvektoren mit CEACAM8- und CEACAM6-Ig Fusionsproteinen wurden unserem Labor von Ofer Mandelboim (Jerusalem, Israel) zur Verfügung gestellt. Alle Ratten-CEACAM1-Konstrukte aus unserem Labor lagen im Vektor pRC/CMV vor.

Weitere benutzte Vektoren waren: pGEX-4T Vektor für die Expression von GST-Fusionsproteinen in Bakterien (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden); pRSET für die Expression von His-Fusionsproteinen in Bakterien (Invitrogen, Carlsbad, USA); pcDNA3.1 und pRC/CMV für die Expression von Proteinen in Säugetier-Zellen sowie pCR-Blunt für die Zwischenklonierung von Pfx-DNA-Polymerase PCR-Produkten (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die Sequenzen und die Schnittstellen der jeweiligen MCS (multiple cloning site) der für Klonierungen benutzten Vektoren sind im Anhang dargestellt.

Versuchstiere

Zur Preparation von Lebern wurden Buffalo-Ratten aus eigener Zucht verwendet.

Methoden

Viele der verwendeten Methoden sind gebräuchliche Arbeitsweisen in molekularbiologisch- oder biochemisch arbeitenden Laboratorien, die in üblicher oder leicht abgeänderter Form angewendet wurden. Auf eine detaillierte Referenzliste bezüglich der Methoden wurde daher verzichtet. Alle gebräuchlichen Methoden und dazugehörige Referenzen sind in folgenden Protokoll-Sammlungen wiedergegeben: Ausubel *et al.* (2002): Current Protocols in Molecular Biology, Vol.1+2; Maniatis *et al.* (1989): Molecular cloning: a laboratory manual Vol. 1-3.

Molekularbiologische Methoden (DNA und RNA)

Plasmid-Präparation

Von einer *E. coli*-Übernachtskultur werden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 200 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 200 µl Puffer 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl vorgekühltem Puffer 3 (3 M Na-Acetat, pH 5,5) folgt eine 30- bis 90-minütige Inkubation im Eisbad. Eine anschließende

10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert die zellulären Proteine und die chromosomale DNA. Der Plasmid-haltige Überstand wird mit mindestens 0,7 Volumen 2-Propanol für 1-5 min bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wird durch 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert. Das DNA-Pellet wird mit 1 ml unvergälltem 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet (keine Speed-Vac!), in 50 µl sterilem ddH₂O gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute beträgt ca. 50-100 µg Plasmid-DNA/ml Bakterienkultur. Werden größere Mengen der DNA benötigt, kann dieser Ansatz hochskaliert werden. Ist endotoxinfreie DNA notwendig (z.B. für transiente Transfektionen von Säugerzellen) sollten DEAE (Diethylaminoethanol) Anionen-Austauscher Säulen verwendet werden, die z.B. im Midi-Kit von Qiagen (Hilden) enthalten sind.

DNA-verändernde Enzyme

Restriktions- und DNA-modifizierende Enzyme waren von Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland) oder Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Für die Restriktion von DNA wurden 1-50 µg DNA mit 0,1-1 U des Restriktionsenzym in entsprechendem Puffer angesetzt und für 1 bis 4 h bei 37°C oder entsprechenden anderen Temperaturen inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend durch DNA-Gelelektrophorese analysiert und die Fragmente wurden gegebenenfalls durch Elution aus dem Gel gereinigt.

Erfolgt die Linearisierung des Plasmids mit nur einem Restriktionsenzym, können die entstandenen Enden vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase aus Bakterien (BAP, Invitrogen) dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Dazu 1 pmol 5'-DNA-Enden mit 10 µl 10X Dephosphorylierungspuffer mischen und mit ddH₂O auf 90 µl auffüllen. 10 µl mit verdünnter BAP (70 U) mischen und 1 h bei 65°C inkubieren. Die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8) stoppen und die DNA über das QIAquick PCR-Reinigungs-Kit von Qiagen (Hilden) reinigen.

Für das Glätten von überhängenden DNA-Enden wurde Klenow-Fragment (Fermentas, St. Leon-Roth) verwendet. Das Klenow-Fragment (1µl) wurde direkt nach dem Restriktionsverdau (30 µl Endvolumen, maximal 2 µl Restriktionsenzym) mit 0,5 µl 2 mM dNTP-Mix in den Ansatz gegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Hitze-Inaktivierung wurde die DNA über das QIAquick PCR-Reinigungs-Kit von Qiagen (Hilden) gereinigt und für die Ligation verwendet.

Für Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Roth) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte vorzugsweise bei 14°C über Nacht. Standard-Ligations-Ansatz (überhängende und glatte DNA-Enden): 1 µl T4-DNA-Ligase (10 U), 2 µl 10X Ligationspuffer, 100 ng Plasmid, 3-facher molarer Überschuss an Insert, aufgefüllt auf 20 µl mit sterilem ddH₂O. Es wurden maximal 5 µl des Ligationsansatzes für eine Transformation von kompetenten Zellen eingesetzt.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte bis ca. 20 kb *in vitro*. Dazu werden Oligonukleotide benötigt, die die zu amplifizierende Sequenz 5' und 3' flankieren, wobei der 5'-Primer in Sense-Orientierung und der 3'-Primer revers-komplementär zum abgelesenen DNA-Strang vorliegen muss. Die Primer sollten eine Länge von ca. 20 Nukleotiden besitzen und einen GC-Anteil von ca. 50-60% aufweisen. Ein Primer-Paar sollte in der Schmelztemperatur möglichst nicht stark voneinander abweichen. Die Vervielfältigung der DNA erfolgt durch eine DNA-Polymerase in wiederholten Zyklen. Zuerst wird die DNA bei 94°C denaturiert, dann folgt die Bindung der Primer an die jetzt einzelsträngige DNA (*Annealing*) bei für die jeweiligen Primer spezifischen Temperaturen (*Annealing*-Temperatur). Anschließend erfolgt die eigentliche Amplifikation der DNA. Dazu wird die Temperatur dem jeweiligen Arbeitsoptimum Polymerase angepasst. Für "Standard"-Polymerasen, die TA-Überhänge produzieren, werden 72°C verwendet. Für Klonierungs- oder "*proofreading*-" Polymerasen, die nicht überstehende (*blunt*) DNA-Enden produzieren und weniger Fehler in der Transkription begehen, werden 68 °C eingestellt. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der von den Primern flankierten Transkripte. Nach 24 Zyklen erhält man also 2²⁴ Transkripte pro Matrizen-DNA.

Die zur Vervielfältigung von cDNA verwendeten Primer sowie die *Accession*-Nummer der als Matrize verwendeten cDNA sind im Material-Abschnitt in Tabelle 4 im Einzelnen aufgeführt. Für Test-PCRs wurde die rekombinante Taq von Fermentas (St. Leon-Roth), für Klonierungs-PCRs wurde die Pfx von Invitrogen (Karlsruhe) eingesetzt. **Standard-Reaktionsansatz Taq rc** (Fermentas, St. Leon-Roth): 5 µl 10X Taq-Puffer, 2,5 µl 4 mM dNTP (each), 2 µl 50 mM MgCl, 1,5 µl 10 pmol/ml Sense-Primer, 1,5 µl 10 pmol/ml Reverse-Primer, 1 µl Taq, 100 ng Matrizen-DNA, ad. 50 µl ddH₂O. **Standard-Reaktionsansatz Pfx** (Invitrogen, Karlsruhe): 5 µl 10X Pfx-Puffer, 2,5 µl 4 mM dNTP (each), 1 µl 25 mM MgSO₄, 1,5 µl 10 pmol/ml Sense-Primer, 1,5 µl 10 pmol/ml Reverse-Primer, 0,5 µl Pfx, 100 ng Matrizen-DNA, ad. 50 µl ddH₂O. Für die Reaktion wurde der Robo-Cycler Gradient 96 von Stratagene verwendet. **Reaktionsverlauf einer Test-PCR (Taq):** 1 Zyklus mit 3 min 94°C; 35 Zyklen mit 30 s 94°C, 30 s *Annealing*-Temperatur (45-65°C), 1 min pro kb zu vervielfältigender DNA 68°C; 1 Zyklus mit 5 min 68°C. **Reaktionsverlauf einer Klonierungs-PCR (Pfx):** 1 Zyklus mit 3 min 94°C; 24 Zyklen mit 30 s 94°C, 30 s *Annealing*-Temperatur (45-65°C), 2 min pro kb zu vervielfältigender DNA 72°C; 1 Zyklus mit 5 min 72°C.

Sequenzierung

Die Sequenzierung aller verwendeter Konstrukte erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger mit dem Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden). Zur Sequenzierung verwendete Primer sind im Material-Abschnitt in Tabelle 6 aufgeführt. Die Sequenzier-Primer sind mit Infrarotfluoreszenzfarbstoffen (IRD700 bzw. IRD800) markiert.

Die zu sequenzierende DNA diente als Matrize für die Polymerisation eines fluoreszenzmarkierten komplementären Stranges. 1,3 µg DNA wurden mit 1 µl 2 pmolarer

Primerlösung vermischt (13 µl Endvolumen). Davon wurden je 3 µl mit 3 µl Sequenzier-Ansatz A, C, G oder T vermischt. Jeder Ansatz enthält neben den dNTPs (Desoxynucleosid-triphosphat) je eine Sorte von ddNTPs (Didesoxynucleosid-triphosphat) im Unterschuss, die zu einem Abbruch der Polymerisationsreaktion führen.

Die Reaktionsansätze wurden nach der Polymerase-Ketten-Reaktion (1 Zyklus mit 3 min 94°C; 24 Zyklen mit 20 s 94°C, 20 s Annealing-Temperatur = 55-65°C, 20 s 72°C) mit 5 µl Stopplösung versehen und 3 min bei 72°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden in einem 6%igen Polyacrylamidgel getrennt und in einer automatischen Sequenziervorrichtung (Licor 4000 L, MWG-Biotech, München) analysiert.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Menge und Reinheit der DNA bzw. RNA abzuschätzen, kann man die Absorption der DNA- bzw. RNA-haltigen Lösung bei 260 bzw. 280 nm messen. Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren, bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen und Phenol. Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} lässt sich somit auch ein Rückschluss auf die Reinheit der DNA/RNA ziehen. Werte unter 1,8 zeigen an, dass die Probe zu viele Proteine enthält, Werte über 2,0 weisen erfahrungsgemäß darauf hin, dass die Probe wahrscheinlich viel RNA bzw. DNA als Verunreinigung enthält. Über den Extinktionskoeffizienten für DNA bzw. RNA in wässriger Lösung lässt sich über das Lambert-Beer-Gesetz die Konzentration der DNA/RNA ermitteln. Eine $OD_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml Doppelstrang-DNA, bzw. 40 µg/ml RNA.

Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung der DNA erfolgte je nach Größe der zu untersuchenden DNA in 0,8 (>5 kb) bis 3%igen (<100 bp) Agarosegelen (Standard: 1%). Die Agarose wird in 1X TAE-Puffer (0,04 M Tris/0,1% Acetat/2mM EDTA) durch Kochen gelöst und nach Abkühlen auf 50°C in entsprechende Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren der Agarose wird das Gel in die mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben werden mit Probenpuffer (10X Probenpuffer: 60% Glycerin, 200 mM EDTA, 0,0025% Bromphenolblau) versetzt, in die Taschen gefüllt und bei 75 V bis zur gewünschten Laufstrecke aufgetrennt. Nach 10-minütiger Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) kann die DNA unter ultraviolettem Licht (366 nm) visualisiert und fotografiert werden. Alternativ zu Ethidiumbromidbad kann das Etidiumbromid auch direkt in das Gel gegeben werden. Dazu die zur homogenität gekochte Agarose in TAE auf ca. 60°C abkühlen lassen und 0,5µl Etidiumbromid-Stocklösung pro 100 ml Gellösung dazugeben. 50X TAE: 242 g Tris-Base, 57,1 ml Acetat, 100 ml 0,5 M EDTA, ad. 1 l H₂O. Größenstandart für dsDNA: 1kb-Plus DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe). Etidiumbromid-Stocklösung: 10 mg/ml, bei 4°C oder RT aufbewahren.

Elution von DNA aus dem Agarosegel

DNA-haltige Banden können aus Agarosegelen geschnitten und die DNA daraus eluiert werden. Dazu wurde der QIAquick Gelextraktions-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet. Die Agarosegel-Stücke werden in 3 Gelvolumen Puffer QG aufgenommen und 10 min bei 50°C geschmolzen. Es wird 1 Gelvolumen Isopropanol zugegeben und die Mischung wird auf Säulen gegeben, die eine Silicagel-Membran enthalten. Daran bindet die DNA, während Verunreinigungen wie Primer, Salze, Nucleotide, Enzyme, Agarose, Ethidiumbromid, Detergenzien und Öle nicht gebunden werden. Diese Säulen eignen sich auch zur Reinigung von PCR-Produkten. Die Säulen werden mit Ethanol-haltigem Puffer PE gewaschen. Die Elution erfolgt mit dem Puffer EB (10 mM Tris, pH 8) oder mit sterilem ddH₂O (vorsicht, die Elution erfolgt pH-abhängig!).

RNA Isolierung (Gesamt-RNA) mit RNazol

Für die Gewinnung von gesamt-RNA aus kultivierten Säugerzellen wurde RNazol verwendet (PepqLab, Erlangen). Diese Methode hat den Vorteil, dass mit RNazol versetzte Proben ohne die Gefahr einer Schädigung der enthaltenen RNA bis zu 6 Monate bei -80°C gelagert werden können.

Eine 6 cm-Schale mit nach Wunsch behandelten eukaryonten Zellen mit 1 ml RNazol abschaben, mit einer Pipette homogenisieren und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren (oder die Probe bei -80°C für einen späteren Gebrauch wegfrieren). 200 µl Chloroform zugeben, 15 s kräftig schütteln, 3-10 min auf Eis stellen und bei 4°C, 13.000 rpm 5 min zentrifugieren. Die obere Phase vorsichtig in ein frisches Röhrchen überführen, 1 Volumen Isopropanol dazugeben, 5-10 min auf Eis inkubieren und bei 4°C, 13.000 rpm 10 min zentrifugieren. Das Pellet 2 x mit 70% EtOH waschen (vortexen, bei 4°C, 13.000 rpm 10 min zentrifugieren), kurz an der Luft trocknen und in 30-100 µl ddH₂O lösen. Die RNA kann für alle gängigen Methoden wie z.B. RT-PCR oder Northern-Blot-Analyse verwendet werden.

