
5. Material

5.1. Zelllinien und Nährmedien:

HEK293-Zellen, humane Nieren-Zelllinie, ATCC-Nummer: CRL-1573 (ATCC, Rockville, USA)

Nährmedium: „Dulbecco's minimal essential medium“
10% fetales Kälberserum (FCS)
20 mM Glutamin
1 x Nicht-essentielle Aminosäuren

SH-SY5Y-Zellen, humane Neuroblastoma-Zelllinie, ATCC-Nummer: CRL-2266 (ATCC, Rockville, USA)

Nährmedium: 50% „Dulbecco's minimal essential medium“
50% HAM's F12
10% FCS
20 mM Glutamin
20 mM Natriumpyruvat
1 x Nicht-essentielle Aminosäuren

Selektionsmedium: plus 250 µg/ml Hygromycin

Alle Medien, Zusätze, Waschpuffer (PBS) und Trypsin-Lösungen für die Zellkultur wurden von den Firmen PAA, USA oder Biochrom, Berlin bezogen. Es wurden Zellkulturschalen von der Firma TPP, Schweiz verwendet.

5.2. Bakterienstämme

DH5 α (Invitrogen, Karlsruhe)

Nährmedium: LB-Medium

Top10 (Invitrogen, Karlsruhe)

Nährmedium: LB-Medium

CH3-Blue (Bioline, Mannheim)

Nährmedium: LB-Medium

FHK12, (Bedouelle and Duplay, 1988)

Nährmedium: 10 g Hefe-Extrakt, 16 g Bakto-Trypton, 5 g NaCl, auf 800 ml H₂O plus 2% Glukose und 0,05%–0,2% L-Arabinose

PD28, (Kolmar et al., 1994)

Nährmedium: M9-Minimalmedium: 1 x M9-Salze, 0,4% Maltose, 80 µg/ml Leucin, 80 µg/ml Threonin, 2 mM MgSO₄

M9-Salze: 12,8 g Na₂HPO₄ x 7H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g NaCl, 1 g NH₄Cl auf 200 ml H₂O

5.3. Plasmid-Vektoren

5.3.1. Klonierungsvektoren

pBluescript II KS (+) (Stratagene, La Jolla, USA) Ampicillin-Resistenz

5.3.2. Vektoren zur Proteinexpression in eukaryotischen Zellen

pCEP4 (Invitrogen, Karlsruhe) Amicillin- und Hygromycin-Resistenz

pcDNA3.1-YFP (Invitrogen, Karlsruhe) modifiziert von AG Prof. Michael Schaefer
Institut für Pharmakologie, Charité Berlin

pcDNA3.1-CFP (Invitrogen, Karlsruhe) modifiziert von AG Prof. Michael Schaefer,
Institut für Pharmakologie, Charité Berlin

5.3.3. Vektoren zur Proteinexpression in bakteriellen Zellen

pToxRV, (Gurezka and Langosch, 2001), Kanamycin-Resistenz

5.4. Primer

Tabelle 1: Auflistung der für Klonierungen verwendeten Primer (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) mit Angabe der Primerbezeichnung und der Nukleotidsequenz.

Primer	Sequenz (5'-3')
Flag-R	GCTGTGGCGGGGTCTACTTGTTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTTCTGCAT CTGCTCAAAG
EcoRI-F	AAGATGGATGCAGAATTCGACATGAC
KpnI-F	CTAGAAGCTGGGTACCGGGGAGACGG
EBV-R	GTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATG
APP-2061	CCTCCTCGGCCTCGTCACGTGTTCAATATGC
G25A-F	GTTGATGTGGCTTCAAACAAAGG
G29A-F	TTCAACAAAGCTGCAATCATTGG
G33A-F	GCAATCATTGCACTCATGGTGG
G33I-F	GTTCAAACAAAGGTGCAATCATTATACTCATGGTGGCGGTGTTGTCATAGC
I31V-F	CAAAGGTGCAGTCATTGGACTCATGG
I31V-R	CCATGAGTCCAATGACTGCACCTTTG
I32V-F	AAGGTGCAATCGTTGGACTCATGGTGG
I32V-R	CCACCATGAGTCCAACGATTGCACCTT
L34A-F	GCAATCATTGGAGCCATGGTGGGCG
L34A-R	CGCCCACCATGGCTCCAATGATTGC
L17C-F	CATCATCAAAAATGCGTGTTCTTTGCAG
L17C-R	CTGCAAAGAACACGCATTTTTGATGATG

