

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien und Zellkulturmaterialien

Laborchemikalien wurden von den Firmen ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Boehringer Mannheim, Biochrom (Berlin), Serotech (Berlin), Gibco (Detroit, USA) und Sigma (München) in höchster Qualität bezogen. Chemikalien und Reagenzien weiterer Hersteller sind bei den entsprechenden Methoden ausgewiesen. Zellkulturmaterialien wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Diese waren sterile Einmal-Artikel.

#### 5.1.2 Organismen

##### 5.1.2.1 Prokaryotische Organismen

*Escherichia coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10 kompetente Zellen (Invitrogen, USA)

Genotyp: F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) end A1 nupG.

##### 5.1.2.2 Eukaryotische Organismen

###### 5.1.2.2.1 Insektenzellen Sf9/Sf900 (GibcoBRL, USA)

Für die Überexpression von Proteinen wurden Insektenzellen verwendet. Diese stammen aus dem Ovar des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda*. Sf900 und Sf9 Zellen sind die gleichen Zellen. Sie unterscheiden sich lediglich in der Art der Kultivierung.

Sf900 Zellen wurden ohne Serum kultiviert, wohingegen Sf9 Zellen mit Serum kultiviert wurden.

#### ***5.1.2.2.2 PC12- Zellen (ATCC, Rockville, USA)***

Diese Zelllinie stammt aus einem transplantierbaren Pheochromocytom des Nebennierenmarks der Ratte. Die Zellen gehen nach NGF-Gabe reversibel in einen neuronalen Phänotyp über (Green und Tischler, 1976).

#### ***5.1.2.2.3 HL60-Zellen (Kepler et al. 1999)***

HL60-Zellen sind eine humane promyelocytische Zelllinie. Diese Zellen können spontan differenzieren oder z. B. durch Retinsäure oder DMSO induziert werden (S.J. Collins et al. 1977, 1978 und 1979).

#### ***5.1.2.2.4 Embryonale Stammzellen***

Die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) wurden aus Blastocysten von GNE-heterozygoten C57BL/6-Mäusen (Schwarzkopf et al., 2002) isoliert. Diese Mäuse besaßen ein defektes GNE-Allel. Nach der Verpaarung von zwei GNE-heterozygoten Mäusen ergibt sich nach den Mendelschen Gesetzen eine 1:2:1 Verteilung der Genotypen Wildtyp (WT, GNE-homozygot) : Heterozygot (HT) : Knock Out (KO, zwei defekte GNE-Allele). Nicht immer entsprach der Genotyp der isolierten Blastocysten aus einer Maus auch dieser Verteilung. Um gewonnene Daten der unterschiedlichen Zellen auch miteinander vergleichen zu können, war es jedoch notwendig, dass die Zellen bzw. Blastocysten aus ein und derselben Maus stammten. In dieser Arbeit beschränken sich die Versuche auf WT- und KO-Zellen.

### **5.1.3 Tiere**

#### **5.1.3.1 C57BL/6 Mäuse (Charles River Laboratories, USA)**

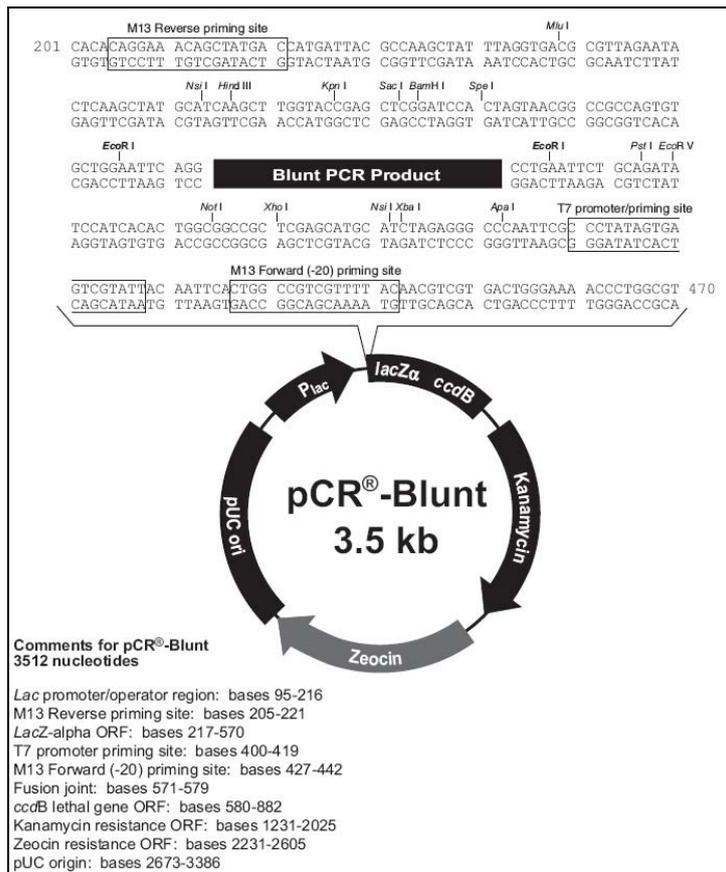
C.C. Little generierte 1921 den Stamm C57BL, indem er Weibchen 57 mit Männchen 52 von Frau Abbie Lathrops Maus-Stock paarte. 1937 wurde der Stamm 6 von C57BL separiert. C57BL ist der am häufigsten verwendete Inzuchtstamm weltweit (Littel et al. 1937).

### **5.1.4 Vektoren**

#### **5.1.4.1 Klonierungsvektor**

##### ***5.1.4.1.1 pCR<sup>®</sup>-Blunt (Invitrogen, USA)***

Dieser Vektor wurde für Zwischenschritte bei der Klonierung verwendet. In diesen Vektor können PCR-Fragmente oder andere DNA-Fragmente inseriert werden, die keine überhängenden Enden also blunt Enden besitzen. Durch die Insertion wird das letale Gen *ccdB* unterbrochen und die positiven Rekombinanten können so direkt selektiert werden.



### 5.1.4.2 Vektoren für das Yeast Two Hybrid-System

Diese Vektoren sind sowohl Bakterien- als auch Hefevektoren. Sie besitzen jeweils einen bakteriellen und einen für Hefen speziellen Ori (origin of replication). *Col E1* wird für die Replikation in Bakterien benötigt und  $2\mu$  (Ori des 2 Mikron-Plasmids) für die Replikation in Hefen. Für die Expression der Fusionsproteine in Hefen besitzen die Vektoren den ADH1-Promoter. Diese Vektoren wurden uns von Dr. U. Stelzl und Prof. E. Wanker vom MDC Berlin zur Verfügung gestellt.