Reverse Transkription von RNA (Erststrang-cDNA-Synthese)

Reverse Transkriptasen sind in der Lage, RNA in DNA umzuschreiben, und so aus RNA eine für die PCR geeignete Matrizen-DNA herzustellen. Die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte mit dem Superscript-II- bzw. -III-System von Invitrogen (Karlsruhe). Es wurden 5 µg Gesamt-RNA mit 250 ng Random-Primer (Random-Hexamere Oligonukleotide) und 1 µl 10 mM dNTP Mix zusammengegeben, auf 13 µl aufgefüllt, für 5 min auf 65°C erhitzt und sofort wieder auf Eis gegeben. Dann wurden 4 µl 5X First-Strand-Buffer, 1 µl 100 mM DTT, 1 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 1 µl SuperscriptIII (200 U/µl) dazugegeben und der Ansatz 5 min bei 25°C, 60 min bei 50°C (Erststrang-cDNA-Synthese) und 15 min bei 70°C (Hitze-Inaktivierung) inkubiert. Die so erhaltene cDNA wurde dann als Matrix für eine PCR verwendet (siehe oben).

Northern-Blot-Analyse von Gesamt-RNA

Für die **Poldip2 Northern-Blot-Analyse** wurden zusätzlich zu dem käuflich erworbenen humanen Gewebe-Northern (MTN-Blot, 12-Lane, Clontech) Blots mit der RNA verschiedener Zelllinien selbst hergestellt. Es wurde RNA aus den folgenden Zelllinien und primären Zellen isoliert und geblottet: CHO (Chinese Hamster Ovary), N2A2 (neuronaler Ursprung, Maus), ES (Embryonale Stammzellen, Maus) undifferenziert und zu Kardiomyozyten differenziert, PC12 (neuronaler Ursprung, Ratte) undifferenziert und neuronal differenziert, RBE (Rat Brain Endothelial Cells) Wildtyp (wt), Vektortransfiziert (CMV), CEACAM1- Δ cyto und CEACAM1-short transfiziert, HeLa (epitheliales Cervixcarcinom, human), IEC6 (Intestinal Epithelial Cells, human), HaCat (Keratinocyten, human), Jurkat (T-Zell Ursprung, human), NB4 (monocytärer Ursprung, human), PBMC (Peripheral Blood Monocytic Cells, primäre Zellen, human).

Herstellung einer RNA-tragenden Nylon-Membran: Am Tag vor dem Blotten die Gelkammer und den Kamm in 2% SDS/50% EtOH einlegen oder mit speziellen anti-RNase-Reinigern säubern. Zum Blotten der RNA wird ein 1,2 %iges Agarose-Gel benötigt: 1,2g Agarose mit 72 ml ddH₂O und 10 ml 10X MOPS-Puffer (0,4 M MOPS, 0,1 M Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7) aufkochen, auf 60°C abkühlen, 18 ml Formaldehyd und 1 μ l EtBr (10 mg/ml) dazugeben. Nach dem Aushärten das Gel in 1X MOPS-Puffer für 20 min bei 40 Volt vorlaufen lassen. RNA-Marker und Proben mit Denaturierungs-Mix versetzen. Den Denaturierungs-Mix immer frisch ansetzen, Endkonzentration im RNA-Mix: 5 Volumen Formamid, 1 Volumen 10X MOPS-Puffer, 2 Volumen Formaldehyd-Lösung (37%ig). 10 μ g total-RNA pro Spur ergaben in der Hybridisierung gute Ergebnisse. Die RNA-Proben und den RNA-Marker für 10 min auf 70°C erhitzen, mindestens 2 min auf Eis stellen und 1/10 Volumen Probenpuffer (10X Probenpuffer: 60% Glycerin, 200 mM EDTA, 0,0025% Bromphenolblau) dazugeben. RNA-Proben zügig auftragen, das Gel in 1X MOPS-Puffer bei 30 V einlaufen lassen und später auf 60 V hochstellen. Den Laufpuffer mindestens 1X pro Stunde vermischen, da sich ein pH-Gradient aufbaut. Das fertige Gel unter einer UV-Lampe fotografieren. Es sollten zwei deutliche Banden der leichten und der schweren ribosomalen RNA zu erkennen sein. Zum Blotten mit einem Vakuum-Blotter ein Loch in eine Plastikfolie schneiden, welchen etwas kleiner ist als das zu blottende Gel. Den Blotter in der Reihenfolge Whatman-Papier/Nylonmembran (Hybond-N; Amersham, Uppsala, Schweden)/ Plastikfolie mit Loch/Gel bestücken. Das Gel mit 20X SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na₃-Zitrat, pH 7) überschichten und ein Vakuum von 40-60 mbar anlegen. Etwa 60-90 min blotten und dabei das 20X SSC immer wieder nachfüllen. Die RNA unter UV-Licht für 1 min kreuzvernetzen.

Herstellung der Poldip2-Sonde: Zur Herstellung der Sonde wurde der Vektor pOTB7, welcher das humane Poldip2 (Acc.-Nr.: BC009265) enthält, mit den Enzymen AflIII und EcoO139I geschnitten. Beide Enzyme schneiden nicht im Vektor. Die resultierenden Poldip2-Fragmente von 44 bis 427bp Länge wurden über ein Agarosegel gereinigt und direkt für die radioaktive Markierung mit [³²P]dCTP mittels Random-Priming eingesetzt. Für **alle anderen Sonden** wurde ein Fragment der jeweiligen cDNA mittels PCR vervielfältigt, die Bande über ein Agarosegel gereinigt und die cDNA anschließend für die radioaktive Markierung mit [³²P]dCTP mittels Random-Priming eingesetzt. Alle verwendeten Primer-Paare und Matrizen-cDNAs sind in Tabelle 4 im Material-und-Methoden-Abschnitt aufgeführt.

Hybridisierung einer RNA-tragenden Nylonmembran mit radioaktiv-markierter Sonde:

Zur Prähybridisierung zerstückelte Lachshoden-DNA (*sheared salmon testes DNA*, 2 mg pro Blot vom keinen Gel) 5 min kochen und sofort auf Eis stellen. Den Blot mit ddH₂O anfeuchten und in ein Hybridisierungsröhrchen tun. Die Lachshoden-DNA mit vorgewärmter (68°C) ExpressHyb-Lösung (BD Clontech, CA, USA) mischen (2 mg/20 ml) und 10 ml davon auf den Blot geben. Mindestens 5 ml Rest bei 68°C aufheben! Das Hybridisierungsröhrchen 30 min im Hybridisierungsofen bei 68°C drehend inkubieren. Um die Sonde mit dem Rediprime II DNA-Labeling System (Amersham, Uppsala, Schweden) radioaktiv zu markieren, 2,5-25 ng DNA in 45 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,8) 5 min kochen und sofort wieder auf Eis geben. Die denaturierte DNA in ein Rediprime-Röhrchen geben und NICHT mischen. 2,5 µl [³²P]dCTP (20 mCi/ml, Amersham, Uppsala, Schweden) dazugeben und gut mischen. 10 min bei 37°C und 20-60 min bei Raumtemperatur inkubieren. Zum Ansatz 0,5 µl 2 M EDTA dazugeben, 5 min kochen, 5 min auf Eis stellen und die Flüssigkeit durch eine kurze Zentrifugation unten im Röhrchen sammeln. Die Sonde mit der vorbereiteten und vorgewärmten ExpressHyb/Lachshoden-DNA-Lösung mischen. Bei 25 ng eingesetzter cDNA ca. 14 µl Sonde pro 5 ml ExpressHyb-Lösung einsetzen. Die Prähybridisierungslösung verwerfen und die Lösung mit der Sonde auf den Blot geben. Über Nacht bei 68°C im Hybridisierungsofen drehend inkubieren. Den Blot mit Waschpuffer 1 (2X SSC, 0,05% SDS; ca. 300 ml/Blot benötigt) 1 x bei Raumtemperatur spülen und 2 x bei 30°C für 5 min im Hybridisierungsofen drehend waschen. Den Blot mit Waschpuffer 2 (0,1X SSC, 0,1% SDS; ca. 100 ml/Blot benötigt) 2 x bei 50°C für 20 min im Hybridisierungsofen drehend waschen. (Die selbst hergestellten Zelllinien-Northern-Blots wurden 2h bei 55°C (CHO und Mauszellen) bzw. 3h bei 68°C (Rattenzellen und humane Zellen) gewaschen.) Den Blot in Folie einschweißen und in Phospho-Imager-Kassetten über Nacht exponieren. Die Auswertung erfolgte am Phospho-Imager.

cDNA-Array-Analyse

Im Gegensatz zum "normalen" Northern-Blot sind auf einem Array cDNAs gespottet, die mit radioaktiv-markierter RNA hybridisiert werden. Daher wird der Array auch als "inverser Northern-Blot" bezeichnet. Die zum Hybridisieren verwendete RNA wird z.B. aus unterschiedlich behandelten Zellen gewonnen, so dass ein Mengen-Vergleich der transkribierten mRNA möglich ist. Die Menge und Art der zu untersuchenden mRNAs hängt nur von der Menge und Art der gespotteten cDNAs ab. In dieser Arbeit wurden so genannte Makro-Arrays verwendet, d.h. die cDNAs waren auf Nylonmembran aufgebracht. Der verwendete Atlas Rat 1.2 Array II (Katalog-Nr. 7856-1, Clontech, Palo Alto, CA, USA) umfasste 1176 verschiedene cDNAs aus der Ratte, deren Liste unter www.clontech.com abrufbar ist. Mit den Array-Membranen wurden alle im Folgenden benutzte Materialien mitgeliefert, außer [³²P]dATP (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol; #PB10204, Amersham, Uppsala, Schweden); zerstückelte Lachshoden-DNA (*sheared salmon testes DNA*); 10X Denaturierungslösung (1 M NaOH, 10 mM EDTA); 2X Neutralisierungslösung (1 M NaH₂PO₄, pH 7); 20X SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na₃-Zitrat, pH 7); 20% SDS; Waschlösung 1 (2X SSC, 1% SDS) und Waschlösung 2 (0,1X SSC, 0,5% SDS)

Herstellung radioaktiv-markierter cDNA aus total RNA: Einen Mastermix für jede Markierungsreaktion ansetzen (für Test-RNA und Kontroll-RNA). Für 3 Reaktionen (wegen Pipettierfehler): 6 µl 5X Reaction-Buffer, 3 µl 10X dNTP-Mix für ATP-Markierung, 10,5 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (10 µCi/µl), 1,5 µl 100 mM DTT, 3µl MMLV Reverse Transkriptase (50 U/µl; kann durch SuperscriptIII ersetzt werden). Ein PCR-Gerät auf 70°C vorheizen. Für jede Reaktion in PCR-Röhrchen 5 µg Gesamt-RNA in maximal 2 µl Volumen mit einem µl 10X CDS-Primer-Mix mischen und gegebenenfalls mit ddH₂O auf 3 µl auffüllen. Die Ansätze 2 min bei 70°C inkubieren, das PCR-Gerät auf 50°C einstellen und die Ansätze weitere 2 min inkubieren. 8 µl Mastermix in jeden Ansatz geben und 25 min bei 50°C inkubieren. Die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 10X Terminations-Mix beenden. Um die [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP-markierte RNA von nicht inkorporiertem [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP zu reinigen, wurden Chroma Spin-200 DEPC-H₂O Säulen verwendet. Die Säulen 1 h auf Raumtemperatur bringen und schwenken, um die Gelmatrix zu resuspendieren. Den unteren und dann den oberen Deckel langsam lösen und die Säule in ein 1,5 ml Röhrchen stellen. Die Flüssigkeit auslaufen lassen und verwerfen. Den Markierungs-Ansatz vorsichtig in die Mitte des Gelbettes pipettieren und ganz einlaufen lassen. 40 µl ddH₂O auf das Gelbett pipettieren, ganz einlaufen lassen und den Durchlauf entsorgen. 350 µl ddH₂O auf das Gelbett pipettieren, ganz einlaufen lassen und den Durchlauf entsorgen. Die Säule in ein frisches 1,5 ml Röhrchen stellen, 200 µl ddH₂O auf das Gelbett pipettieren, ganz einlaufen lassen und den Durchlauf für die Hybrisierung verwenden.

Hybridisierung von cDNA-Arrays: Zur Prähybridisierung zerstückelte Lachshoden-DNA (*sheared salmon testes DNA*, 1,5 mg pro Blot, 3mg gesamt) 5 min kochen und sofort auf Eis stellen. Den Blot mit ddH₂O anfeuchten und in ein Hybridisierungsröhrchen tun. Die Lachshoden-DNA mit vorgewärmter (68°C) ExpressHyb-Lösung (BD Clontech, CA, USA) mischen (3 mg/40 ml) und 10 ml davon auf jeden Blot geben. Mindestens 5 ml Rest pro Blot bei 68°C aufheben! Das Hybridisierungsröhrchen 30 min im Hybridisierungsofen bei 68°C drehend inkubieren. Die Sonde mit 22 µl (0,1 Volumen) Denaturierungslösung mischen und bei 68°C 20 min inkubieren. 5 µl C₀t-1-DNA (1 µg/µl) und 227 µl (1 Volumen) 2X Neutralisierungslösung dazugeben und 10 min bei 68°C weiterinkubieren. Die Sonde mit 5 ml der vorbereiteten und vorgewärmten ExpressHyb/Lachshoden-DNA-Lösung gut mischen. Die Prähybridisierungslösung verwerfen und die Lösung mit der Sonde auf den Blot geben. Über Nacht bei 68°C im Hybridisierungsofen drehend inkubieren. Die Waschlösungen 1 und 2 auf 42°C vorwärmen. Die Membran nie trocknen lassen! Den Blot mit Waschlösung 1 x spülen und 2 x bei 42°C für 30 min im Hybridisierungsofen drehend waschen. Den Blot mit Waschpuffer 2 (0,1X SSC, 0,1% SDS; ca. 100 ml/Blot benötigt) 2 x bei 42°C für 30 min im Hybridisierungsofen drehend waschen. Den Blot in Folie einschweißen und in Phospho-Imager-Kassetten bis zu 3 Tage exponieren. Die Messung erfolgte am Phospho-Imager. Die Auswertung erfolgte zunächst visuell, später ermöglichte Andreas Klein (Berlin) die Nutzung der BD Atlas Image 2.7 Software. Um die Membran zu "strippen", also von der Sonde zu befreien, wurden 200 ml 0,5% SDS zum Kochen gebracht und auf den Blot in einem Hybridisierungsröhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde für 1 h bei 85°C im Hybridisierungsofen drehend gewaschen. Die Lösung wurde entsorgt, der Blot mit Waschlösung 1 gespült, in Folie eingeschweißt und in einer Phospho-Imager-Kassetten 1 Tag exponiert. Die Entfernung der Sonde wurde mit dem Phospho-Imager überprüft. Die Membranen können bei -20°C aufbewahrt werden.

Bakterienstämme, Kultivierung und Transformation

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS (Invitrogen); Genotyp: F⁻ ompT, hsdSB (rB- mB-) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (CamR). Das konstitutiv transkribierte Gen für T7-Lysozym auf dem pLysS-Plasmid reduziert die Hintergrundexpression. Die T7-Polymerase ist in das Genom inseriert und lässt sich durch einen IPTG-sensitiven lacUV5-Promotor selektiv induzieren. Dieser Stamm wurde für die Überexpression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen benutzt. Die Transformation wurde wie unten beschrieben nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Kultivierung fand wie im Abschnitt ‚Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen‘ beschrieben statt.