G33I-F	GCAATCATTATACTCATGGTGGGCGG
G33I-R	CCGCCACCATGAGTATAATGATTGC
Tox_I31V_F	GCTAGCGGTGCAGTCATTGGACTCATGG
Tox_I31V_R	CCATGAGTCCAATGACTGCACCGCTAGC
Tox_I32V_F	GCGGTGCAATCGTTGGACTCATGGTGG
Tox_I32V_R	CCACCATGAGTCCAACGATTGCACCGC
FRET-NotI-F	TTATATATATATTGCGGCCGCGGACGCGGCGGATCCCCTCG
FRET-XbaI-R	GCCCTTGCTCACCTCTAGAACGTTCTGCATCTGCTCAAAGAAC

5.5. Erzeugte Konstrukte

Tabelle 2: Auflistung der erzeugten Konstrukte mit Angabe des Vektors, des eingefügten Fragments und der Mutation. wt: Wildtyp.

Vektor	Insert	Mutation
pToxRV	A β 25-42	wt
pToxRV	A β 29-42	wt, G29A, I31V, I32V, G33A, G29/33A, G33I, L34A, G37A, G38A
pToxRV	A β 29-52	wt
pToxRV	A β 39-52	wt
pToxRV	A β 1-14	wt
pToxRV	PS-1-TMS6	wt
pToxRV	PS-1-TMS6	wt
pToxRV	GpA	wt, G83A
pcDNA3.1-YFP	APP695	wt, G33A, G29/33A, G33I
pcDNA3.1-CFP	APP695	wt, G33A, G29/33A, G33I
pcDNA3.1-YFP	SPA4CT	wt, G33A, G29/33A, G33I
pcDNA3.1-CFP	SPA4CT	wt, G33A, G29/33A, G33I
pCEP4	APP695-N-Myc-C-Flag	wt, L17C, G25A, G29A, I31V, I32V, G33A, L34A, G29/33A, G33I
pCEP4	SPA4CT-C-Flag	wt, L17C, G25A, G29A, G33A, G29/33A, G33I, L17C/G33I
pCEP4	APP695sw-N-Myc-C-Flag	wt, G33A, G29/33A, G33I
pCEP4	APP695arc-N-Myc-C-Flag	wt, G33A, G29/33A, G33I

5.6. Antiseren und Antikörper

Folgende Abkürzungen bedeuten WB: Western Blot; IP: Immunpräzipitation; IF: Immunfluoreszenz;

- W0-2: monoklonaler Maus-Antikörper (The Genetics Company (TGC)); Epitop A β 5–8, humanspezifisch, (Ida et al., 1996)
WB: 0,03 μ g/ml IP: 0,5 μ g/ml
- 22C11: monoklonaler Maus-Antikörper; Epitop: APP 66–81, (Hilbich et al., 1993)
WB: 1:10000
- G2-10: monoklonaler Maus-Antikörper (TGC); Epitop: C-Terminus von A β 40
ELISA nach Angaben TGC
- G2-13: monoklonaler Maus-Antikörper (TGC); Epitop: C-Terminus von A β 42
ELISA nach Angaben TGC IP: 0,5 μ g/ml
- BAP-29: monoklonaler Maus-Antikörper (M. Brockhaus, Roche); Epitop: C-Terminus von A β 38
ELISA: 8 μ g/ml
- Anti-Flag-„tag“: monoklonaler Maus-Antikörper (Sigma-Aldrich); Epitop: DYKDDDDK
WB: 0,25 μ g/ml IF: 0,5 μ g/ml
- Anti-Myc-„tag“: monoklonaler Maus-Antikörper (Cell Signaling, USA); Epitop EQKLISEEDL
ELISA: 1:2000
- 40090: polyklonaler Kaninchen-Antikörper; wurde hergestellt durch Immunisierung mit in Hefe rekombinant exprimierter APP-Ektodomäne APP 18–350 (Schmechel et al., 2004)
IF: 1:100
- 27576: polyklonaler Kaninchen-Antikörper; hergestellt durch Immunisierung mit synthetischem Peptid, Sequenz APP 648-695, AG Prof. Dr. Multhaup
IP: 5 μ g/ml
- 879: polyklonaler Kaninchen-Antikörper; Epitop: C-Terminus sAPP β , P. Paganetti, Novartis
WB: 1:1000
- 18-1: polyklonaler Kaninchen-Antikörper; hergestellt durch Immunisierung mit synthetischem A β 40, AG Prof. Dr. Multhaup
IP: 5 μ l/ml
- Anti-MBP: polyklonaler Kaninchen-Antikörper (New England Biolabs, USA);
WB: 1:10000
- 2nd-anti-Maus-HRP: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper zur Chemilumineszenz-Detektion muriner Erstantikörper im Western Blot (Promega, USA).
WB: 1:10000
- 2nd-anti-Kaninchen-HRP: mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper zur Chemilumineszenz-Detektion von Erstantikörpern aus Kaninchen im Western Blot (Promega, USA)
WB: 1:10000