#### 5.1.4.2.1 pBTM117c (9350 bp)

Dieser Vektor wurde aus dem Vektor pBTM117 (Clontech) generiert, indem ein ca. 3,5 kb großes Fragment vom *CAN1* Gen in die einzige *PvuII* Restriktionsstelle des Vektors inseriert wurde. Der Vektor besitzt eine LexA DNA-Bindedomäne (DB) hinter dem ADH1-Promoter, der die Expression eines DB-Fusionsprotein in Hefen

ermöglicht. Außerdem befindet sich auf dem Vektor das *TRP1* zur Synthese der Aminosäure Tryptophan und ermöglicht so die Selektion der Hefen auf Tryptophan-Mangelmedium. Die Selektion in *E. coli* erfolgte über die Ampicillinresistenz.

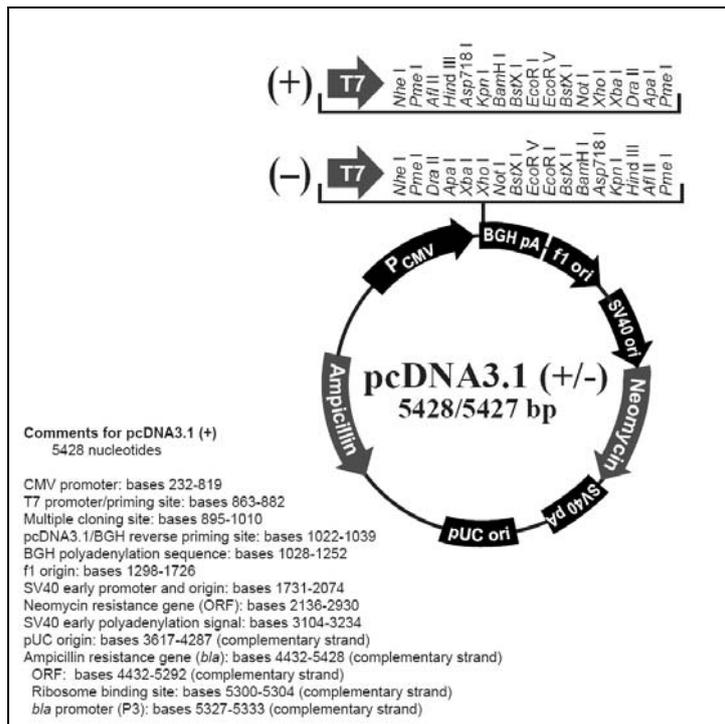
#### **5.1.4.2.2 *pGAD427 (9134 bp)***

Dieser Vektor besitzt die Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) ebenfalls hinter dem ADH1-Promoter. Die Selektion der Hefen erfolgte auf Leucin-Mangelmedium, da der Vektor das Gen *LEU2* zur Synthese von Leucin besitzt. Die Selektion in Bakterien erfolgte über die Kanamycinresistenz.

### **5.1.4.3 Expressionsvektor für Säugerzellen**

#### **5.1.4.3.1 *pcDNA 3.1/Zeo (Invitrogen, Carlsbad, USA)***

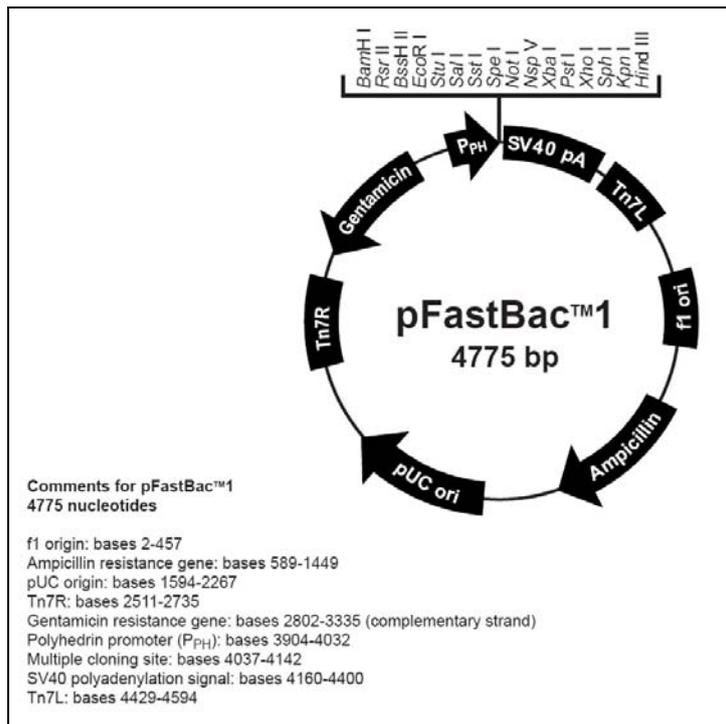
Dieser Vektor wurde für die Expression rekombinanter GNE in Säugerzellen verwendet. Er kann sowohl für transiente als auch für stabile Transfektionen (Selektionsmarker Zeocin) genutzt werden. Er trägt den *immediate-early enhancer promotor* des humanen Cytomegalovirus (CMV) und gewährleistet so die konstitutive Expression auf einem hohen Niveau in verschiedenen Säugerzellen. Der Vektor trägt hinter der *multiple cloning site* (MCS) das Polyadenylierungssignal aus dem bovinen Wachstumshormon (BGH), um die mRNA zu stabilisieren und eine effiziente Beendigung der Transkription zu gewährleisten.



#### 5.1.4.4 Expressionsvektor für Insektenzellen

##### 5.1.4.4.1 *pFASTBAC™1* (Invitrogen, Niederlande)

Dieser Vektor wurde in dem Bac-to-Bac<sup>®</sup> Baculovirus Expressionssystem eingesetzt und besitzt eine große *multiple cloning site* (MCS), in die das Gen der GNE bzw. das Gen des PLZF kloniert wurde für eine hohe Expression dieser Proteine in Insektenzellen. Dieses Expressionssystem basiert auf einer Methode, die von Luckow et al. 1993 entwickelt wurde und nutzt die Eigenschaft zur ortsspezifischen Transposition des Tn7 Transposons. Die Expression der Gene wird von dem Polyhedrin (PH) Promoter des *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis Virus (AcMNPV) kontrolliert (Smith et al. 1985, Miyamoto et al. 1985). Diese Expressionscassette ist von dem linken und rechten Arm des Tn7 Transposons flankiert und besitzt außerdem ein Gentamicin Resistenz-Gen und ein SV40 Polyadenylierungssignal, um ein Mini-Tn7 zu bilden.



### 5.1.5 Oligonukleotide (MWG Biotech, München)

#### 5.1.5.1 Amplifizierung der GNE und deren Fragmente

Während der Amplifizierung der GNE wurden in die PCR-Produkte Schnittstellen eingebaut, um diese dann in die richtige Orientierung in den Hefe-Expressionsvektor zu klonieren. Die eingebauten Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Sall* und *NotI* sind kursiv dargestellt. In den Forward (sense) Primern ist die *Sall*-Schnittstelle eingebaut worden und in den Reverse (antisense) Primern ist die *NotI*-Schnittstelle eingebaut worden. Das Startcodon ist fett markiert.