Escherichia coli One Shot® TOP10 kompetente Zellen (Invitrogen); Genotyp: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) end A1 nupG. Dieser Stamm wurde für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA auf der Grundlage der Vektoren pcDNA3.1, pRC-CMV, pRSET, pGEX-4T und pCR-Blunt benutzt. Die Transformation wurde wie unten beschrieben nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Zellen wurden entsprechend dem im Vektor kodierten Resistenzgen mit 50 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin in LB-Medium kultiviert.

Escherichia coli One Shot® TOP10F' kompetente Zellen (Invitrogen); Genotyp: F'⁺{lacI^q Tn10 (Tet^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL end A1 nupG. Dieser Stamm wurde für die Vervielfältigung von pRAX Plasmid-DNA benutzt. Die Transformation wurde wie unten beschrieben nach Herstellerangaben durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden mit 50 µg/ml Ampicillin im LB-Medium kultiviert.

Escherichia coli One Shot® TOP10/P3 kompetente Zellen (Invitrogen); Genotyp: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL end A1 nupG; P3: Kan^R Amp^R (am) Tet^R (am). Dieser Stamm wurde für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA auf der Grundlage des Vektors pcDNA1 benutzt. Die Transformation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die transformierten Zellen wurden mit 100 µg/ml Ampicillin und 10 µg/ml Tetracyclin im LB-Medium kultiviert.

Die **Transformation** aller von Invitrogen erworbenen kompetenten Zellen erfolgte nach dem Hitzeschock-Prinzip. Kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, 5 µl eines Ligationsansatzes bzw. 0,1 µg der Plasmid-DNA wurde zugegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert, 30 sec bei 42°C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Zum Ansatz wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 20-200 µl wurden auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C kopfüber inkubiert.

Escherichia coli GM2163 (Fermentas, St. Leon-Roth); Genotyp: F⁻ dam-13::Tn9 (Cam^r) dcm-6 hsdR2 (r_k⁻ m_k⁺) leuB6 HisG4 thi-1 araC14 lacY1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136 (Str^r) fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1. Dieser Stamm wurde für die Vervielfältigung von Plasmid-DNA auf der Grundlage des Vektoren pcDNA3.1 benutzt, um eine Restriktion mit Methylierungs-sensitiven Enzymen (hier: BclI) zu ermöglichen. Da die Zellen nicht kompetent geliefert wurden, wurden sie unter Anwendung der Roti-Transform-Lösungen (Roth, Karlsruhe) nach Herstellerangaben **chemisch kompetent** gemacht und anschließend

transformiert. 0,1 µg der Plasmid-DNA wurde zu den kompetenten Zellen zugegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis und für 30 min bei 37°C inkubiert. 20-200 µl wurden auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C kopfüber inkubiert. Die transformierten Zellen wurden mit 50 µg/ml Ampicillin im LB-Medium kultiviert.

Allgemeine Kultivierungs-Bedingungen: Inkubation bei 220 rpm, 37°C, wenn nicht anders angegeben. LB-Medium: 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, ad 1 l ddH₂O, autoklavieren. LB-Agar: 1,5% w/v Agar. Antibiotika erst nach dem Autoklavieren dazugeben, wenn das Medium auf 60°C abgekühlt ist. Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden frische Über-Nacht-Kulturen 1:1 mit eiskalter Glycerinlösung (65% v/v Glycerin, 100 mM MgSO₄, 25 mM Tris-HCL, pH 8, autoklavieren) vermischt und bei -80°C eingefroren.

Yeast-Two-Hybrid-Methoden

Hefestämme und allgemeine Kulturbedingungen

Saccharomyces cerevisiae AH109: Genotyp: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ (Clontech).

Saccharomyces cerevisiae CG-1945: Genotyp: MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh², LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, URA3::GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ (Clontech).

Allgemeine Hefe-Kulturbedingungen: Die Hefezellen wachsen entweder auf Agarplatten bei 30°C oder in Flüssigmedium bei 30°C unter Schütteln (230-270 rpm). Die Hefen verdoppeln sich im Schnitt alle 3-5 h. Um über Nacht Flüssigkulturen anzuziehen, sollte man nur frische Kolonien von Agarplatten verwenden, die nicht älter als 2 Monate sind. Man verwendet eine große (2-3 mm Durchmesser) Kolonie für 5 ml Medium. Es ist wichtig, die Ansätze sehr gut zu mischen, um die Zellen wirklich zu vereinzeln. Nach Inkubation für 16-18 h bei 30°C und 230-270 rpm erreichen die Zellen gewöhnlich die stationäre Phase (OD₆₀₀>1,5). Um Zellen in der Wachstumsphase zu erhalten, transferiert man so viel einer Übernachtskultur, dass man als Ausgang eine OD₆₀₀=0,2-0,3 erhält und inkubiert diese für 3-5 h unter Schütteln (230-250 rpm) bei 30°C. So erreicht man meist eine OD₆₀₀ von 0,4-0,6.

YPDA-Medium: 20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 20 g Glucose, 0,03 g Adenin ad 1 l ddH₂O Pepton und Hefeextrakt werden in nicht ganz 1 l ddH₂O angesetzt und autoklaviert. Glucose und Adenin werden aus sterilen Stammlösungen dem autoklavierten Grundmedium zugesetzt. YPDA-Platten: wie Medium mit 20 g Agar.

Selektionsmedium: 13,4 g Hefe-Nitrogen Base (ohne Aminosäuren), 10 g Hefeextrakt, 20 g Glucose, 100 ml 10x Aminosäuren-Supplement, ad 1 l ddH₂O Die Nitrogen Base wird mit nicht ganz 1 l ddH₂O angesetzt und autoklaviert. Von Glucose und Aminosäuren werden aus sterilen Stammlösungen dem autoklavierten Grundmedium zugesetzt. Das 10-fach konzentrierte Aminosäuren-Supplement enthält alle außer einer oder mehrerer der folgenden

Komponenten (Beispiel: Das Trp/Leu-Supplement enthält alle der unten aufgeführten Komponenten außer Tryptophan und Leucin.) Die Aminosäuren-Supplemente können autoklaviert und bis zu 1 Jahr bei 4°C aufbewahrt werden. Serin, Aspartat und Glutamat sind in dem Aminosäuren-Supplement nicht enthalten, da sie das Medium zu sauer machen würden. Die Hefen sind in der Lage, diese Aminosäuren selbst zu synthetisieren. 10x Aminosäuren-Supplement: L-Isoleucin 300 mg/ml, L-Valin 1500 mg/ml, L-Adenin Hemisulfat 200 mg/ml, L-Arginin HCl 200 mg/ml, L-Histidin HCl Monohydrat 200 mg/ml, L-Leucin 1000 mg/ml, L-Lysin HCl 300 mg/ml, L-Methionin 200 mg/ml, L-Phenylalanin 500 mg/ml, L-Threonin 2000 mg/ml, L-Tryptophan 200 mg/ml, L-Tyrosin 300 mg/ml, L-Uracil 200 mg/ml, Selektionsplatten: wie Medium mit 20 g Agar. Der Agar sollte nicht zusammen mit der Nitrogen-Base autoklaviert werden. Am besten macht man zwei getrennte Ansätze zu je knapp einem halben Liter, man autoklaviert den Agar und gibt die Nitrogen-Base-Lösung, Glucose und Aminosäuren steriltfiltriert dazu, da sonst einzelne Bestandteile ausfallen.

Glycerinstocks und Arbeitskulturen: Hefezellen können über Jahre als 25% Glycerinstocks bei -80°C gelagert werden. Es wurde eine frische Übernachtkultur in Selektionsmedium mit sterilem 50%igen Glycerin vermischt und dann bei -80°C eingefroren. Um eine Agarplatte als Arbeitskultur zu erhalten, wurde ein Teil der Cryo-Kultur ausgestrichen und 3-5 Tage inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 2 mm hatten. Diese Kolonien wurden bis zu zwei Monate verwendet.

Transformation von Hefen nach der Lithium-Acetat-Methode

Die Transformation von Hefen mit mehreren Plasmiden kann entweder parallel oder sequentiell durchgeführt werden. Die Transfektionseffizienz sinkt bei der parallelen Kotransformation von 10^5 auf 10^4 Zellen pro μg DNA. Daher wurden die Kotransformationen nacheinander (sequenziell) durchgeführt. Prinzipiell ist jedoch auch die parallele Transfektion möglich und weniger arbeitsaufwendig. Für die Transformation ergeben frische Kolonien (maximal 3 Wochen alt) die besten Ergebnisse.

Pro Transformation werden mehrere große Kolonien (2-3 mm Durchmesser) in 1 ml Medium gut resuspendiert (5 min intensiv mischen!). Man überführt diese Zellsuspension in 50 ml des entsprechenden Mediums und inkubiert die Zellen für 16-18 h bei 30°C und 250 rpm. 30 ml oder mehr dieser Übernachtkultur werden in 300 ml YPDA-Medium überführt, bis eine OD_{600} von 0,2-0,3 erreicht ist. Man inkubiert für weitere 3 h bei 30°C und 230 rpm. Die OD_{600} sollte zwischen 0,4 und 0,6 liegen. Die Zellen werden in einem 50 ml-Röhrchen bei 1000 x g für 5 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird gründlich in sterilem TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7,5) aufgenommen. Man sammelt die resuspendierten Zellen in einem Röhrchen (Endvolumen 25-50 ml) und zentrifugiert nochmals bei 1.000 g für 5 min bei RT. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet wird in 1 ml frisch angesetzter Lösung 1 (Lösung 1: 0,1 M LiAc, 0,5X TE, 1 M Sorbitol; 10X TE: 100 mM Tris/ 10 mM EDTA) resuspendiert. In einem neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäß legt man 1 μg Plasmid-DNA und 0,05 mg Herings-Sperma-DNA vor. Darauf pipettiert man 40 μl der Zellen in Lösung 1, gibt weitere 230 μl von Lösung 2 (0,1 M LiAc, 1X TE, 40% Polyethylenglykol) dazu und mischt das Ganze vorsichtig. Diese Mischung inkubiert man 30 min bei 30°C und 200 rpm. Man gibt 30 μl DMSO dazu und mischt ganz vorsichtig. Bei 42°C

werden die Zellen für 7 min einem Hitzeschock unterzogen und anschließend für 1-2 min auf Eis gestellt. Man zentrifugiert die Zellen für 5 s bei 13.000 rpm bei RT, nimmt das Zellpellet in 0,2 ml 1x TE auf, plattiert alles auf den entsprechenden Selektionsplatten aus und inkubiert diese kopfüber bei 30°C. Werden mehrere Plasmide gleichzeitig transformiert, gibt man von jedem Plasmid 1 µg Plasmid-DNA zusammen mit der Träger-DNA in den Reaktionsansatz.

Yeast-Two-Hybrid-Screen und Selektion von positiven Klonen

Eine Beschreibung der Funktionsweise des Yeast-Two-Hybrid-Assays ist im Ergebnisteil zu finden. Für die Yeast-Two-Hybrid Analyse wurde das MATCHMAKER 3 System (BD Biosciences Clontech) benutzt. Die zytoplasmatische Domäne des Ratten-CEACAM1-L (Aminosäuren 447-519, CC1-zyto) [Budt et al., 2002b] wurde in die BamHI- und PstI-Schnittstellen des Vektors pGBKT7 kloniert und in den Hefestamm AH109 transformiert. Ein aus dieser Transformation erhaltener Klon wurde dann mit einer cDNA-Bibliothek kotransformiert. Die MATCHMAKER Rattenleber-cDNA Bibliothek (BD Biosciences) lag im Vektor pACT2 vor und war über die XhoI- und EcoRI-Schnittstellen ligiert. Die Bibliothek umfasste $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone.

Die Klone dieser Transformation wurden auf Selektionsmedium ohne Leucin (Selektion auf Vorhandensein des pACT2 Vektors), Tryptophan (Selektion auf Vorhandensein des pGBKT7 Vektors) und Histidin (Selektion auf eine HIS3 Reportergenaktivität) kultiviert. Ein erster Test auf die Aktivität des lacZ Reportergens (Expression der β -Galaktosidase) erfolgte mittels Filter-Lift-Assay. Klone, welche mit einer besonders intensiven Blaufärbung reagieren, wurden zur Sequenzierung ausgewählt.

Plasmid-DNA wurde mithilfe des YEASTMAKER Yeast Plasmid Isolation Kit (BD Biosciences Clontech) aus den Hefen isoliert, in *E. coli* One Shot TOP10 transformiert und sequenziert. Nachdem bekannte falsch-positive Klone sowie nicht im Leserahmen oder im falschen Leserahmen liegende Klone aussortiert waren, wurden die restlichen Klone in die Hefestämme AH109 und CG1945 transformiert. Lag in beiden Stämmen keine Autoaktivierung der Reportergene vor (kein Wachstum auf Histidin-Mangelmedium, keine Blaufärbung im Filter-Lift-Assay), wurden die Klone mit Kontroll-Plasmiden und mit dem Bait-Plasmid (pGBKT7-CC1-zyto) kotransformiert.

Die Doppeltransformanten wurden wieder auf Expression der Reportergene HIS3 (Wachstum auf Histidin-Mangelmedium), lacZ (Blaufärbung im Filter-Lift-Assay) und MEL1 (α -Galaktosidaseaktivität im quantitativen α -GAL Assay) getestet. Als Negativkontrollvektoren wurden pGBKT7-DNA-BD und pGBKT7-Lam kotransformiert. Als Positivkontrollvektoren dienten pCL1 (alleine transformiert), und pGADT7-T mit pGBKT7-53 kotransformiert.