2nd-anti-Kaninchen-Cy3: mit dem Fluorophor Cy3 markierter Zweitantikörper zur Fluoreszenz-Detektion polyklonaler Erstantikörper in der Immunfluoreszenz (Dianova)
IF: 1:400

2nd-anti-Maus-Alexa-Fluor594: mit dem Fluorophor Alexa-Fluor594 markierter Zweitantikörper zur Fluoreszenz-Detektion monoklonaler Erstantikörper in der Immunfluoreszenz (Invitrogen, Karlsruhe)
IF: 1:600

5.7. Allgemeine Laborchemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien zum Ansetzen von Puffern und Reaktionslösungen wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Roth GmbH, Karlsruhe oder Merck, Darmstadt in der *pro analysis* Qualitätsstufe bezogen.

5.8. Enzyme und „Kits“

Alle in dieser Arbeit verwendeten und nicht gesondert aufgeführten Enzyme und „Kits“ wurden von folgenden Firmen bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet: Macherey-Nagel, Düren; Biozym, Hess. Oldendorf; Qiagen, Hilden; The Genetics Company, Schlieren, Schweiz; Stratagene, USA; Invitrogen, Karlsruhe. DNA-Polymerasen und Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs, USA bezogen. DNA-Ligasen wurden von der Firma Bioline, Mannheim oder New England Biolabs, USA bezogen.

5.9. Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Plastikwaren wie Reagiergefäße, Mikrotiterplatten und Petrischalen wurden von Sarstedt, Nümbrecht bezogen. Mikrotiterplatten für ELISA wurden von Nunc, Wiesbaden, Pipettenspitzen von Steinbrenner, Wiesbaden oder Roth GmbH, Karlsruhe bezogen. Es wurden Röntgenfilme Hyperfilm ECL von Amersham Pharmacia, GB verwendet.

5.10. Pufferlösungen

Alle nicht gesondert aufgelisteten Pufferlösungen wurden nach Sambrook et al. hergestellt (Sambrook, 1989).

5.10.1. Puffer für das ToxR-System

Z-Puffer: 60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Z-Puffer/Chloroform: 20 ml Z-Puffer, 2 ml Chloroform, 200 µl β-Mercaptoethanol

Z-Puffer/SDS: 20 ml Z-Puffer, 1,6 ml 20% SDS

ONPG-Lösung: 10 ml Z-Puffer mit 40 mg o-Nitro-phenyl-Galaktoside (ONPG)

5.11. Geräte

- Begasungsbrutschrank Hera Cell 240 (Heraeus-Kendro, USA)
- Sterile Werkbank Herasafe (Heraeus-Kendro, USA)
- Pipetten, 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl und 2 µl (Gilson, USA)
- Entwicklermaschine Cawomat 2000 IR (Cawo, Deutschland)
- Massenspektrometer Bruker Reflex, MALDI-TOF-Massenspektrometer mit Reflektor und kontinuierlicher Extraktion (Bruker Daltonic, Bremen)
- Photometer SmartSpec 3000 (Biorad, München)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)
- PCR-Maschine Mastercycler (Eppendorf, Hamburg)
- Analysenwaage BP 211D (Sartorius, Göttingen)
- Vakuumkonzentrator SpeedVac (Savant)
- Li-Cor 4000 Flachgelsequenzler (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE)
- Mikrotiterplattenlesegerät Anthos ht2 (Anthos, Salzburg)
- Schüttelinkubator TR-225 HT (Infors AG, Bottmingen)

5.12. Software

5.12.1. Bildverarbeitung

Adobe Photoshop CS2, Adobe Illustrator CS2

5.12.2. Textverarbeitung und Layout

Microsoft Word 2004 für Mac mit EndNote 8.0, Adobe InDesign CS2

5.12.3. Datenauswertung

Microsoft Excel 2004 für Mac

5.12.4. Webtools

NCBI Blast und PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

5.12.5. Sequenzdatenvergleich

Clone Manager 5.2

5.12.6. Bildquantifizierung

Alpha Ease FC Software, Version 3.2.1 für Alphamager 2200 (Biozym, Oldendorf)