Primer 1FWnew	5'- <i>GTCGACGTCG</i> <b>ACAATGGAGA</b> AGAACGGGAA TAACCGG-3'
Primer 2RV	5'- <i>GCGGCCGCCT</i> AGTGGATCCT GCGGGTCG-3'
Primer 3RV	5'- <i>GCGGCCGCGC</i> <i>GGCCGCAATA</i> TCCTGAGAGA TGTTCT-3'
Primer 4FW	5'- <i>GTCGACGTCG</i> <i>ACGAGTGCCT</i> TGGCTGTTGA TC-3'
Primer 5FWnew	5'- <i>GTCGACGTCG</i> <b>ACTATTCGGA</b> TGTGGCTAGG TGA3-'
Primer 6RV	5'- <i>GCGGCCGCGA</i> GTCCACAGA GTTCCACT-3'
Primer 7RV	5'- <i>GCGGCCGCCA</i> AAAGGATGCG GTCGTGGT-3'
Primer 8FW	5'- <i>GTCGACGTCG</i> <i>ACGGATGTCC</i> TCAACCGCCT GAAGC-3'
Primer 9RV	5'- <i>GCGGCCGCGG</i> GTTCCAAAGG CGCCAACC-3'
Primer 10FW	5'- <i>GTCGACGTCG</i> <i>ACGATGGTTC</i> GAGTGATGCG GAAG-3'

Primer 11RV	5'-GCGGCCGCGC TGCCGTGGAT CAGCTCGT-3'
Primer 12FW3	5'-GTCGACGTCG ACAACCCTGC ATCTC-3'
Primer 13RV	5'-GCGGCCGCGC GGCCGCCATA GTGTGGAGGA TATTCA-3'
Primer 14FWnew	5'-GTCGACGTCG ACAGTGGAAAG GGATGTCAGT GCC-3'

Die Kombination der einzelnen Primer zur Amplifizierung unterschiedlicher Fragmente des GNE-Gens ist der Tabelle zu entnehmen.

ABSCHNITT DES PROTEINS	NUMMER DES ABSCHNITTS	PRIMER- KOMBINATION	GRÖÖE DES PCR- PRODUKTS
Gesamte GNE	1	1FWnew/2RV	2,2 kb
Epimerase-Domäne	2	1 FWnew/3RV	1,2 kb
Kinase-Domäne	3	4 FW/2RV	0,96 kb
Abschnitt zw. 2 und 3	4	5FWnew/6RV	0,91 kb
Erstes Drittel Epimerase-Domäne	5	1FWnew/7RV	0,55 kb
Zweites Drittel-Epimerase-Domäne	6	8FW/9RV	0,66 kb
Drittes Drittel Epimerase-Domäne	7	10FW/3RV	0,43 kb
Erstes Drittel Kinase-Domäne	8	4FW/11RV	0,47 kb
Zweites Drittel Kinase-Domäne	9	12FW3/13RV	0,47 kb
Drittes Drittel Kinase-Domäne	10	14FWnew/2RV	0,35 kb
Abschnitt zw. 5 und 6	11	1 FWnew/9RV	0,95 kb
Abschnitt zw. 6 und 7	12	8FW/3RV	0,92 kb
Abschnitt zw. 8 und 9	13	4FW/13RV	0,77 kb
Abschnitt zw. 9 und 10	14	12FW3/2RV	0,66 kb

### 5.1.5.2 Für die Sequenzierung der GNE und deren Fragmente

#### 5.1.5.2.1 Unmarkierte Primer für die Sequenzierung im pCR<sup>®</sup>Blunt Vektor

M13rev	5'-CAGGAAACAG CTATGAC-3'
T7fwd	5'-CCCTATAGTG AGTCGTATT-3'

### 5.1.5.2.2 Markierte Primer für die Sequenzierung im Hefevektor

Forward Primer 511 5'IRD700	5'-ATGTGTGAGG ACCACGA-3'
Forward Primer 1792 5'IRD800	5'-AGGGAAGCAA AGAAGCTCCAC-3'
Reverse Primer 480 5'IRD700	5'-GTTGCTCTGC ACTCCTGGTG-3'
Reverse Primer 1747 5'IRD800	5'-TTCCACAGGA GCAGTCA-3'
Reverse Primer 1792 5'IRD800	5'-GAGCTTCTTT GCTTCCCT-3'

### 5.1.5.2.3 Unmarkierte Primer für die Sequenzierung im Hefevektor

Primer400fwd	5'-CATCCGCATC CTTCACATTG-3'
Primer400rev	5'-CAATGTGAAG GATGCGGATG-3'
Primer600rev	5'-ACCTAGCCAC ATCCGAATGA T-3'
Primer800fwd	5'-GAAGGGCATC GAGCATC-3'
Primer901fwd	5'-AGCAGCTGTG GAGTGCGTGA-3'
Primer1086rev	5'-AATCCTTGGA ACAGCATTTC CATCC-3'
Primer 1600rev	5'-TCCTTTTCCT TGGCCAAAC-3'
Primer1900fwd	5'-CATCCAAGCC GCCAAG-3'
Primer1900rev	5'-CTTGCGGGCT TGGATG-3'
Primer2001rev	5'-GACTAGCCAG GACTCCAGAC-3'

### 5.1.5.3 Primer für die Charakterisierung der ES-Zellen

WT-Allel	P36	5'-CACATACCGCATGATTGAGC-3'
	P37	5'-CACCAGGCTCCACACGATTG-3'
	P42	5'-TTGAAATATGCCCAATACTTT-3'
	P43	5'-GCTGCTAATAGAATACTGTGTCC-3'
KO-Allel	P41	5'-GCCACATCCGAATGATGCTC-3'
	PA(A541)	5'-CGAAGGAGCAAAGCTGCTATTGGCC-3'

### 5.1.6 Enzyme

Benzonase	Novagen
DNase	Roche, Mannheim
<i>Pfx</i> Polymerase	Invitrogen, Niederlande
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St.Leon-Rot

RNase	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
TaqPolymerase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Trypsin	Viralex, PAA Laboratories

### 5.1.7 Antikörper

ANTIKÖRER	KONZENTRATION BZW. VERDÜNNUNG FÜR ANWENDUNG			HERSTELLER
	IB	FACS	IP	
Primäre Antikörper				
<i>Anti-GNE</i>				
Kanninchen pAb	1:1000		50 µg	AG Reutter, Berlin
<i>Anti-PLZF</i>				
Maus mAb D-9	1:1000			Santa Cruz Biotechnology, USA
Kanninchen pAb H-300	1:1000			Santa Cruz Biotechnology, USA
Maus mAb 2A9	1:1000			Calbiochem EMD Biosciences, USA
<i>Anti-CRMP1</i>				
Maus Klon Y21	1:1000			Upstate Biotechnology, Charlottesville, USA
<i>Anti-Ubiquitin</i>				
Maus mAb P4D1	1:1000			Cell Signaling Technology, USA
Kanninchen pAb	1:1000			Calbiochem EMD Biosciences, USA
<i>Anti-SUMO</i>				
Anti-SUMO-1 Kanninchen pAB	1:1000			Cell Signaling Technology, USA