Quantitativer α -Galaktosidase-Assay (MEL1 Reportergenaktivität)

Es werden pro zu untersuchendem Klon je 3 Kulturen in 2-5 ml SD-Selektionsmedium angeimpft, sehr gut gevortext und die OD₆₀₀ bestimmt. Diese soll zwischen 0,5 und 1 liegen. Von den Kulturen je 1 ml in ein 1,5 ml Eppi geben und die Zellen bei 13.000 rpm für 2 min in der Tischzentrifuge pellettieren. Den Überstand vorsichtig in eine 1-ml-Küvette überführen und aufheben. Genügend Assaypuffer aus 2 Volumen 0,5 M Na-Acetat (pH 4,5) und 1 Volumen PNP- α -Gal-Lösung (100 mM p-Nitrophenyl α -D-Galaktopyranoside: 30,1 mg in 10 ml ddH₂O, immer frisch ansetzen!) herstellen. Für ein Küvetten-Volumen von 1 ml werden 24 μ l je Probe benötigt. Vom Kulturüberstand 8 μ l in eine 1-ml-Küvette pipettieren, 24 μ l Assaypuffer dazugeben, die Küvette abdecken (z.B. Parafilm) und bei 30°C für 60 min inkubieren. Die Reaktion mit 960 μ l 100 mM Na₂CO₃ stoppen und die OD₄₁₀ bestimmen. Die Berechnung der vorhandenen Einheiten an α -Galaktosidase (1 Einheit = die Menge an Enzym, die 1 μ Mol p-Nitrophenyl- α -D-Galaktosid in 1min bei 30°C in Acetatpuffer pH 4,5 zu p-Nitrophenol und D-Galaktose hydrolysiert) erfolgte nach der folgenden Formel:

$$[\text{Millieinheiten}/(\text{ml} \times \text{Zelle})] = \text{OD}_{410} \times 200\mu\text{l} \times 1000 / [(\epsilon \times b) \times t \times 16\mu\text{l} \times \text{OD}_{600}]$$

t = Inkubationszeit in min

OD₆₀₀ = optische Dichte bei 600nm der Über-Nacht-Kultur

$\epsilon \times b$ = molare Absorption p-Nitrophenol bei 410nm x Länge des Lichtweges in cm
= 10,5ml/ μ Mol)

Filter-Lift-Assay (β -Galaktosidase, lacZ Reportergenaktivität)

Platten mit 1-3 mm großen Kolonien werden mit einem sterilen Whatman-#5-Filter abgeklatscht (asymmetrische Markierung nicht vergessen). Die Platten wurden weiter kultiviert, um später als positiv identifizierte Klone picken zu können. Den Filter für 10 s in flüssigen Stickstoff gegeben, um die Hefen aufzubrechen. Den wieder aufgetauten Filter dann mit den Kolonien nach oben ohne Luftblasen einzuschließen auf einen mit 2,5-5 ml Z-Puffer-XGal-Lösung vollgesaugten Filter geben. Die Inkubation für die Farbentwicklung kann bei Raumtemperatur oder bei 30°C erfolgen und dauert 30 min bis 8 Stunden. Eine Inkubation über 8 h kann in einer erhöhten Zahl falsch positiver Kolonien resultieren. Benötigte Lösungen: Z-Puffer: 16,1 g/l Na₂HPO₄ x 7 H₂O / 5,5 g/l NaH₂PO₄ x H₂O / 0,75 g/l KCl / 0,246 g/l MgSO₄ x 7 H₂O. X-Gal Stocklösung: 20 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid in DMF (N,N-Dimethylformamid), bei -20°C im Dunkeln lagern. Z-Puffer-X-Gal-Lösung: 100 ml Z-Puffer / 0,27 ml β -Mercaptoethanol / 1,67 ml X-Gal-Stocklösung.

Zellbiologische Methoden für Säugerzellen

Zelllinien, Primärzellen, allgemeine Zellkulturbedingungen und Transfektion

Die Zelllinien **M2** und **A7** [Cunningham et al., 1992] wurden uns von Brigitte M. Jockusch und Wolfgang Ziegler (Braunschweig) zur Verfügung gestellt. M2- und A7-Zellen wurden mit pCDNA1 Vektor, welcher die cDNA vom humanen CEACAM1-4L enthielt [Barnett et al., 1989], transfiziert. Hierzu wurde Lipofectamin (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt (siehe unten). Die transfizierten Zellen wurden durch G418-Resistenz selektioniert (0,6 g/l) und durch limitierende Verdünnung subkloniert. Die für diese Arbeit benutzten Zelllinien wurden wie unten beschrieben durch FACS- sowie Western-Blot- und RT-PCR-Analyse auf die Expression von CEACAM1, Filamin A und verschiedenen anderen Proteinen untersucht. Die M2- und A7-Zelllinien sowie die aus diesen Zellen hervorgegangenen Zelllinien **M2-CC1** und **A7-CC1**, wurden im Folgenden Medium kultiviert: MEM mit Earles Salzen (Gibco), 2% FCS, 8% NCS, 1:100 Penicillin/Streptomycin (Gibco, Detroit, USA); wenn nötig 0,6 g/l G418.

Mit Ratten-CEACAM1-L transfizierte Endothelzelllinien aus dem Rattenhirn (**RBE**, rat brain endothelial cells) wurden bereits beschrieben [Müller et al., 2005]. Außerdem wurden mit CEACAM1-S, CEACAM1- Δ cyto, CEACAM1-L(Y488F), CEACAM1-L(Y513F) und CEACAM1-L(Y488,513F) transfizierte RBE-Zellen benutzt. RBE-Zellen wurden im Folgenden Medium kultiviert: RPMI, 10% FCS, 440 mg/l L-Glutamin, 1:100 Penicillin/Streptomycin, wenn nötig 0,6 g/l G418 (alles Gibco).

Humane Granulozyten wurden wie bereits beschrieben aus dem Blut gesunder Mitarbeiter präpariert [Singer et al., 2002]. Vor der Lyse wurden sie mit 10 ng/ml PMA in RPMI /10% FCS inkubiert und konnten für 1 h auf Zellkulturschalen adherieren.

Weitere benutzte Zelllinien: **NBT-II** (Nara bladder carcinoma II, epithelial, Ratte), **HT29** (Coloncarzinom-Zellen, epithelial, human), **HeLa** (Cervixcarcinom, epithelial, human), **IEC6** (Intestinal Epithelial Cells, human), **HaCat** (Keratinocyten, human), **Jurkat** (T-Zell Ursprung, human), **NB4** (monocytärer Ursprung, human), **N2A2** (neuronal, Maus), **ES** (Embryonale Stammzellen, Maus), **CHO** (Chinese Hamster Ovary, epithelial). Alle Zellen wurden in RPMI, 10% FCS, 440 mg/l L-Glutamin, 1:100 Penicillin/Streptomycin (alles Gibco, Detroit, USA). gehalten. **PC12**-Zellen (neuronal, Ratte) wurden in RPMI, 10% Pferde-Serum, 440 mg/l L-Glutamin, 1:100 Penicillin/Streptomycin (alles Gibco) gehalten. Die Differenzierung der PC-12-Zellen erfolgt in Zellkulturschalen, die mit Kollagen-IV (20 μ g/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet wurden. Pro cm^2 werden 5×10^4 Zellen ausgesät. Bei 250 ng/ml NGF die Differenzierung in einem Zeitraum von 72 h.

Allgemeine Kulturbedingungen: Alle Säuger-Zelllinien wurden im Zellkultur-Brutschrank, (Heraeus 6000, Kendro Laboratory Products) bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung kultiviert. Das Passagieren erfolgt bei 80-90% Konfluenz der adhären Zellen alle 2-3 Tage. Hierzu wurden die Zellen mit PBS (*phosphate-buffered saline*) mit 0,05% EDTA abgelöst (außer NBT-II) und in Aliquots auf die neuen Kulturschalen/-flaschen verteilt. NBT-II- und HaCat-Zellen bauen eine besonders widerstandsfähige Zell-Matrix-Verbindung auf, sie werden mit PBS/0,05% EDTA gewaschen und mit Viralex-Trypsin (PAA, Cölbe) in PBS/EDTA

abgelöst. Wenn nötig, wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer oder mit einem Coulter Particle Counter Z1 gezählt. Zellkultur-Materialien wurden von den Firmen BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Biochrom KG (Berlin), Corning (New York, USA), Nunc (Wiesbaden), PAA (Cölbe) und TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

Cryo-Kulturen: Zum Zurückfrieren von Zellstocks wurden Zellpellets in FCS/10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und in Cryo-Röhrchen in einem Isopropanolbad über Nacht bei -80°C eingefroren. Anschließend können die Zellen über Jahre in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, werden die Cryo-Röhrchen rasch bei 37°C aufgetaut und in vorgewärmtes Medium pipettiert. Die Zellen werden vor dem Ausplattieren mindestens 1 mal bei 900 rpm abzentrifugiert, um das DMSO zu entfernen.

Transfektion mit Lipofektamin: Zu transfizierende Zellen wurden am Vortag in eine 6cm-Schale ausplattiert (die Schale sollte am Tag der Transfektion konfluent bewachsen sein, dies entspricht ca. $2,6 \times 10^6$ Zellen \Rightarrow $1,3 \times 10^6$ Zellen aussäen). Für die Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 5 ml neues, serumhaltiges Medium OHNE ANTIBIOTIKA (Pen/Strep) dazugegeben. Lösung A: $8\mu\text{g}$ DNA ad $500\mu\text{l}$ OPTI-MEM-Medium, 5min RT. Lösung B: $20\mu\text{l}$ LIPOFEKTAMIN + $480\mu\text{l}$ OPTI-MEM-Medium, 5min RT. Lösung A und B wurden gemischt und zu den Zellen getropft. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert. Teilweise wurde nach 5 h das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und über Nacht im entsprechenden serumhaltigen Medium OHNE ANTIBIOTIKA (Pen/Strep) kultiviert. Am Abend nach der Transfektion wurden die Zellen umgesetzt und nun im entsprechenden serumhaltigen Medium mit Pen/Strep kultiviert. Am Tag darauf wurde das Medium gegen das entsprechende Serum- und Pen/Strep-haltige Medium mit 0,6 bis 1,5 g/l G418 (Geneticin) gewechselt. Die folgenden 6 Tage wurde täglich frisches Selektionsmedium gegeben und die Zellen anschließend subkloniert.

Proliferations-Assays

Zur Bestimmung des **spontanen Proliferationsverhaltens** von Zellen wurde der kolorimetrische BrdU-Cell-Proliferation-ELISA von Roche (Mannheim) eingesetzt, der auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) beruht. Die Zellen wurden mit BrdU unter Zellkulturbedingungen inkubiert (Markierung der Zellen) und nach Fixieren und Lysieren der Zellen wird das eingebaute BrdU über einen Peroxidasegekoppelten anti-BrdU-Antikörper detektiert und quantifiziert. Es wurden 1×10^4 Zellen/Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden teilweise mit $15\mu\text{g/ml}$ Antikörper (4/3(17, 18/20), 1 ng/ml TGF- β , 100 nM Insulin, oder verschiedenen Mengen an löslichen Fc-CEACAM1-Fusionsproteinen ($1-10\mu\text{g/ml}$) kultiviert. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen für 4 h mit BrdU (Endkonzentration $10\mu\text{M}$) inkubiert. Alternativ wurde das BrdU direkt zu Beginn dazugegeben und die Zellen dann für 24 h inkubiert. Die Platte wurde nach Beendigung der Inkubation ausgeschlagen und mit $200\mu\text{l/Well}$ FixDenat für 30 min bei RT fixiert. Die Lösung wurde wieder ausgeschlagen, $100\mu\text{l/Well}$ anti-BrdU-Peroxidase ($10\mu\text{l/ml}$) wurden zugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Die Platte wurde ausgeschlagen, 3x mit $100\mu\text{l/Well}$ 1x Waschpuffer gewaschen und 15 min bei RT mit $100\mu\text{l/Well}$ Substratlösung (Tetramethylbenzidin) inkubiert. Anschließend wurde die Platte

bei 405 nm im ELISA-Reader (Sunrise, Tecan) gemessen. Pro Ansatz wurden mindestens 3 Well vermessen.

Um die **Proliferationsrate im Monolayer-Wundheilungs-Assay** zu bestimmen, wurden konfluente Zellen 24 h nach dem Setzen der Wunde für 1 h mit 10 μM BrdU inkubiert, PFA-fixiert und für 2 h mit 1:10 verdünntem FastImmune anti-BrdU-FITC Antikörper/DNase (BD Biosciences) inkubiert. Die Präparate wurden eingedeckelt und bei 40-facher Vergrößerung mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop untersucht (siehe auch Abschnitt 'Indirekte Immunfluoreszenz'). Zellen, welche eine BrdU-Inkorporation zeigten, wurden gezählt. Es wurden je 5 an die zellfreie Wunde grenzende Felder von 50 μm^2 je Präparat ausgezählt und daraus ein Durchschnittswert und die dazugehörige Standardabweichung bestimmt.

Adhäsions-Assays und morphologische Untersuchungen

Die Fähigkeit von Zellen, auf verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) zu adhären, kann im Adhäsions-Assay getestet werden. Die Zahl der adhären Zellen wird nach der Färbung der Zellen photometrisch im ELISA-Reader bestimmt. Als Kontrolle für eine unspezifische Adhäsion wird Poly-L-Lysin (PLL) eingesetzt. Sonstige verwendete Matrixkomponenten: Kol-I, Kollagen-1; Kol-IV, Kollagen-IV; FN, Fibronectin; LN, Laminin-1 (Roche); VN, Vitronectin; Matrigel, komplexe Mischung aus allen ECM-Komponenten (Laminin-5-reich, BD Biosciences).

Es wurden zellkulturbehandelte 96-Well-Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PLL, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kol-I, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kol-IV, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LN 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FN, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VN bzw. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Matrigel in PBS beschichtet. Die Platten wurden 1x mit PBS gewaschen und mit 1% BSA für 4 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Zellen wurden 1 h vor Versuchsbeginn serumstarviert. 3×10^3 Zellen/Well wurden in 200 μl serumfreien Medium ausgesät und für 10, 30 oder 60 min im Brutschrank inkubiert. Nicht adhären Zellen wurden durch Waschen mit PBS entfernt. Die adhären Zellen wurden für 10 min bei RT mit 4% PFA in PBS fixiert, mit PBS gewaschen und dann mit 0,1% Kristallviolett für 25 min bei RT gefärbt. Die Farbe wird vorsichtig durch Untertauchen der Platte in ddH₂O ausgewaschen und die Platte wird anschließend getrocknet. Die gefärbten Zellen werden mit 200 μl 0,5% Triton X-100 in ddH₂O lysiert. Nach ca. 1 h Inkubation auf einem Schüttler wird die OD570 (Optische Dichte bei 570 nm) mit einem ELISA-Reader bestimmt. Pro Versuchsansatz werden für jeden Wert mindestens drei Wells zur Auswertung herangezogen, aus denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt werden.

Für **morphologische Untersuchungen** durften Zellen auf mit Matrixproteinen beschichteten 8-Well Objektträgern für 30-120 min adhären. Sie wurden anschließend PFA-fixiert und mit TRITC-Phalloidin oder mit verschiedenen primären und den dazugehörigen sekundären Antikörpern, wie im Abschnitt 'indirekte Immunfluoreszenz' beschrieben, gefärbt.

Koloniebildungs-Assays (2D und 3D)

Für **2-Dimensionale Kolonie-Assays** die Zellen gut vereinzeln und sehr dünn (100 Zellen/10 cm-Schale) aussähen. Entstandene Kolonien nach 7-14 Tagen vergleichen.

Softagar 3D-Kolonie-Assay: Es wird autoklavierter 3,3% Agar in PBS und ZK-Medium benötigt. Ein Wasserbad auf 37°C und eines auf 45°C einstellen. Medium auf 37°C vorwärmen. Den 3,3%igen Agar kochen und so verflüssigen, dann abkühlen lassen und zusammen mit dem Medium für 10 min bei 45°C inkubieren. Im 50 ml-Röhrchen für vier 6-Well-Platten (12 ml pro Platte) 7,5 ml 3,3% Agar mit 42,5 ml Medium vermischen (optional: EGF mit einer Endkonzentration von 10 ng/ml dazugeben), 2 ml pro Well in die Platten füllen und die Platten für 30 min bei 4°C ohne Erschütterungen erkalten lassen. Die Platten sind bis zu 1 Woche nutzbar. Die Platten aus dem Kühlraum holen, das Wasserbad auf 41°C stellen und das Medium für 10 min inkubieren. Die Zellen ablösen und die folgenden Zell-Konzentrationen in Medium ansetzen: 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 und 5×10^1 Zellen/ml. Im 50 ml-Röhrchen (3 Well pro Experiment = 1 ml pro Experiment) 2 ml 3,3% Agar mit 8 ml Medium vermischen. Dann je 1 ml Agar-Medium mit 1 ml Zellsuspension mischen und vorsichtig 3 x 0,5 ml davon auf die Agarplatten aufbringen. Die Platten 30 min bei 4°C 30 min erhärten lassen, mit 3 ml Medium überschichten (optional) und in den Inkubator stellen. Die Koloniebildung nach 1-3 Wochen dokumentieren.

Chemotaktischer Transwell-Invasions-Assay

Um die Invasion von einzelnen Zellen zu testen, wurden chemotaktische Transwell-Invasions-Assays durchgeführt. Diese basieren, wie schematisch in Abb. 17A im Ergebnisteil gezeigt, auf einem Zwei-Kammer Kultur-System, bei dem die beiden Kammern durch eine poröse, innen mit einer künstlichen extrazellulären Matrix beschichteten Membran getrennt sind (BD Biocoat Matrigel Invasions-Kammern, 6,4 mm, 8 µm pore size, PET Membran; bei -20°C aufbewahren; BD Labware). Die Platte mit den Invasions-Kammern wurde bei RT aufgetaut, mit 500 µl serumfreiem Medium bestückt und 2 h bei 37°C im Inkubator rehydriert. Überschüssige Flüssigkeit wurde abpipettiert und 750 µl M2-konditioniertes Medium in die untere Kammer gegeben. Die Zellen wurden für 1 h serumstarviert und 1×10^5 Zellen/Well in 500 µl serumfreien Medium wurden in die obere Kammer gegeben (doppel- oder dreifach-Werte!). Die Ansätze wurden 20 h inkubiert. Die nicht migrierten Zellen auf der Innenseite wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Dann wurden die restlichen Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA/0,025% Saponin in PBS (ca. 600 µl/Well) fixiert und permeabilisiert. (Für Testläufe: Die untere Kammer mikroskopisch auf Zellen untersuchen, die zwar migrieren, aber nicht am Filter adhären.) Die Färbung erfolgte für 10 min mit 0,1% Kristallviolett (vor Gebrauch filtrieren). Zum Entfärben wurde mit ddH₂O gespült. Der Filter wurde direkt bei 200 X Vergrößerung mit einem Okular mit Standardquadrat (*unit field*) ausgezählt. Es wurden 5 Felder je Filter und 3 Filter je Ansatz ausgezählt.

Chemotaktischer Transwell-Migrations-Assay (Boyden-Chamber)

Um die Migration einzelner Zellen unabhängig von der Invasion zu testen, wurden chemotaktische Transwell-Migrations-Assays durchgeführt, die ebenfalls auf dem Zwei-Kammer Kultur-System basieren (6,5 mm Transwell Pat Pending, 8 µm Porengröße, Polycarbonatmembran; Costar; vergleiche Abb. 18A im Ergebnisteil). Die Außenseite der porösen Membran wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit 50 µl 5 mg/l Gelatine beschichtet (keine Vibrationen! nicht unter einer laufenden Bench!). Überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig abpipettiert (Filter nicht verwenden, wenn die Flüssigkeit ganz durchgelaufen ist). In die untere Kammer wurde 500 µl M2-konditioniertes Medium gegeben (vergleiche Cunningham 1992). Die Zellen wurden für 1 h serumstarviert und $2,5 \times 10^4$ Zellen/Well in 100 µl serumfreien Medium wurden in die obere Kammer gegeben (doppel- oder dreifach-Werte!). Die Ansätze wurden 4 h inkubiert. Die nicht migrierten Zellen auf der Innenseite wurden mit einem Wattestäbchen entfernt. Dann wurden die migrierten Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA/0,025% Saponin in PBS (ca. 600 µl/Well) fixiert und permeabilisiert. (Für Test-Läufe: Die untere Kammer mikroskopisch auf Zellen untersuchen, die zwar migrieren, aber nicht am Filter adhären.) Die Färbung erfolgte für 10 min mit 0,1% Kristallviolett (vor Gebrauch filtrieren). Zum Entfärben wurde mit ddH₂O gespült. Der Filter wurde direkt bei 200 X Vergrößerung mit einem Okular mit Standardquadrat (*unit field*) ausgezählt. Es wurden 5 Felder je Filter und 3 Filter je Ansatz ausgezählt.

Monolayer-Wundheilungs-Assay

Für Wundheilungs-Assays wurden konfluent gewachsene Zellen 24 h nach dem ausplattieren durch Kratzen mit einer Pipettenspitze "verwundet". Der entstandene, zellfreie Spalt hat eine Breite von circa 300 µm. Zelltrümmer wurden durch mehrmaliges Waschen mit vorgewärmten Medium entfernt. Die Zellen durften bis zu 72 h in den Spalt einwandern und die Wunde schließen. Bilder wurden bei 20 X Vergrößerung (Nicon Ph1 DL; N.A. 0.4) mit einem Nikon TMS Mikroskop aufgenommen, das mit einer Nikon F-601 Kamera ausgestattet war. Entfernungen zwischen den Wundrändern wurden an 5 Stellen/Bild ausgemessen (n=3). Alternativ wurden die verwundeten Monolayer bei 10 X Vergrößerung mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop, das mit einem AxioCam digital System ausgerüstet ist, für bis zu 6 h alle 20 min automatisch fotografiert, so dass ein Zeitraffer-Film entstand. Es wurde auf die Auswertung längerer Expositionen verzichtet, da der Objektisch weder beheizbar war, noch das Medium begast oder gegen frisches Medium ausgetauscht werden konnte, so dass die Zellen nach 3-6 h ihre Migration einstellten. Details der Filme sind im Ergebnisteil als Bildfolge abgebildet. Auf eine Einbeziehung der Filme in diese Arbeit wurde verzichtet, da sie keinen zusätzlichen Informationsgewinn darstellen. Die Lokalisation und die Phosphorylierung einzelner Proteine wurden wie im Kapitel "Indirekte Immunfluoreszenz" beschrieben dargestellt.

Durchflusszytometrie/FACS (*Fluorescence-Activated Cell Scanning*)

Bei der Durchflusszytometrie passieren vereinzelte Zellen nacheinander eine Messzelle, in der sie von einem Laser angestrahlt werden. Über die von der Zelle verursachte Streuung des Lichtes erhält man Auskünfte über die Größe sowie Granularität der Zelle. Die Zellen können außerdem mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt werden, so dass man weitere Informationen über Zellart und Zustand der Zelle erhalten kann. Das FACS-Gerät von BD Biosciences Immunocytometry Systems verfügt über einen Argon-Laser, der eine Anregungswellenlänge von 488 nm generiert. Es stehen drei verschiedene Emissionskanäle zur Verfügung, so dass bis zu drei verschiedene Fluorochrome eingesetzt werden können, wenn ihre Anregung im Bereich von 488 nm und ihre Emission in nicht überlappenden Bereichen liegt (z.B. Fluorescein-Isothiocyanat FITC und Tetramethylrhodamine-Isothiocyanat TRITC bzw. Phycoerythrin PE).

Für die FACS-Analyse werden pro Ansatz $1-5 \times 10^5$ Zellen eingesetzt. Die Zellen müssen in PBS/EDTA gut vereinzelt werden und werden dann in 100 µl PBS/1%FCS oder PBS/1% BSA aufgenommen. Alle folgenden Schritte erfolgen auf Eis/bei 4°C. Um die **spontane Apoptoserate** zu testen, wurden die Zellen 45 min mit FITC-gekoppeltem anti-Annexin V-Antikörper (Bender MedSystem, CA, USA) und 10 µg/ml Propidiumiodid (PI, interkaliert in Nukleinsäuren) inkubiert. Die Zellen wurden vor der Analyse 3x mit PBS/1%BSA gewaschen. Um die **Oberflächenexpression membranständiger Rezeptoren** zu testen, wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (10 µg/ml) für 1 h auf Eis inkubiert, 2x mit PBS/1%BSA gewaschen und anschließend mit dem sekundären Fluoreszenz-markierten Ziege-anti-Maus F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Europe, Cambridgeshire, UK) in PBS für 1 h auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden vor der Analyse 3x mit PBS/1%BSA gewaschen. Die Messung erfolgte am FACScan Instrument mittels des Lysis II-Programms (beides BD Biosciences, CA, USA). Grundsätzlich wurden Kontrollfärbungen mit unspezifischen Ig anstelle der Primärantikörper und dem sekundären Fluoreszenz-markierten Ziege anti-Maus F(ab')₂ durchgeführt, da die FACS-Analyse eine relative und keine absolute Methode ist. Diese Kontrollfärbungen dienen zur Feststellung der Hintergrundfluoreszenz und zum Einstellen des FACScan Instrument. Die Analyse der Daten erfolgte mit der CellQuest Software (BD Biosciences).

Indirekte Immunfluoreszenz (Epifluoreszenz und konfokale Aufnahmen)

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen kann durch die indirekte Immunfluoreszenz untersucht werden. Dazu werden Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine eingesetzt. Diese Antikörper werden dann von sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert und so sichtbar gemacht. Die Benutzung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Cy2 (grüne Emission), Rhodamin (rote Emission) und DAPI (blau fluoreszierender, in die DNA interkalierender Farbstoff) erlaubt eine Mehrfachfärbung. So können in konfokalen Aufnahmen mit dem LSM (Laser Scanning Microscope) auch Kollokalisierungen von Proteinen beobachtet werden.

Die Zellen wurden auf Zellkultur-behandelten 8-Well-Objektträgern kultiviert (Plastik, eine eventuelle Beschichtung ist unter der detaillierten Beschreibung der einzelnen Anwendung

aufgeführt). Die Zellen wurden entsprechend der Fragestellung (siehe z.B. Wundheilungs-Assays, Adhäsions-Assays) behandelt. Die Zellen wurden für 20 min bei Raumtemperatur (RT) in 4% PFA/PBS fixiert und 15 min mit 0.025% Saponin or 0.1% Triton X 100 permeabilisiert. Alternativ wurden die Zellen bei -20°C in Methanol fixiert und permeabilisiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei RT. Die Objektträger wurden für 1 h mit PBS/1% BSA blockiert, mit dem (den) entsprechenden primären Antikörper(n) ($10\ \mu\text{g/ml}$) für 2 h oder über Nacht inkubiert, mit PBS/1% BSA gewaschen und mit dem (den) entsprechenden CY2- oder RhodamineRed-X-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:100) für 1 h inkubiert. In einigen Fällen wurden die Zellen mit TRITC-Phalloidin ($1\ \text{ng/ml}$) für 1 h inkubiert. Um die Proliferationsrate im Monolayer-Wundheilungs-Assay zu bestimmen, wurden konfluente Zellen 24 h nach dem Setzen der Wunde für 1 h mit $10\ \mu\text{M}$ BrdU inkubiert, PFA-fixiert und für 2 h mit 1:10 verdünntem FastImmune anti-BrdU-FITC Antikörper/DNase (BD Biosciences) inkubiert (siehe auch Proliferations-Assays).

Die Objektträger wurden mit Elvanol eingedeckelt und über Nacht getrocknet. (Herstellung von Elvanol (70% PBS, 25% Glycerol, 5% Polyviol, 0,5% β -Mercaptoethanol, 1 mg/ml Phenylendiamin) : 3 g Polyviol in 40 ml PBS lösen und 16 h rühren lassen. 15 ml Glycerin zugeben und weitere 16 h rühren lassen. 15 min bei 12000 rpm (Sorvall) zentrifugieren, Überstand zur Weiterverwendung dekantieren. 1 mg Phenylendiamin/ml Gesamtvolumen zugeben und lichtgeschützt lösen. pH auf 8 einstellen, $250\ \mu\text{l}$ Mercaptoethanol zugeben und lösen. Ansatz aliquotieren und bei -20°C aufbewahren.)

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde bei 40-facher (Zeiss Plan-Neofluar; N.A. 0.90) bzw. 63-facher (Zeiss plan-Neofluar; N.A. 1.25) Vergrößerung mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop aufgenommen, welches mit dem 'AxioCam Digital System' (einer digitalen schwarz-weiß-Kamera) ausgerüstet war. In einigen Fällen wurden die Präparate bei 63-facher Vergrößerung (Zeiss Plan-Apochromat; N.A. 1.4) mit einem Konfokalen Mikroskop untersucht (Zeiss Axiovert 100 Mikroskop / Micro Systems LSM). Alle Bilder wurden zur weiteren Bearbeitung in Adobe Photoshop importiert.

Herstellung von Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine: Klonierung

Die Expression einer cDNA als GST(Glutathion-Thio-Transferase)-Fusionsprotein in *E. coli* ermöglicht eine einfache und schnelle Reinigung über Glutathion-Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) und die Detektion des Fusionsproteins durch einen anti-GST-Antikörper.