Anti-SUMO-/32 Kanninchen pAb	1:1000			Cell Signaling Technology, USA
<i>Anti-GST</i>				
Kanninchen pAb POD konjugiert	1:000			Sigma
<i>Anti-His</i>				
Maus mAb	1:000			Qiagen
<i>Anti-SSEA-1</i>				
Maus mAB MC-480		FACS 5 µg		Chemicon International, USA
Maus mAB 480 FITC konjugiert		FACS 5 µg		Santa Cruz Biotechnology, USA
<i>Anti-Sialyl Lewis x</i>				
Maus mAb KM93		FACS 5 µg		Calbiochem EMD Biosciences, USA
Sekundäre Antikörper				
Ratte-anti-Maus IgG- Peroxidase konjugiert	1:5000			Jackson ImmunoResearch, USA
Ziege-anti- Kanninchen IgG Peroxidase konjugiert	1:5000			Jackson ImmunoResearch, USA
Anti-Maus IgM FITC konjugiert		FACS 1:250		Sigma, München

### 5.1.8 Lectine

LFA (Limax Flavus Agglutinin FITC konjugiert) der Firma EY Laboratories, San Mateo, CA. Das Lectin LFA wurde für FACS-Analysen verwendet. Es wurden pro Analyse von 500000 Zellen/ 500 µl je 5µg LFA eingesetzt. Das LFA war direkt FITC konjugiert, so dass der Einsatz eines sekundären Antikörpers nicht notwendig war.

### 5.1.9 Inhibitoren

Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
Lactacystin	Sigma
MG132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal)	Sigma

### 5.1.10 Medien

DMEM (Dulbecos Modified Eagle Medium)	PAN
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	PAN

### 5.1.11 Medienzusätze

NEAA, Non Essential Amino Acids	Gibco
$\beta$ -Mercaptoethanol	Gibco
L-Glutamin	biowest
Adenosin	Sigma
Guanosin	Sigma
Uridin	Sigma
Cytidin	Sigma
Thymidin	Sigma

#### 5.1.11.1 Antibiotika

Ampicillin	Boehringer Mannheim
Kanamycin	Gibco
Penicillin	PAA
Streptomycin	PAA

### 5.1.11.2 Seren

HS	PAN
FCS	Gibco
KOSR	Gibco

### 5.1.12 Bestandteile der extrazellulären Matrix

Gelatine	Sigma
----------	-------

### 5.1.13 Wachstumsfaktoren

ESGRO, Leukemia Inhibitory Factor	Chemicon
-----------------------------------	----------

### 5.1.14 Kits

Cell Line Nucleofektor™ Kit V	Amaxa Biosystems, Köln
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Mannheim
Qiafilter Maxi Kit	Qiagen
QIAprep® Minipräp-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktions-Kit	Qiagen, Hilden
RNAesy® Mini-Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript	Invitrogen
Thermo Sequenase™ Primer	
Cycle Sequenzier-Kit	Amersham -Biosciences, Uppsala, Schweden

### 5.1.15 Größenmarker

Protein-Molekulargewichtsmarker	
Precision Plus Protein™ Standards	Bio-Rad

DNA-Molekulargewichtsmarker

Gene Ruler™1 kb DNA Ladder Fermentas

### 5.1.16 Membranen

Nitrozellulosemembran Schleicher&Schüll

### 5.1.17 Agarosen und Sepharosen

Glutathion-Sepharose Amersham

Ni<sup>2+</sup> NTA-Agarose Qiagen

Protein-A-Sepharose Amersham

CNBr-activated Sepharose® 4B Pharmacia Biotech

PD10 Säulen Amersham

### 5.1.18 Materialien und Substanzen für radioaktiven Enzymassay

<sup>14</sup>C-UDP-GlcNAc Amersham

Ultima Gold™XR Packard Bioscience Company

Whatman® 3mm Chr Whatman International, England

### 5.1.19 Geräte

Brutschrank Heraeus 6000, Kendro  
Laboratory Products

ELISA-Reader Sunrise, Tecan

FACScan BD Biosciences Immuno-  
cytometry Systems

Feinwaage Adventure, Ohaus

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200, Zeiss

Gel-/Blot-Apparaturen Miniprotean II, Biorad

Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5B Kendro Laboratory Products
Magnetrührer	IKAMAG, Roth
Mikroskop	Diavert, Leica
PCR-Cycler	Robo-Cycler Gradient 96, Stratagene
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf
Schüttel-Inkubator	Innova 4230 Shaker, Memmert
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, UK
LI-COR 4200	MWG Biotech, München
1900 CA Liquid Scintillation Analyzer	Packard, Canberra Company
TRI-CARB®	
Sterilbank	Gelaire Class 100, Gelman Inst.
Thermomixer compact	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge pico Heraeus, Kendro Laboratory Products
Transilluminator	MWB-Biotech
Lab Sonic®M	B. Braun Biotech International, Sartorius Group
Waage	CP622, Sartorius
Wasserbad GFL®1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Behandlung von Lösungen und Geräten**

Hitzestabile Gefäße, Geräte und Lösungen wurden durch Autoklavieren sterilisiert und gleichzeitig von DNase-Aktivität befreit. Geräte, die nicht hitzestabil waren, sowie Arbeitsflächen wurden mit 75 %igem Ethanol gereinigt. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

### **5.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **5.2.2.1 DNA-Grundtechniken**

##### ***5.2.2.1.1 Plasmidisolierung aus Bakterien***

###### **5.2.2.1.1.1 Plasmidpräparation mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly 1979)**

Die alkalische Lyse beruht darauf, dass in einem engen pH-Bereich, die nichtüberspiralisierte DNA (Bakterienchromosom) denaturiert wird, überspiralisierte Plasmide hingegen nicht. Bei pH-Werten von 12 bis 12,5 lösen sich die Wasserstoffbrücken in nichtüberspiralisierten DNA-Molekülen auf. Die Doppelhelix wird entwunden, und die beiden Polypeptidketten trennen sich. Setzt man anschließend Säure zu, lagern sich die denaturierten Stränge der Bakterien-DNA zu einer verworrenen Masse zusammen, die unlöslich ist und sich durch Zentrifugieren leicht entfernen läßt; im Überstand bleiben dann nur die Plasmide zurück. Das Verfahren hat noch einen weiteren Vorteil: Wenn man die Zellen mit Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert und die Reaktion anschließend mit Natriumacetat neutralisiert, werden auch Proteine und RNA zum größten Teil unlöslich, so daß man sie ebenfalls beim Zentrifugieren beseitigt.