Klonierung des GST-Poldip2: Das murine Poldip2-Homolog wurde als RZPD-Klon käuflich erworben (IMAGp998F089456). Dieser Klon codiert das vollständige Maus-Poldip2. Die gesamte cDNA wurde über die Schnittstellen SmaI und NotI C-terminal hinter das GST-Gen des Vektors pGEX4T-3 kloniert. Der Verdau erfolgte sequentiell, da SmaI und NotI keine kompatiblen Puffer und keine kompatible Temperatur aufwiesen ($20\ \mu\text{g}$ DNA, 1X Y+-Puffer, 40U SmaI; 30°C für 90 Minuten, Isopropanol-Fällung; gefällte DNA, 1X O+-Puffer,

20U NotI, 37°C für 60 Minuten). Die verdaute DNA wurde über ein 1%-iges Agarose-Gel mit dem Qia-Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und in 50 µl ddH₂O aufgenommen. pGEX-4T-3 Vektor und Poldip2-cDNA wurden im Verhältnis 1:4 einer Ligation mit der T4-Ligase (hc) von Invitrogen unterzogen. Die Sequenz der MCS (multiple cloning site) des pGEX4T-3 Vektors sowie die Sequenz der Poldip2-cDNA sind im Anhang zu finden. Das Fusionsprotein hat eine erwartete Größe von 65 kDa (26 kDa GST-Fusionsanteil und 39 kDa Poldip2-Anteil)

Klonierung des GST-FLNa: Die aus dem Yeast-Two-Hybrid-Screen erhaltene cDNA des Ratten-Filamin A (Klon #73), welche für die Aminosäuren 2460-2647 codiert, wurde im richtigen Leserahmen C-terminal hinter das GST-Gen des Vektors pGEX4T-2 kloniert. Vektor und Insert wurden mit den Enzymen EcoRI und XhoI (in 2X Y⁺-Puffer) doppelverdaut, über ein Gel gereinigt und ligiert (siehe oben). Die Sequenz der MCS des pGEX4T-2 Vektors sowie die Sequenz der partiellen Filamin A-cDNA des Klones #73 sind im Anhang zu finden. Das Fusionsprotein hat eine erwartete Größe von 47 kDa (26 kDa GST-Fusionsanteil und 21 kDa Filamin A-Anteil)

GST-Fusionsproteine: Expression

Optimierte Expression der GST-Fusionsproteine: Sämtliche Überexpressionen wurden mit dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Dieser Stamm enthält ein Gen für die T7-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors. Das Plasmid pLys enthält zusätzlich ein konstitutiv schwach exprimiertes Gen für T7-Lysozym, welches die Hintergrundexpression durch Inhibition der T7-Polymerase verringert. Durch Zugabe des Galaktosids IPTG zum Medium wird die Expression der T7-Polymerase durch den lacUV5-Promotor induziert, die anschließend die Inserts in pGEX-4T-2 bzw. pGEX-4T-3 in Abhängigkeit des T7-Promotors transkribiert.

Da bei einer Expression nach dem Standardprotokoll beide Fusionsproteine als nicht lösliche so genannte Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) im Zellpellet verblieben, wurden zunächst die optimalen Expressionsbedingungen ausgetestet. Eine Expression bei verringerter Temperatur mit verstärktem Schütteln und kürzerer Induktionzeit ergab dann eine Verschiebung hin zu vorwiegend löslichen Fusionsproteinen. Die Verwendung von Detergenz im Lysepuffer, die Verwendung von nur 0,05 mM IPTG, oder die Induktion bei einer OD600 von 0,6 erhöhte die Ausbeute nicht. Protokoll einer optimierten Expression: LB-Amp mit Übernachtskultur ca. 1:50 bis OD600 = 0,05- 0,1 animpfen (bei großen Expressionen genug Übernachtskultur ansetzen!!!). Wenn neue Transformanten ausgetestet werden: von restlicher Übernachtskultur Glycerinstocks anlegen. Kolben mit großen Schikanen benutzen und maximal zur Hälfte füllen, Medium vorwärmen (über Nacht bei RT lagern). Zellen bei 26°C (RT) oder 37°C, 180 rpm wachsen lassen bis OD600 = 0,4 (hier auch 37°C möglich – schnelleres Wachstum, dann aber vor Induktion etwas runterkühlen). Induktion der Expression mit 0,5 mM IPTG (Endkonz.) (1 M Stock = 0,5 ml/l). 3 h bei 26°C (RT), 180 rpm, inkubieren. Bakterien abzentrifugieren (Schwingrotor 3000 rpm, 15 min). Pellets bei -20°C wegfrieren oder direkt aufarbeiten

GST-Fusionsproteine: Aufarbeitung der Zellpellets und Reinigung

Aufarbeitung: Um die Fusionsproteine für Versuche verwenden zu können, müssen die Bakterien lysiert werden und die Fusionsproteine über Glutathion-Sepharose aus dem Bakterienlysat gereinigt werden. Die Lyse der Bakterien-Pellets erfolgt mit der Frier-Tau-Methode, da ein Aufbrechen der Bakterien mit der French-Press, einem Hochdruck-Niedrigdruck-Verfahren, zu unlöslichen Proteinen führte. Standardisiertes Protokoll einer Lyse: Bakterienpellet (aus 50 ml Kultur) + 5 ml PBS^{GST}/1,5 mM PMSF/1:100 Proteinase Inhibitor Coctail (PIC, general use, Sigma) mit der Pipette homogenisieren. Wenn die Pellets eingefroren wird 1:5000 DNase (Invitrogen) dazugeben, 30 min inkubiert und evtl. mit einer Kanüle homogenisieren. 6 x dem Frier-Tau-Vortex-Zyklus unterziehen (flüssiger Stickstoff, 40°C Wasserbad). Den Ansatz in Eppis umfüllen und 10 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugieren. Den Überstand für die Reinigung verwenden (evtl. das Pellet aufbewahren, falls Protein mit unlöslichen Bestandteilen verknüpft ist). **Reinigung:** 1 ml Glutathion-Sepharose-Gelbett bindet ca. 11 mg Fusionsprotein, d.h. 0,3 ml Gelbett reichen großzügig für 500 ml Bakterienpellet. Vor der Anwendung den Alkohol aus der Sepharose waschen (2 x abfugen). Im Batch-Verfahren die Glutathion-Sepharose 60 min mit dem Überstand auf dem Drehspieß inkubieren oder den Überstand über die Glutathion-Sepharose-Säule geben (evtl. für Testzwecke den Durchlauf aufheben). Die Glutathion-Sepharose mit PBS^{GST} waschen, bis der Durchlauf im Bradford-Test negativ ist. Das Fusionsprotein mit Elutionspuffer von der Glutathion-Sepharose eluieren und die Proteinkonzentration bestimmen. Die Reinheit des Proteins im Silber-Gel und die Spezifität im Western-Blot bestimmen. **Benötigte Lösungen:** PBS^{GST}: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3. 100mM PMSF in Isopropanol. Elutionspuffer (immer frisch ansetzen!): 10 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8, + 0,03 g Glutathion (MM = 307,3).

His-Fusionsproteine

Die Klonierung, Expression und Reinigung der His-getagten zytoplasmatischen Domäne von Ratten-CEACAM1-L (CC1-zyto-His, Aminosäuren 447-519, ca. 13 kDa) wurde bereits beschrieben [Budt et al., 2002b]. Gereinigtes CC1-zyto-His sowie ein 11 kDa His-Kontrollprotein, welches aus einer Leserahmenverschiebung in der GNE-cDNA entstanden ist, und die His-getagte zytoplasmatische Domäne der α 3-Integrin Untereinheit stand bereits gereinigt zur Verfügung.

CEACAM-Fc-Fusionsproteine: Klonierung

Um lösliche, Fc-getagte Fusionsproteine von Ratten- und human-CEACAM1 herzustellen, wurden mittels PCR Teile der schweren Kette eines humanen IgG γ 3 sowie verschiedene CEACAM1 Fragmente amplifiziert, die für verschieden große Bereiche der extrazellulären Domäne kodieren. Alle PCR-Produkte wurden in den Klonierungs-Vektor pCR-Blunt zwischenkloniert und dann über entsprechende Schnittstellen in den eukaryotischen Expressions-Vektor pcDNA3.1+ kloniert. Die Fc-Region existiert wie im Ergebnisteil beschrieben in zwei Varianten, einmal mit (FcH) und einmal ohne die Hinge-Region (FcO). Beide Varianten wurden mit Primern amplifiziert, welche 5' eine EcoRI-

Schnittstelle und 3' eine XhoI-Schnittstelle eingefügt haben. Das erste Ratten-CEACAM1 Konstrukt umfasst die gesamte extrazelluläre Domäne von CEACAM1 aus der Ratte mit ihren vier Ig-ähnlichen Bereichen (raCC1-ExD) und die Fc-Region einer humanen IgG-gamma-Kette. Den anderen Konstrukte fehlen jeweils eine oder mehrere der Ig-ähnlichen Bereiche der extrazellulären Domäne von CEACAM1, sie besitzen aber alle die Fc-Region der humanen IgG-gamma-Kette (raCC1-N/A1/B; raCC1-N/A1; raCC1-N; raCC1-ΔN; siehe auch Anhang I). Alle CEACAM1-Fragmente, außer dem raCC1-ΔN-Fragment, wurden mit Primern amplifiziert, welche 5' eine HindIII-Schnittstelle und 3' eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt haben. Um das raCC1-ΔN-Konstrukt als sekretiertes Protein exprimieren zu können, musste das Signalpeptid des Ratten-CEACAM1 (raCC1-SP) amplifiziert und vor die A1/B/A2-Domänen kloniert werden. Es wurde die folgende Strategie verfolgt: Da der pcDNA3-Vektor über keine gut zu benutzenden Schnittstellen mehr verfügte (das benötigte zusätzliche Enzym durfte weder im pcDNA3-Vektor noch in der CEACAM1-cDNA oder in der Fc-cDNA schneiden), wurde ein Linker zwischen die EcoRI und die HindII-Schnittstelle eingefügt, der eine SdaI-Schnittstelle beinhaltet. Das raCC1-SP wurde mit Primern amplifiziert, welche 5' eine HindIII-Schnittstelle und 3' eine PstI-Schnittstelle eingefügt haben. raCC1-ΔN wurde mit Primern amplifiziert, welche 5' eine PstI-Schnittstelle und 3' eine EcoRI-Schnittstelle eingefügt haben. PstI schneidet weder in der CEACAM1-cDNA noch in der Fc-cDNA, allerdings im pcDNA3-Vektor. Aber die eingefügte SdaI-Schnittstelle hat kompatible Enden mit der PstI-Schnittstelle, so dass HindIII/PstI verdautes raCC1-SP und PstI/EcoRI verdautes raCC1-ΔN sequentiell in den mit dem SdaI-Linker-versehenen pcDNA3-Vektor kloniert werden konnten. Für das humane CEACAM1 wurden nur zwei Fragmente amplifiziert: huCC1-ExD, welches die gesamte extrazelluläre Domäne codiert und huCC1-ΔN. Wieder wurden Primer benutzt, die 5' eine HindIII-Schnittstelle und 3' eine EcoRI-Schnittstelle (huCC1-ExD), bzw. 5' eine PstI-Schnittstelle und 3' eine EcoRI-Schnittstelle (huCC1-ΔN) eingefügt haben. Das huCC1-ΔN-Fragment wurde hinter das Signalpeptid des Ratten-CEACAM1 kloniert. Zusätzlich wurden die extrazellulären Domänen des humanen CEACAM5, CEACAM6 und CEACAM8 als Fc-Fusionsproteine kloniert und exprimiert. Für das CEACAM5-Konstrukt wurde die extrazelluläre Domäne aus dem Expressions-Vektor [Stern et al., 2005] über die HindIII- und BamHI-Schnittstellen vor die FcO-cDNA in den pcDNA3.1+-Vektor kloniert. Um die extrazelluläre Domäne in den richtigen Leserahmen vor der FcO-cDNA zu bringen, wurde der Vektore dann mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI verdaut und die überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Der Vektor wurden dann ligiert, transformiert und die Klone auf das Fehlen der BamHI- und EcoRI-Schnittstellen getestet. Positive Klone wurden dann sequenziert. Da das Klenow-Fragment noch über eine erhebliche 5'-Exonucleaseaktivität verfügte, konnte für CEACAM5 nur ein Klon im richtigen Leserahmen gefunden werden, dem die ersten 15 Aminosäuren des FcO-Tags fehlten. Dieses Konstrukt ließ sich aber dennoch gut wie unten beschrieben exprimieren und reinigen. Für die CEACAM6- und CEACAM8-Konstrukte wurden die Vektoren pdKCR-NEO-CC6 und pdKCR-NEO-CC8 aus Methylierungs-defizienten *E. coli* (Stamm: GM2163) gereinigt mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BclI (Methylierungs-sensitiv) verdaut. Um eine Klonierung zu ermöglichen, wurde in die HindIII- und EcoRI-Schnittstelle des pcDNA3.1+-Vektors, der bereits die FcO-cDNA enthielt, ein Linker eingefügt. Dieser enthielt 5' einen HindII-Überhang und 3' einen EcoRI-Überhang. Diese EcoRI-Schnittstelle ist nach der Ligation durch einen Basentausch nicht mehr funktionell. Zwischen den Überhängen waren die Schnittstellen (von 5' nach 3') EcoRI, XhoI, BamHI (gleicher Überhang wie BclI; BclI schneidet 2 x im Vektor) und 7

Nukleotide der restlichen CEACAM6- und CEACAM8-Sequenz, welche nach Verdau der cDNA mit BclI fehlen, enthalten. Durch die Ligation des Linkers wurden gleichzeitig die in falscher Reihenfolge in der MCS des Vektors enthaltenen BamHI- und EcoRI-Schnittstellen entfernt bzw. zerstört. Der Linker-haltige Vektor wurde mit EcoRI und BamHI geschnitten und mit den BclI-/EcoRI-verdauten extrazellulären Domänen von CEACAM6 und CEACAM8 ligiert.

CEACAM-Fc-Fusionsproteine: Expression und Reinigung

Die Vektoren der verschiedenen Fc-Fusionsproteine wurden in HEK293-Zellen transfiziert und subkloniert. Die am besten exprimierenden Klone wurden mithilfe von ELISA-Screenings und darauf folgender Western-Blot-Analyse identifiziert. Für funktionelle Studien z.B. an Leukozyten sollten die Fusionsproteine ohne Antikörper-Kontamination vorliegen, da Leukozyten Fc-Rezeptoren besitzen, so dass ein Einfluss der Rinder-Antikörper nicht ausgeschlossen werden kann. Entgegen der Herstellerangaben binden sowohl der humane Fc-Teil der $\gamma 3$ -Kette wie auch Rinder-IgG an Protein-A- und Protein-G-Sepharose, so dass ein Ausschluss über die Säulenmatrix nicht in Frage kommt. Auch die Ausschlussgröße von 100 kD der Zentricons® ist nicht genau genug, Fusionsproteine und Rinder-IgG sind in gleichem Maße in Durchlauf und Überstand vorhanden. Um eine Kontamination der Fusionsproteine mit Rinder-Ig aus dem Serumanteil des Mediums zu vermeiden, wurden die Zellen daher in speziellen Zwei-Kammer-Flaschen (Integra CL 350; IBS Intergra Biosciences, Fernwald) und in serumfreien Medium gehalten. In die äußere Kammer wurde DMEM/2X L-Glutamin/0,6 g/l G418/1X Pen-Strep/1X Na-Pyruvat als Nährmedium gegeben. In der inneren Kammer wurden die Zellen mit PRO293-Medium (Biowhittaker)/1X L-Glutamin/1X Pen-Strep/1X Na-Pyruvat kultiviert. Die Zellkulturüberstände der inneren Kammer wurden gesammelt und die Fusionsproteine wurden daraus mittels Protein-G-Säulen gereinigt. Die Fusionsproteine lagen nach der optimierten Anzucht und Reinigung sehr sauber und in großen Mengen vor.

Protein-Biochemische Methoden

Herstellung von Zell- und Leberlysaten

Für Tyrosinphosphorylierungen wurden adhärente Zellen in **Phospho-Lysispuffer** (50 mM Tris pH 7.2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) mit Phosphatase-Inhibitoren (1 mM NaVO₃, 10 mM Na₄P₂O₆, 100 mM NaF), 1 mM PMSF und einem Protease-Inhibitor-Cocktail (AEBSF, E-64, betastatin, leupeptin, aprotinin, Sigma) geschabt. Ansonsten wurden die Zellen in **HBS** (10 mM Hepes, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1.7 mM KCl) mit 1% Triton X-100, 1mM PMSF und einem Protease-Inhibitor-Cocktail (AEBSF, E-64, betastatin, leupeptin, aprotinin, Sigma) geschabt (Anwendungen: Co-IP CEACAM1-Filamin A, RAI-Aktivierungs-Assay). Teilweise wurde 1 mg/ml DNaseI und 10 μ M Cytochalasin D zugegeben. Alternativ wurde ein **Tris-Lysepuffer** (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 13 mM Tris/HCl, pH 7,8 / 1,5 mM PMSF / Protease-Inhibitor-Cocktail) verwendet (Anwendungen: Co-IP CEACAM1-Filamin A,

Affinitäts-präzipitationen). Rattenleberlysate: Rattenleber wurde perfundiert, in PBS homogenisiert, bei 5,000 X g abzentrifugiert, mit 5 Volumen HBS vermischt und mit einem Glas-Gewebe-Homogenisator (Douncer) homogenisiert. Das Lysat wurde durch 60 min Zentrifugation bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge geklärt.

Herstellung von Natriumorthovanadat- und Pervanadat-Lösungen

Vanadate neigen in Lösung zur Bildung von oligomeren und polymeren Addukten. Durch wiederholte Zyklen von Erhitzen und Einstellen des pH-Wertes erhält man das monomere Orthovanadat. Eine 100 mM Na₃VO₄-Lösung wird auf pH 10 eingestellt. Die Lösung sollte gelb sein. Die Lösung wird bis zur Entfärbung aufgekocht und nach Abkühlen auf RT wird der pH-Wert erneut justiert. Der Zyklus wird dreimal wiederholt, anschließend wird die fertige Lösung in Aliquots bei -20 °C aufbewahrt. Zur Erzeugung von Pervanadat wird diese Stamm-lösung mit 30% H₂O₂ für 5 min bei RT oxidiert. Der Mix kann direkt zur Behandlung von Zellen eingesetzt werden (Endkonzentrationen von 100 µM Pervanadat), oder Solubilisations-puffern beigemischt werden (auch 1:1000).

Kern-Zytosol-Trennung

Bis zu 3×10^7 Zellen (15 cm-Schale) 2 x mit PBS waschen, mit 1 ml hypoosmolarem Puffer 1 (2 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, pH 7,2 mit 1 M KOH; optional direkt vor dem Versuch frisch dazugeben: 1 mM PMSF, 1 mM Vanadat, 0,1 mM Pervanadat, 1 mM DTT, 1:100 Proteinase-Inhibitor-Cocktail) abschaben und in ein Eppi überführen. Vorsichtig mit der Pipette homogenisieren. 20-60 min auf Eis inkubieren, 10 µl 10% NP40 in Puffer 1 dazugeben, 3-20 min auf Eis inkubieren und 2 min bei 1800 rpm in der Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugieren. Den Überstand in ein neues Eppi überführen (das Pellet aufbewahren!), bei 13.000 rpm 10 min zentrifugieren und nochmals in ein neues Eppi überführen. Dieser Überstand ist die zytosolische Fraktion, welche aber auch kleine Organellen wie z.B. die Mitochondrien enthält. Das Pellet, welches die Zellkerne und Membrantrümmer enthält 2 x mit Puffer 1 waschen, dann 1 ml hyperosmolaren Puffer 2 (420 mM NaCl, 2 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 25% Glycerin, 20 mM HEPES, pH 7,2 mit 1 M KOH; optional direkt vor dem Versuch frisch dazugeben: 1 mM PMSF, 1 mM Vanadat, 0,1 mM Pervanadat, 1 mM DTT, 1:100 Proteinase-Inhibitor-Cocktail) dazugeben und 20 min auf Eis inkubieren (dabei gelegentlich durch anschtippen des Eppis mischen). 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren. Der Überstand enthält die löslichen Kernproteine, das Pellet enthält unlösliche Chromatin- und Membranreste. Soll von der Kernfraktion eine Proteinbestimmung gemacht werden, so muss auf das Glycerin in Puffer 2 verzichtet werden (maximal 10% Glycerin für die Konzentrationsbestimmung mit der BCA- oder der Bradford-Methode). Teilweise wurde auch der Nuc-Buster-Kit (Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland) zur Trennung der zytosolischen Fraktion von der Kernfraktion benutzt. Der Kit funktioniert nach demselben Prinzip wie die oben beschriebene Trennung und wurde nach Herstellerangaben benutzt.

Affinitätspräzipitationen

Affinitätspräzipitationen: 10 µg Glutathion-Sepharose-gebundenes GST, GST-FLNa, oder GST-Poldip2 wurden eingesetzt, um 5 µg gereinigte zytoplasmatische Domäne des CEACAM1-L (CC1-zyto-His) oder 5 µg control-His zu präzipitieren. Die Ansätze wurden 2 h bei 4°C auf dem Drehspeiß inkubiert, 10 x mit PBS/1%Tx100/0,5%SDS gewaschen und in Probenpuffer aufgeköcht.

Außerdem wurden 10 µg Glutathion-Sepharose-gebundenes GST, GST-FLNa, oder GST-Poldip2 eingesetzt, um das gesamte CEACAM1-Protein aus RBE-Zellsolubilisat zu präzipitieren. Die Ansätze wurden 2 h bei 4°C auf dem Drehspeiß inkubiert, 2 x mit Lysepuffer gewaschen und in Probenpuffer aufgeköcht.

Immunpräzipitationen

Für Immunpräzipitationen wurden Lysate mit angeglichenen Proteinmengen mit 3 bis 5 µg des entsprechenden Antikörpers oder Ig-Kontrollen und 20-30 µl Protein-G-Sepharose für 2-8 h bei 4°C auf dem Drehspeiß inkubiert. Das Pellet wurde 2-4 x mit dem entsprechenden Lysepuffer gewaschen und geblottet.

RalA-Aktivierungs-Assay und Affinitätspräzipitationen von Filamin A

Um die Aktivierung von RalA zu bestimmen, wurden Affinitätspräzipitationen mit der Ral-Bindedomäne des Ral-Bindeproteins-1 durchgeführt. Die Ral-Bindedomäne (RalBD) bindet spezifisch an die GTP-gebundene Form des RalA und des RalB und lag als GST-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose gekoppelt vor (Upstate, NY, USA). Es wurden Lysate von nach Wusch behandelten Zellen (siehe Abschnitt Lysate) mit 50 µl Glutathion-Sepharose für 15 min vorinkubiert und der Überstand 1 h mit 10 µg RalBD-Fusionsprotein inkubiert. Die Präzipitate wurden 2 x mit Lysepuffer gewaschen, geblottet und mit RalA-spezifischem Antikörper entwickelt, so dass der Anteil an GTP-gebundenem RalA bestimmt werden konnte. Um einen Vergleich zum Gesamt-RalA zu ermöglichen, wurden auch Aliquots der eingesetzten Lysate geblottet und die RalA-Menge (GTP+GDP) quantifiziert. Dies war möglich, da der eingesetzte RalA-spezifische Antikörper nicht zwischen GTP- und GDP-gebundener Form diskriminiert. Für die Berechnung der Durchschnittswerte und der Standardabweichungen wurden 3 unabhängige Ansätze verwendet.

Die Blots wurden auch mit FLMN01, einem monoklonalen anti.Filamin A-Antikörper, entwickelt. Wieder erfolgte eine Quantifizierung des kopräzipitierten Filamin A und des gesamt-Filamin A. Für die Berechnung der Durchschnittswerte und der Standardabweichungen wurden 3 unabhängige Ansätze verwendet.

Isopyknische diskontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation zur Isolierung von Membranmikrodomänen

Membran-Microdomänen werden auch als *Lipid-Rafts* ("Lipid-Flöße") bezeichnet und stellen kleine Unterbereiche der Zellmembran dar, welche sich durch die erhöhte Konzentration von Cholesterol und Glykosphingolipiden auszeichnen. Proteine, die in Detergenz-resistenten Membranfraktionen gefunden werden, gelten als Microdomänen-assoziiert. Eine Möglichkeit diese Microdomänen und ihre assoziierten Proteine darzustellen, sind Sucrose-Gradienten mit abnehmender Dichte. Die mit 1 ml Detergenz-haltigem Lysepuffer (hier: 1% CHAPS in HBS; HBS: 10 mM Hepes, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 1.7 mM KCl, 1mM PMSF und Protease-Inhibitor-Cocktail) hergestellten Zellysate werden mit 90%iger Sucrose auf 45% Sucrose eingestellt und unten in ein Ultrazentrifugenröhrchen gegeben. Darauf wird je 1 ml 35%, 20% und 5% Sucrose in HBS geschichtet und anschließend wird der Ansatz für 16 h bei 40.000 rpm in der Ultrazentrifuge beschleunigt. Während der Ultrazentrifugation schwimmen die leichteren Detergenz-resistenten Membranfraktionen und assoziierte Proteine in die gering konzentrierten bzw. "weniger Dichten" (*low density*) Bereiche des Sucrose-Gradienten hinauf, während alle schwereren, nicht Microdomänen-assoziierten Proteine in der unteren Hälfte des Gradienten verbleiben. Die Fraktionen werden in Volumen zu je 0,5 ml von oben nach unten gesammelt, mit Probenpuffer aufgekocht und geblottet. Alternativ können die Fraktionen z.B. für Koimmunpräzipitationen oder Phosphorylierungsstudien weiterverwendet werden.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

BCA-Methode: (Smith et al. 1985): Es wurde der BCA-Test-Kit der Firma Pierce verwendet. Der Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B (4% CuSO₄·5H₂O). Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu²⁺ zu Cu⁺. Die Bichinonin-4-carbonsäure (BCA) reagiert mit Cu⁺, wobei zwei Bichinoninsäure-Moleküle einen intensiv purpur-gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu⁺-Ion eingehen. Die Proben werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 200 µl der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wird, versetzt. Nach Inkubation für ca. 45 min bei RT wird die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Aus BSA-Proben bekannter Konzentrationen kann eine Eichreihe erstellt werden, anhand derer die Konzentration der unbekannt Probe bestimmt werden kann.

Bradford-Methode: (Bradford, 1976): Bei Lösungen ohne Detergenz wurde die Proteinbestimmung auch nach der Methode von Bradford durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliant-Blue G 250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn es in saurer Lösung an Proteine (hauptsächlich über Arginin-Reste) bindet. Diese Bestimmung ist schnell durchführbar. 100 µl einer Proteinprobe werden mit 900 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Lösung wird innerhalb von 15 min photometrisch bei 595 nm gemessen. Zur Proteinbestimmung dient auch hier eine Proteineichreihe, die mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt wird. Bradford-Reagenzlösung: 100 mg Coomassie-Brilliant-Blue, 50 ml Ethanol, 100 ml H₃PO₄ konz., ad 1 l ddH₂O; Lösung vor Gebrauch filtrieren.

SDS-PAGE nach Laemmli

Für die vertikale Elektrophorese von Proteinen wurde das Mini-Protean-System II der Firma Biorad verwendet. Es wurden diskontinuierliche Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel verwendet. Es wurde zunächst das Trenngel gegossen und nach der Polymerisation desselben das Sammelgel darauf gegossen. Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Protein-haltigen Proben werden im Verhältnis 5:1 mit 5X Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel bei konstanter Spannung von 100 V und zur Auftrennung im Trenngel bei konstanter Spannung von 200 V.

Lösung A: 30% Acrylamid (w/v), 0,8% N,N'-Methylenbisacryl-amid (w/v). **Lösung B:** 0,2% SDS (w/v), 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8. **Lösung C:** 0,2% SDS (w/v), 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8. **Trenngellösung:** (X%ig): X/30*9 ml Lösung A; 2,25 ml Lösung B; 9-(LsgA+LsgB) ml ddH₂O; 45 µl APS (10%); 4,5 µl TEMED. 4%ige **Sammelgellösung:** 0,4 ml Lösung A; 0,75 ml Lösung C; 1,85 ml ddH₂O; 12 µl APS (10%); 3 µl TEMED. **10X Lauffpuffer:** 0,25 M Tris, pH 8,8 (kein HCl! pH stellt sich ein!), 1,92 M Glycin, 1% SDS (w/v). **1X Lauffpuffer:** 1 Vol 10X Lauffpuffer, 1Vol EtOH, 8Vol ddH₂O. **5x Probenpuffer (reduzierend):** 12,5% SDS (w/v); 0,3 M Tris-HCl, pH 6,8; 50% Glycerin (v/v); 0,015% Bromphenolblau (w/v), 50 mM Dithiothreitol (DTT).

Tricin-SDS-PAGE

Mit Hilfe des Tris-Tricin-Systems können Proteine in einem Molekularbereich von 1-100 kDa in einem Gellauf analysiert werden. Durch das Glycerin im Trenngelpuffer ist es möglich, das Sammelgel sofort nach dem Einfüllen des Trenngels einzufüllen und beide Gele zusammen polymerisieren zu lassen. Die Trennung erfolgt während des Einlaufens der Proben ins Sammelgel bei 60 V und im Trenngel bei maximal 120 V.

Lösungen für Tricin-Gelsysteme. **Anodenpuffer:** 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9. **Kathodenpuffer:** 0,1 M Tricin; 0,1% SDS; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3 (pH stellt sich von alleine ein). **Gelpuffer:** 0,3% SDS; 3 M Tris-HCl, pH 8,45. **Acrylamidstammlösung:** 30% Acrylamid (w/v), 0,8% N,N'-Methylenbisacryl-amid (w/v). Ansatz für 4 Minigele: **Trenngel:** 3,1 ml Acrylamidstammlösung; 5 ml Gelpuffer; 1,5 ml Glycerin; ad 15 ml ddH₂O; 75 µl APS (10%); 7,5 µl TEMED. **Sammelgel:** 1 ml Acrylamidstammlösung; 3,1 ml Gelpuffer; ad 12,5 ml ddH₂O; 100 µl APS (10%); 10 µl TEMED.