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterien wurde eine sogenannte Minipräparation durchgeführt. Von einer 3 ml Bakterien-ÜN-Kultur wurden 1,5 ml in

ein Eppendorfgefäß überführt und zentrifugiert (13000 rpm, 3 min, RT). Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Lösung A aufgenommen. Das in Lösung A enthaltene EDTA entfernt die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Zellhülle unentbehrlichen  $Mg^{2+}$ -Ionen, außerdem hemmt es DNA-abbauende Enzyme. Dann wurden 200 µl Lösung B zugegeben und vorsichtig durch 4-6 maliges kippen des Eppendorfgefäßes gemischt und 5 min bei RT inkubiert. In Lösung B ist das Detergenz SDS enthalten, das den Auflösungsprozess durch Entfernen von Lipidmolekülen aus der Zellmembran unterstützt. Anschließend wurden 200 µl Lösung C zugegeben und wieder durch kippen des Gefäßes gemischt und etwa 10 min auf Eis inkubiert. Lösung C enthält das NaAc zur Neutralisierung der Lösung. Bei diesem letzten Schritt fallen Bakterien-DNA, Proteine und RNA aus. Dann wurde zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C) und die Plasmid-DNA blieb im Überstand zurück. Der Überstand wurde in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid-DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert (2-5 min, RT). Anschließend wurde wieder zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C) und das DNA-Pellet mit 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 20-50 µl sterilem  $H_2O$  bidest. aufgenommen. Mit dieser Methode wurden durchschnittlich 2-4 µg Plasmid-DNA aus 1 ml Bakterienkultur isoliert.

#### Lösungen für die Plasmidpräparation

Lösung A	50 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
Lösung B	200 mM	NaOH
	1%	SDS (w/v)
Lösung C	3 M	Natriumacetat
	mit Essigsäure auf einen pH von 5 einstellen	

#### **5.2.2.1.1.2 Chromatographische Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Präparation erfolgte mit Hilfe eines Kits von Qiagen und nach den Vorschriften der Bezugsfirma. Diese Präparation erfolgte ebenfalls mittels SDS/alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979), dem sich eine zusätzliche säulenchromatographische Aufreinigung der DNA anschloß. Dabei wird die DNA an eine Silicagel-Membran gebunden. Verunreinigungen wie Nukleotide, Enzyme, Salze, Öle und Detergenzien werden nicht gebunden bzw. mit ethanolhaltigem Puffer ausgewaschen. Am Ende der Präparation wird die DNA mit 20-50 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Um größere Mengen DNA zu reinigen wurde der QuiafilterMaxiKit verwendet.

#### **5.2.2.1.2 Anreichern der DNA-Proben durch DNA-Fällung**

DNA läßt sich sowohl mit Ethanol als auch mit Isopropanol fällen. Die am häufigsten benutzte Anreicherungs-methode ist die Ethanolpräzipitation. In Gegenwart von einwertigen Kationen und bei Temperaturen unter -20°C fällt absolutes Ethanol die Nukleinsäurepolymere sehr wirksam aus.

Fällung mit absolutem EtOH: Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen absolutem EtOH versetzt, wobei nach jedem Pipettiervorgang gemischt wurde. Die Fällung erfolgte entweder 1 h bei -80°C oder ÜN bei -20°C. Danach wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C) und das DNA-Pellet anschließend mit 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen, wieder zentrifugiert und luftgetrocknet. Das Pellet wurde dann in sterilem H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen.

Fällung mit Isopropanol: Die DNA-Lösung wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C) und das DNA-Pellet anschließend mit 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen, wieder zentrifugiert und luftgetrocknet. Das Pellet wurde dann in sterilem H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen.

### ***5.2.2.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA***

DNA-Konzentrationen kann man mit der UltraviolettabSORPTIONSSPEKTROMETRIE sehr exakt messen. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Die Absorption wird bei 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml. Außerdem kann mit dieser Methode auch die Reinheit der DNA überprüft werden. Bei einer reinen DNA-Probe liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) bei 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Eine weitere Möglichkeit die Menge und Reinheit der DNA-Probe zu bestimmen, ist das Auftrennen der DNA-Moleküle mittels Agarosegelelektrophorese. Diese Methode ist nicht so genau wie die photometrische Bestimmung, da man die Menge der DNA nur abschätzen kann.

### ***5.2.2.1.4 Trennung von DNA-Molekülen durch Gelelektrophorese***

DNA trägt negative elektrische Ladung und wandert deshalb in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls hängt von der Ladung und der Größe des Moleküls ab. Wird die Elektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt, so werden die unterschiedlichen DNA-Moleküle anhand ihrer Größe aufgetrennt. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller bewegt es sich durch die Poren des Gels. Die Zusammensetzung des Gels bestimmt die Größe der DNA-Moleküle, die sich damit trennen lassen. Für die Auftrennung kleiner DNA-Moleküle benutzt man höher prozentige Agarosegele und für die Auftrennung großer Moleküle benutzt man niedriger prozentige Gele. Um die einzelnen DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, benutzt man Ethidiumbromid (EtBr). EtBr interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Bestrahlung rötlich.

Die Auftrennung erfolgte hauptsächlich in 0,8-2,0 %igen Agarosegelen (w/v). Dazu wurde die Agarose in TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA) aufgekocht. Nach Abkühlung auf etwa 50°C wurde die Lösung in den Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Gelschlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Dann wurden die Proben mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 70-80 V (5

V/cm) durchgeführt bis der Farbmarker die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hatte. Zur Visualisierung der DNA wurde das Gel in ein EtBr-Bad für 10-15 Minuten gelegt und mittels UV-Licht wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht. Die Größe und Menge der DNA konnte nun anhand des Vergleichs mit dem Größenmarker abgeschätzt werden.

#### Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	0,1 %	Essigsäure
	2 mM	EDTA
5 × DNA-Probenpuffer	60 %	Glycerin
	60 mM	EDTA
	0,025 %	Bromphenolblau (läuft bei ca. 300 bp)
	0,025 %	Xylencyanol (läuft bei ca. 1000 bp)

#### **5.2.2.1.5 Isolierung von DNA mittels Gelelektion**

Die DNA-haltigen Banden können aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Mit Hilfe eines Kits von Qiagen (Qiaquick Gel extraction Kit) wurde dann die DNA aus der Agarose isoliert. Zunächst wurde den Herstellerangaben zufolge das Gelstückchen in Puffer QG getan und geschmolzen und dann auf eine Säule mit einer Silicagel-Membran aufgetragen. Dabei wird ähnlich wie bei der chromatographischen Reinigung der Plasmid-DNA die DNA an die Silicagel-Membran gebunden und Verunreinigungen wie Nukleotide, Enzyme Agarose, EtBr, Primer und Detergenzien werden nicht gebunden bzw. mit dem ethanolhaltigem Puffer ausgewaschen. Am Ende der Präparation wurde die DNA mit 20-50 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Diese Methode eignet sich auch zur Aufreinigung von PCR-Produkten.

### 5.2.2.1.6 Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) nach (Saiki 1986, Mullis und Faloona 1986).

Die PCR bewirkt die selektive Vervielfältigung eines beliebigen Abschnitts in einem DNA-Molekül. Man kann dazu jeden DNA-Bereich auswählen, vorausgesetzt, die Sequenzen an seinen Enden sind bekannt. Zu Beginn der PCR hybridisieren zwei kurze Oligonukleotide mit dem DNA-Molekül - an jedem Strang der Doppelhelix eines. Diese Oligonukleotide dienen als Primer für die DNA-Synthesereaktion und begrenzen den Abschnitt, der vervielfältigt werden soll. Eine PCR-Reaktion läuft in drei Schritten ab: Denaturierung der DNA bei 95°C, Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge bei einer spezifischen Hybridisierungstemperatur (gewöhnlich zwischen 50°C und 60°C) und Synthese des komplementären Stranges in 5' → 3'-Richtung (Polymerase-spezifische Temperatur, z.B. *Taq*Polymerase 72°C; *Pfx*Polymerase 68°C). Diese drei Schritte werden 25-35 mal wiederholt, so daß eine exponentielle Amplifikation der gewünschten PCR-Produkte erfolgt und diese schließlich in mehreren hundert Millionen Exemplaren vorliegen. Die DNA-Polymerase für die Synthese muß hitzestabil sein. Meistens wird die DNA-Polymerase I aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*Polymerase) verwendet. Die meisten DNA-Polymerasen machen während der Synthese Fehler, so daß ab und zu ein falsches Nukleotid eingebaut wird. In diesen Fällen setzt die "Korrekturlesefunktion" der Polymerasen ein, die von der 3' → 5'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abhängt. Die *Taq*Polymerase besitzt diese Exonukleaseaktivität nicht. Die Fehlerhäufigkeit liegt schätzungsweise bei einer falschen Base je 9000 Nukleotide. Für Experimente, bei denen exakte Kopien der Matrize benötigt werden, sollte demnach nicht mit der *Taq*Polymerase amplifiziert werden. Hierfür gibt es andere Polymerasen, die eine Exonukleaseaktivität besitzen wie z.B. die *Pfx*Polymerase. In dieser Arbeit wurde für die Amplifizierung von bestimmten DNA-Fragmenten die *Pfx*Polymerase verwendet. Für einfache Kontroll-PCR's wurde die *Taq*Polymerase verwendet.

TaqPolymerase-Reaktion (Fermentas)

25 µl Ansatz:	Puffer mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10×)	2,5	µl
	dNTP's (10 mM)	1	µl
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4	µl
	sense Primer (0,2 µM)	1	µl
	antisense Primer (0,2 µM)	1	µl
	Template-DNA (10-100 ng)	x	µl
	H <sub>2</sub> O bidest.	x	µl
	TaqPolymerase (1 U/µl)	1	µl

PCR-Programm:

	95°C	2 min
30-35 Zyklen:	95°C	15 sec
	50°C-60°C	15 sec
	72°C	1 min pro kb
	4°C	∞

PfxPolymerase-Reaktion (Invitrogen)

25µl Ansatz:	Template-DNA (10 pg-200 ng)	x	µl
	sense Primer (0,2 µM)	1	µl
	antisense Primer (0,2 µM)	1	µl
	AccuPrime™ Pfx SuperMix	22,5	µl

PCR-Programm:

	95°C	5 min
35 Zyklen:	95°C	15 sec
	55-65°C	30 sec
	68°C	1 min pro kb
	4°C	∞

Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

### 5.2.2.1.7 *Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen* (Brooks, 1987; Smith und Wilcox, 1970)

Bei der Erzeugung rekombinierter DNA-Moleküle ist es wichtig, dass die DNA sehr exakt und an spezifischen Stellen gespalten wird. Ein Expressionsvektor z.B. muß an einer ganz bestimmten Stelle geöffnet werden, um dort ein DNA-Fragment einfügen zu können. Dabei macht man sich die sogenannte wirtskontrollierte Restriktion zu Nutze. Einige Bakterienstämme sind nämlich gegen die Infektion mit einem Bakteriophagen immun. Die Bakterien produzieren Enzyme, die die Phagen-DNA abbauen. Die eigene Bakterien-DNA ist durch zusätzliche Methylgruppen vor dem Abbau geschützt. Diese Enzyme werden als Restriktionsendonukleasen bezeichnet. Für jedes dieser Enzyme gibt es eine bestimmte Erkennungssequenz, an der die DNA gespalten wird. Die Erkennungssequenzen sind meist palindromische Nukleotide von 4-8 bp Länge. Endonukleasen können Phospho-diesterbindungen im Innern eines DNA-Moleküls spalten, wobei ein 5'-Phosphat- und ein 3'-Hydroxyl-Ende entstehen. Viele Restriktionsenzyme spalten beide DNA-Stränge in der Mitte der Erkennungssequenz, so daß glatte Enden (*blunt ends*) entstehen. Zahlreiche Endonukleasen schneiden die DNA aber nicht genau an derselben Stelle. Die Schnitte sind in der Regel um zwei bis vier Nukleotide versetzt, so dass an den DNA-Fragmenten kurze überstehende Einzelstrangabschnitte entstehen. Diese Stücke werden auch als klebrige Enden oder kohäsive Enden (*sticky ends*) bezeichnet, weil durch Basenpaarungen die Molekülfragmente wieder zusammenkleben. Die meisten in der Gentechnik verwendeten Restriktionsendonukleasen arbeiten bei einer Temperatur von 37°C und einem pH von 7,4 sehr gut und benötigen  $Mg^{2+}$  und spezifische Ionenstärken. Die Herstellerfirmen von Endonukleasen liefern deshalb zusätzlich zu den Restriktionsenzymen auch spezielle Puffer mit, die spezifisch sind für jedes Enzym, damit die Spaltung der DNA unter optimalen Bedingungen erfolgen kann. Benötigen zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme für die Spaltung der DNA die gleichen Bedingungen, so kann man auch einen Doppelverdau durchführen. Man sollte dabei jedoch darauf achten, dass die entstehenden Enden keine komplementären Enden sind, sonst würde dies zu einer Religation der DNA führen. Eine Einheit (1 U) des Enzyms ist als die Menge definiert, die 1 µg DNA des Phagen  $\lambda$  in einer Stunde spaltet. Die Restriktionsspaltung erfolgte also nach Angaben des Herstellers.

Beispiel für einen Doppelverdau

25 µl Ansatz	Template-DNA (5 µg)	x	µl
	Puffer Y <sup>+</sup> /Tango™ (10×)	2,5	µl
	XhoI (5 U/µl)	0,5	µl
	KpnI (5 U/µl)	0,5	µl
	H <sub>2</sub> O bidest.	x	µl

Der Verdau wurde 1h bei 37°C inkubiert. Bei einem Verdau über Nacht wurde nur 0,1 U des Enzyms eingesetzt, um unspezifische DNA-Spaltung zu vermeiden. Die Reaktion wurde durch Hitze (65°C, 20 min) gestoppt. Der Ansatz wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert bzw. die DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert.