Färbung von Protein-Gelen

Silberfärbung. Bei der Silberfärbung bilden Ag-Ionen Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Die Ag⁺-Komplexe werden durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert. Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von geringen Proteinmengen: die untere Grenze liegt bei 5 ng pro Bande. Allerdings ist die Silberfärbung nicht quantifizierbar und es werden außer Proteinen auch Nucleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide angefärbt. Bei der Silberfärbung treten für verschiedene Proteine

extrem starke Unterschiede in der Signalintensität auf, so dass die Intensität der Färbung kaum einen Rückschluss auf die tatsächlich vorhandene Proteinmenge zulässt. Die Färbung erfolgt nach einer Abwandlung der Methode von Heukeshoven und Dernick (1988). Das Gel wird mindestens 20 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend 3x für 5 min in Ethanol/H₂O (1:2) gewaschen. Das Gel wird 1 min in der Thiosulfatlösung inkubiert, 3x für 20 s mit ddH₂O gewaschen und für 20 min in Silbernitratlösung inkubiert. Es wird 2x für 20 s mit ddH₂O gewaschen und in der Entwicklerlösung so lange inkubiert, bis die gewünschte Färbintensität erreicht ist. Anschließend wird das Gel nochmals mit ddH₂O gewaschen und kann in diesem auch gelagert werden. **Fixierer:** 50 % Methanol, 12 % Essigsäure. **Thiosulfatlösung:** 0,02 % Natriumthiosulfat. **Silbernitratlösung:** 0,08 g AgNO₃, 0,02 % Formaldehyd, ad 50 ml mit ddH₂O. **Entwickler:** 3 % Natriumcarbonat, 0,05 % Formaldehyd, 0,0005 % Natriumthiosulfat.

Färbung mit Coomassie-Blau. Proteine lassen sich im Gel mit Coomassie-Blau G250 färben. Die Empfindlichkeit der Färbung ist nur mäßig: die untere Detektionsgröße liegt bei 200-400 ng pro Bande. Unterschiede bei der Anfärbbarkeit verschiedener Proteine treten wie für die Silberfärbung weiter unten beschrieben zwar auch bei der Färbung mit Coomassie Blau auf, sie sind jedoch weit weniger häufig und ausgeprägt. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 30 min in der Färbelösung und anschließend für 2-3 h in der Entfärbelösung geschwenkt. Die Entfärbelösung wird während der Inkubation mehrmals erneuert. **Färbelösung:** 40% EtOH, 10% Acetat, 1‰ Serva Brilliant Blue G-250 (w/v). **Entfärbelösung:** 5% EtOH, 7,5% Acetat.

Western-Blot

Es wurde nach dem Semi-Dry-Verfahren in Blotapparaturen der Firma Biorad geblottet. Direkt nach der Elektrophorese wird der Sandwich-Blot luftblasenfrei unter Blotpuffer zusammengebaut, so dass die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigt (Whatman-Papier/Nitrozellulose/Gel/Whatman-Papier). Der Transfer wird bei 4°C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 60 min in Blotpuffer durchgeführt. Blotpuffer: 150 mM Glycin, 20 mM Tris-HCl, pH 8,3. 10% EtOH. Die Kontrolle des Transfers erfolgt durch Färbung der Proteine auf der Membran mit dem Farbstoff Ponceau-Rot. Nach ca. 1-minütiger Färbung in Ponceaulösung (5X Stock: 2% Ponceau-Rot (w/v) 30% TCA (v/v), 30% Sulfosalicylsäure (w/v); 1X Lösung wiederverwendbar) wird mit 1%iger Essiglösung oder ddH₂O wieder entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards werden markiert, dann wird die Membran in PBS (140 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,8) wieder komplett entfärbt.

Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran

Die Nitrozellulosemembran wurde in 10% Magermilchpulver in PBS (140 mM NaCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM NaH₂PO₄, pH 7,8) für mindestens 1 h bei RT oder bei 4°C über Nacht blockiert. Alle anschließenden Inkubations- und Waschschrte werden in PBS bzw. PBS-T (PBS/0,1% Tween 20), pH 7,8 durchgeführt. Sollte eine Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden, wurde die Blockierung in 5% BSA in TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,8;

150 mM NaCl) durchgeführt und alle anschließenden Inkubations- und Waschschrte in TBS bzw. TBS-T (TBS/0,1% Tween 20), pH 7,8. Die Membran wird mit dem ersten Antikörper in PBS-T (TBS-T) mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wird 3 x 2 min mit PBS-T (TBS-T) gewaschen und mit dem zweiten Antikörper, z.B. einem mit Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Antikörper, in PBS-T (TBS-T) für 1 h bei RT inkubiert. Nach gründlichem Waschen (mindestens 3x 5 Minuten) in PBS-T (TBS-T) wird das Tween 20 durch 2 x Waschen in PBS (TBS) entfernt, da es die Entwicklung stört. Der Blot wird mit der HRPO(Peroxidase)/ECL-Methode entwickelt. Die Membran wird zwischen Plastikfolien gelegt, evtl. der Standard mit Leuchtknete (Spielwarengeschäft) markiert und mit einer Mischung aus 10 µl Lösung A, 1 ml Lösung B und 3 µl Lösung C betropft. Die Chemilumineszenz wurde mit dem digitalen Fujifilm LAS-1000 Imaging-System über eine CCD-Kamera erfasst und quantifiziert. Die Aufnahmen wurden zur weiteren Bearbeitung in Adobe Photoshop importiert. Bei schwachen Blotsignalen wird ein Röntgenfilm (BioMax Film, Kodak) für 5 s bis 30 min belichtet und anschließend in Entwickler- und Fixierlösung (KodakGBX Entwickler- und Fixierkonzentrat, 1:5 zu verdünnen) entwickelt. Lösungen für die Chemilumineszenz: Lösung A: 6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO. Lösung B: 1,25 mM Luminol in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5. Lösung C: 3% H₂O₂ (täglich frisch ansetzen).

ELISA (Enzyme Linked Immuno Adsorbent Assay)

Der ELISA wurde zum Testen der Expression von löslichen Fusionsproteinen verwendet. Die 96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit je 100 ng polyklonalem anti-human-Fc-F(ab)₂ in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Die unspezifischen Bindungen wurden mit 1% BSA in PBS für 4 h bei RT abgesättigt. Die so vorbehandelte Mikrotiterplatte wurde für mindestens 2 h bei RT mit den Zellkulturüberständen der verschiedenen Klone inkubiert, 3x mit PBS gewaschen und mit einem den CEACAM1-Anteil erkennenden Antikörper inkubiert (Be9.2 oder polyklonaler anti-Ratten-CEACAM1 für Ratten-CEACAM1 bzw. 4/3/17, 18/20 oder polyklonaler anti-human-CEA-Antikörper für humanes CEACAM1). Die Platte wurde 2x mit PBS gewaschen und für 2 h bei 37°C mit dem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (1:1000 in PBS) inkubiert. Die Entwicklung erfolgt mit dem Substratpuffer (1 mg/ml ABTS, 0,05 M NaH₂PO₄, 0,03% H₂O₂, pH 4,2 mit CH₃COOH einstellen; ABTS: 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6) diammonium salt crystals). Nach 10-30 min wird die Farbentwicklung im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen.

SPR (Surface Plasmon Resonance)-Analyse (BIAcore)

Dieses Verfahren erlaubt eine Bestimmung von biomolekularen Interaktionen, wie z.B. zwischen der zytoplasmatischen Domäne von CEACAM1-L und Filamin oder Poldip2. Gemessen wird die Änderung des Totalreflektionswinkels eines polarisierten Lichtstrahls einer bestimmten Wellenlänge an der Grenze zwischen Glas und einer dünnen Goldfolie, auf deren Rückseite ein zu testendes Protein (bzw. ein Kontrollprotein) fixiert ist. Trotz der totalen Lichtreflektion durchdringt das elektrische Feld der Photonen die Goldschicht. Dabei regt es die Oberflächenelektronen auf der Rückseite der Goldfolie zur Bildung von

Elektronendichte-Wellen oder Oberflächen-Plasmonen an. Deren Resonanz mit den Photonen wirkt sich auf den Reflektionswinkel des Lichtstrahls aus. Die Plasmonen erzeugen zudem ein weit in das Medium hinausreichendes evaneszentes Feld, das bis in die immobilisierten Proteine hineinreicht. Über dieses Feld beeinflussen auch weitere an die immobilisierten Proben gebundene Proteine die Resonanzbedingung der Photon-Plasmon-Wechselwirkung. Mit der Bildung eines Protein-Protein-Komplexes am immobilisierten Protein ändert sich also der Totalreflektionswinkel des auf der anderen Folienseite direkt gegenüber gespiegelten Lichtstrahls. Verfolgt man außerdem den zeitlichen Verlauf dieser Änderung, so erhält man kinetische Informationen über den Bindungsvorgang. Das Verfahren hat zahlreiche Vorteile: So brauchen beide Interaktionspartner nicht markiert werden, die benötigten Mengen sind vergleichsweise gering, die Empfindlichkeit ist sehr hoch und die Daten sind gut reproduzierbar.

Die His-getagten zytoplasmatischen Domänen vom Ratten-CEACAM1-L (CC1-zyto-His) und von der $\alpha 3$ -Integrin Untereinheit ($\alpha 3$ -zyto-His, Hintergrundkontrolle) wurden auf einem CM5 Sensorchip (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) mit dem Amine Coupling Kit (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) immobilisiert. Die Kopplungs-Reaktionen wurden bei einer Flussrate von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durchgeführt. Die Oberfläche des Sensorchips wurde mit 35 μl 100 mM N-ethyl-N'-(Dimethylaminopropyl) Carbodiimid Hydrochlorid/400 mM N-hydroxysuccinimide aktiviert. Zur Immobilisierung wurden 40 μl CC1-zyto-His und 80 μl $\alpha 3$ -zyto-His (je 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Na-Acetat, pH 2,7) injiziert. Anschließend wurde der Sensorchip mit 35 μl 1M Ethanolamin Hydrochlorid (pH 8.5) deaktiviert und mit 10 μl 15 mM HCl gespült. Die Analyse der biomolekularen Interaktionen fand in HBS Puffer (150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 3.4 mM EDTA, 10 mM HEPES, pH 7.4) bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ in einer BIAcore® 2000 Aparatur (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) statt. Zwischen den Injektionen der verschiedenen Proben wurde die Oberfläche mit 5 μl 15 mM HCl regeneriert.

Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser-Desorption-Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*)

Die Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie eignet sich für Proteine, die N-terminal blockiert sind oder nur in geringen Mengen vorliegen. Mit MALDI-TOF können Peptide noch im unteren picomol-Bereich analysiert werden. Die zu untersuchenden Proteine werden nach gelelektrophoretischer Trennung im Gel durch spezifische Proteasen in kleine Peptide gespalten. Die Fragmente werden eluiert, in eine Matrix eingebettet, mittels eines Laserstrahls aus der Matrix herausgelöst und ionisiert. Über die Flugzeit der ionisierten Peptide können die Massen bestimmt werden. Anhand der charakteristischen Fragmentlängen, die nach Spaltung eines jeden Proteins entstehen, können Proteine identifiziert werden, sofern sie bereits bekannt sind und ihre vollständige Sequenz ermittelt ist.

Tryptischer Verdau von Proteinen in Polyacrylamidgelen: Alle Lösungen werden in H_2O mit HPLC-Reinheitsgrad (H_2O aus der Milli-Q® Wasserfilteranlage Millipore, Schwalbach) angesetzt. Nach dem Färben mit Coomassie-Blau und Entfärben wird das Gel 2 x in H_2O gewässert, dann werden die betreffenden Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Würfel von etwa 1 mm^3 zerteilt und in 0,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben werden

2x kurz in H₂O (HPLC-Reinheitsgrad) inkubiert, anschließend wird das Wasser abgenommen und durch 25 mM NH₄HCO₃ ersetzt (ca. 4 Gelvolumen). Gelstücke mit frisch angesetztem 10 mM DTT/0,1 M NH₄HCO₃ überschichten und 30 min bei 56°C inkubieren, um die Proteine zu reduzieren. Die Flüssigkeit mit Acetonitril ersetzen, warten bis die Gelstücke geschrumpft sind und diese in einer Speedvacc trocknen. Sollten die Gelstücke noch blau sein, diese in 100-150 µl 0,1 M NH₄HCO₃ rehydrieren, 15 min inkubieren und 1 Volumen Acetonitril zugeben. den Ansatz 15 min unter Schütteln inkubieren und die Flüssigkeit durch 20 µl 100% Acetonitril ersetzen. Wenn die Gelstücke geschrumpft sind, diese in einer Speedvacc trocknen. Diese Schritte bei Bedarf wiederholen. Tryptische Spaltung: Die Gelstücke werden zunächst für 30 min auf Eis in 10 µl Trypsinlösung (12,5 µg/ml bovines Trypsin, Sequenzierungs-Reinheitsgrad, in 50 mM NH₄HCO₃) rehydratisiert. Sollte die Lösung komplett aufgesaugt werden, etwas Lösung nachlegen. Überschüssige Flüssigkeit wird nach Ende der Inkubationszeit entfernt und durch genau so viel 50 mM NH₄HCO₃ ersetzt, dass die Gelstücke gerade mit Puffer bedeckt sind (ca. 10µl). Der Verdau wird über Nacht unter mildem Schütteln bei 37°C durchgeführt.

Entsalzung des Verdaus über Zip-Tips (Zip-Tip-C18 Pipettenspitzen mit Filtereinsatz; Millipore, Schwalbach). Dazu zum Verdau 0,25 Volumen 2,5% TFA in H₂O geben. Zip-Tip 3 x durch langsames pipettieren mit 10 µl 50% Acetonitril/0,1% TFA in H₂O äquilibrieren und 3 x durch langsames pipettieren mit 10 µl 0,1% TFA spülen. Die angesäuerte Probe 10 x LANGSAM mit der Zip-Tip aufziehen/ablassen und den Zip-Tip mindestens 5 x durch langsames pipettieren mit 10 µl 0,1% TFA waschen. Die Peptide mit 10 µl Matrixüberstand eluieren und in ein frisches Röhrchen geben (Matrixüberstand: eine Spatelpitze α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (ACCA, α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) in 250 µl 50% Acetonitril/0,1% TFA/H₂O geben, um eine übersättigte Lösung zu erhalten. Eppi abzentrifugieren und den Überstand verwenden. Sofort einen Tropfen des Eluates (1-4 µl) auf den Probensteller geben und bei Raumtemperatur trocknen lassen.

Die **MALDI-TOF-MS-Analysen** wurden von Christoph Kannicht (Octapharma, Berlin) mit einem Bruker-Biflex Reflex Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) im Reflektor-Modus durchgeführt. Die Ionisierung wurde mit einem 337 nm-Strahl eines Nitrogen-Lasers erzeugt. Die Peptidmassen wurden nach Kalibrierung mit dem Adrenocorticotropen Hormonfragment 18–39 (adrenocorticotropic hormone fragment 18–39) und Angiotensin II (beide Sigma, Deisenhofen) bestimmt. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mithilfe der über das Internet nutzbaren Suchmaschine Mascot [Perkins et al., 1999]. Für die Suche wurden bis zu 2 Fehlschnittstellen und eine Abweichung der Massen von $\pm 0,1$ Da bzw. ± 50 ppm erlaubt. Es wurden keine Modifikationen angegeben. Es wurde ohne Einschränkung auf Spezies in der nicht redundanten (nr) NCBI-nr-Datenbank gesucht.