#### **5.2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten (Weiss et al. 1968, Richardson et al. 1968)**

Bei der Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls muss das DNA-Fragment, dass man klonieren möchte, in einen geeigneten Vektor inseriert werden. Dabei werden jeweils glatte bzw. kohäsive Enden über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft. Diese Reaktion bezeichnet man als Ligation und wird von dem Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Die T4-DNA-Ligase wird aus *E.coli*-Bakterien gereinigt, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert sind. Alle lebenden Zellen produzieren DNA-Ligasen, die eine sehr wichtige Funktion erfüllen, nämlich die Reparatur von Brüchen in einem doppelsträngigen DNA-Molekül. Die Ligation von glatten Enden ist nicht so effizient wie die Ligation von kohäsiven Enden, da glatte Enden nur durch Zufall aufeinander treffen. Deshalb muss mit hohen DNA-Konzentrationen gearbeitet werden. Bei kohäsiven Enden kommt es zur Basenpaarung und die Enden bleiben länger beieinander, so dass die Ligation effizienter ablaufen kann. Bei einer Ligationsreaktion wird das kleinere DNA-Fragment, dass in den Vektor inseriert werden soll, im Überschuß eingesetzt. Gewöhnlich wird ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 verwendet.

Beispiel für einen Ligationsansatz

10 µl Ansatz	Puffer (10×)	1	µl
	T4-DNA-Ligase (5 WeissU/µl)	1	µl
	Vektor (100 ng)	x	µl
	Insert (3facher molarer Überschuß)	x	µl
	H <sub>2</sub> O bidest.	x	µl

Um die Reaktion zu stoppen, wurde der Ansatz für 10 min bei 65°C erhitzt. Für die Transformation in Bakterienzellen wurde der halbe bis gesamte Ligationsansatz verwendet.

### 5.2.2.2 DNA-Sequenzierung (Sanger et al. 1977 und Sanger und Coulson 1975)

Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Bei dieser Methode findet zunächst eine Synthese des komplementären Stranges statt, der den DNA-Abschnitt enthält, der sequenziert werden soll. Wie bei einer gewöhnlichen PCR benötigt man hierfür ebenfalls Primer und Desoxynukleotide (dNTP). In dem Reaktionsansatz ist aber zusätzlich ein abgewandeltes Nukleotid enthalten, und zwar ein Didesoxynukleotid (ddNTP, z.B. ddATP). Das Didesoxynukleotid wird in den wachsenden Polynukleotidstrang ebenso wirksam eingebaut, wie ein normales Nukleotid, aber es verhindert die weitere Synthese des Stranges, da dem ddNTP die Hydroxylgruppe in der 3'-Position des Zuckeranteils fehlt. Diese Gruppe wird jedoch für die Anheftung des folgenden Nukleotids benötigt. Die Kette bricht also immer dann ab, wenn ein ddNTP einbaut wird. Die Synthesereaktion läuft viermal parallel ab, in jedem Ansatz ist ein anderes Didesoxynukleotid (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP) enthalten. Da in jedem Ansatz auch die normalen dNTPs enthalten sind, entstehen z.B. in einem ddATP-Ansatz viele unterschiedlich lange Polynukleotidstränge, die alle auf ein ddATP enden. Die einzelnen Polynukleotidstränge werden dann in einem 6%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt und analysiert. Mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen kann man die einzelnen Polynukleotidstränge und somit die Sequenz des amplifizierten DNA-Abschnittes in einer automatischen Sequenziervorrichtung analysieren. Es gibt aber zwei Möglichkeiten bei dieser Methode: Entweder man benutzt

infrarotfluoreszenzmarkierte Sequenzierprimer (IRD700 oder IRD800) oder man verwendet fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide.

#### Sequenzierung mittels markierter Sequenzierprimer

Es wurden 1,2-1,4 µg Template-DNA eingesetzt. Diese wurde mit den fluoreszenzmarkierten Primern (2 pmol) versetzt. Es konnten zwei Primer gleichzeitig in den Ansatz gegeben werden, wenn beide eine andere Fluoreszenzmarkierung (also der eine IRD700 und der andere IRD800) besaßen. Der Template-Ansatz wurde dann auf 13 µl mit H<sub>2</sub>O bidest. aufgefüllt. Anschließend wurden je 3 µl vom Template-Ansatz auf jeweils 3 µl der vier verschiedene dNTP-Mixe des Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kits (mit je 3 µl) gegeben. Diese 6 µl Ansätze wurden 2 min bei 94°C inkubiert und anschließend einem Cycle Sequencing mit 22-25 Zyklen unterzogen (10 sec 72°C/ 20 sec 60°C/ 20 sec 95°C) und dann auf 4°C abgekühlt. Die Reaktion wurde mit 5 µl roter Stopplösung (3 min 72°C) gestoppt und anschließend auf ein 6%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und in einer automatischen Sequenziervorrichtung (LI-COR 4200, MWG-Biotech, München) analysiert.

#### Sequenzierung mittels markierter Didesoxynukleotide

Es wurde 1µg Template-DNA eingesetzt und mit 10 pmol eines Primers und 4 µl BigDye-Lösung des BigDye-™ Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Applied Biosystems, UK) in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Um längere (≥ 500 bp) Abschnitte zu sequenzieren war es nötig mehrere Ansätze mit den entsprechenden Primern zu machen, da pro Ansatz nur ein Primer verwendet werden konnte und die maximale Sequenzierlänge bei 400-500 bp lag. Nach der Sequenzier-PCR (30 sec 96°C, 25 Zyklen: 30 sec 96°C/ 15 sec 55°C/ 4 min 60°C) wurden die Proben mittels DyeEx 2.0 Spin columns (Quiagen) gereinigt. Die eluierte DNA wurde in einer Speed Vac getrocknet und in 20 µl Template-Suppression-Reagenz (AppliedBioSystems, UK) aufgenommen und für 3 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurde die DNA mittels einer automatischen Sequenziervorrichtung (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Applied BioSystems, UK) analysiert.

### **5.2.2.3 RNA-Grundtechniken**

#### ***5.2.2.3.1 Chromatographische Isolierung von Gesamt-RNA***

Die Präparation erfolgte mit Hilfe eines Kits von Qiagen (RNeasy® Mini Kit) und nach den Vorschriften der Bezugsfirma. Dabei wird die RNA an eine Silicagel-Membran gebunden. Die Proben werden lysiert und homogenisiert in einem hochgradig denaturierenden Puffer, der das chaotrope Salz Guanidinisothiocyanat (GITC) enthält. Das GITC stellt durch seine Fähigkeit RNasen zu inaktivieren sicher, dass intakte RNA isoliert wird. Ethanol wird zugegeben, um angemessene Bedingungen für die Bindung der RNA an die Membran zu gewährleisten. Mit dieser Methode der RNA-Isolierung werden alle RNA-Moleküle isoliert, die größer als 200 Nukleotide sind. D.h. mRNA wird angereichert, wobei kleine RNAs (rRNA, tRNA) selektiv ausgeschlossen werden. Am Ende der Präparation wird die RNA mit 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O bidest. eluiert.

#### ***5.2.2.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA***

Wie auch bei DNA kann die Konzentration der RNA photometrisch bei 260 nm bestimmt werden. Eine Absorption von 1,0 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

#### ***5.2.2.3.3 Auftrennung der RNA mittels Agarosegelelektrophorese***

Ebenso wie DNA lässt sich auch RNA elektrophoretisch auftrennen. Es gibt jedoch einige Unterschiede, die zu beachten sind. Im Gegensatz zu DNA wird RNA sehr schnell degradiert. Es wurde also sehr sorgfältig, sauber und steril gearbeitet. Dazu gehörte das Tragen von Handschuhen, das Säubern der Arbeitsflächen und das Verwenden von sterilen Materialien. Die Gelapparatur wurde einen Tag zuvor in einer Lösung mit 1% SDS und 50% EtOH eingelegt. Für ein Minigel wurde 1,2 % Agarose in 75 ml H<sub>2</sub>O bidest. gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden der Agarose 16 ml Formaldehyd und 10 ml 10fach MEN-Puffer zugegeben. Das ganze wurde kurz gerührt und in den gereinigten Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels

wurde 1fach MEN-Puffer in die Apparatur gegossen und die Proben aufgetragen, die zuvor in 1,5 Volumen RNA-Probenpuffer für 5 min bei 65°C erhitzt wurden. Das Gel wurde bei 5-15 V/cm Gellänge laufen gelassen und die DANN anschließend im UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

Lösungen für Agarosegelelektrophorese

10fach MEN-Puffer:	200 mM	MOPS
	50 mM	NaAc, pH 7,0
	10 mM	EDTA
RNA-Probenpuffer:	285 µl	Formamid
	85 µl	Formaldehyd
	75 µl	1fach MEN
	8 µl	Ethidiumbromid

#### 5.2.2.4 RT-PCR

Mit der Methode der RT-PCR ist die Messung der Mengenverhältnisse einer mRNA in verschiedenen Geweben oder Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen möglich. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die mRNA-Menge in einer Zelle die Aktivität des zugehörigen Gens widerspiegelt, so dass man durch quantitative Erfassung der mRNA Veränderungen der Genaktivität nachweisen kann. Die PCR-Methoden zur quantitativen Messung gehen von der Annahme aus, daß die Menge des PCR-Produkts der zu Beginn der Reaktion vorhandenen Menge an Matrizen-RNA (oder DNA) proportional ist. Die mRNA kann in DNA umgeschrieben werden, indem man ihre komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) synthetisiert. Die reverse Transkriptase ist ein Enzym, das an der Replikation mehrere Viren beteiligt ist. Sie hat die Eigenschaft, dass sie nicht DNA, sondern RNA als Matrize benutzt. Wenn der c-DNA-Strang fertig ist, kann man den RNA-Anteil des Hybridmoleküls durch Behandlung mit Ribonuclease H teilweise abbauen. Die verbleibenden RNA-Fragmente dienen dann als Primer für die DNA-Polymerase I, die den zweiten Strang der cDNA aufbaut. Für die reverse Transkription wurde der SuperScript Kit von Invitrogen verwendet. Im Anschluß an die RT folgte eine PCR mit den spezifischen Primern und Taq-Polymerase.

## 5.2.3 Zellbiologische Methoden

### 5.2.3.1 Zellbiologische Methoden für Säugerzellen

#### 5.2.3.1.1 Allgemeine zellbiologische Methoden für Säugerzellen

Alle Arbeiten mit den Säugerzelllinien wurden unter steriler Atmosphäre einer Zellkulturwerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 900 rpm für 3 min.

#### 5.2.3.1.2 Kultivierung von Säugerzellen

PC12-Zellen wuchsen zu größeren Zellaggregationen in Suspension in unbeschichteten Kulturflaschen und wurden je nach Zelldichte alle 2-3 Tage passagiert. Die PC12-Zellen wurden zunächst abzentrifugiert und das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen, wobei die Zellen vereinzelt wurden, indem sie 2-3 mal durch eine Kanüle (Ø 0,8 mm) gezogen wurden. Die Zellen wurden dann 1:5 wieder ausplattiert.

HL60-Zellen wurden ebenfalls in Suspension kultiviert. Sie wurden auch alle 2-3 Tage 1:5 umgesetzt. Da die Zellen als Einzelzellen wachsen, fiel hier das Vereinzeln beim Umsetzen der Zellen weg.

Medium für PC12-Zellen:	10 % (v/v)	HS (Horse Serum)
	5 ml	L-Glutamin (2 mM Endkonzentration)
	5 ml	Penicillin/Streptomycin (100 U pro ml/100 µg pro ml Streptomycin Endkonzentration)
	add 500 ml RPMI	

Medium für HL60-Zellen:	20 % (v/v)	FCS (Fetal Calf Serum)
	5 ml	L-Glutamin (2 mM)

5 ml Penicillin/Streptomycin (100 U  
 pro ml/100 µg pro ml  
 Streptomycin Endkonzentration)  
 add 500 ml DMEM

### ***5.2.3.1.3 Allgemeines zur Kultivierung embryonaler Stammzellen von Mäusen***

Vor mehr als 20 Jahren wurde zum ersten Mal die Technik zur Isolierung von embryonalen Stammzellen der Maus aus Blastocysten und ihre Kultivierung beschrieben (Evans und Kaufman, 1981 Nature; Martin, 1981 PNAS; Wobus, 1984 PNAS). Bei Mäusen wird die Effizienz zur Generierung von ES-Zellen durch den genetischen Stamm der Labormäuse beeinflusst. Nur einige wenige Stämme sind zur Herstellung von ES-Zellen geeignet (129, C57BL/6 und ein Hybridstamm). Damit die ES-Zellen in ihrem undifferenzierten Status bleiben, werden sie auf sogenannten Feederzellen kultiviert. Diese Feederzellen sind embryonale Fibroblasten der Maus (Mouse embryonic Fibroblast, MEF), die zuvor chemisch inaktiviert wurden, damit sie sich nicht mehr teilen, ansonsten würden die MEF sehr schnell die ES-Zellen überwachsen. In vitro kann man die ES-Zellen auch ohne MEF kultivieren, dann muss jedoch das Cytokin LIF (Leukemia Inhibitory Factor), was von MEF produziert wird, dem Medium zugegeben werden (Pease und Williams 1990, Williams et al. 1988, Nature; Rathjen et al. 1990, Cell). Oft werden die ES-Zellen auch auf MEF und zusätzlich mit LIF kultiviert. LIF bindet an einen Komplex aus LIF-Rezeptor und gp130-Rezeptor und treibt die Aktivierung des latenten Transkriptionsfaktors STAT3 an (Burdon et al. 1999, Matsuda et al. 1999, Niwa 1998). Neueste Untersuchungen zeigen, dass die beiden Transkriptionsfaktoren STAT3 und Oct-4 möglicherweise miteinander interagieren und die Transkription wichtiger Gene beeinflussen (Niwa, 2000). Oct-4 ist in der Zygote der Maus vorhanden und wird während der Blastocystenentwicklung benötigt, um die Pluripotenz der inneren Zellmasse und des Epiblasten zu gewährleisten (Nichols et al. 1998, Niwa et al. 2000). Spezifische Merkmale undifferenzierter ES-Zellen sind also die Expression des Transkriptionsfaktors Oct-4, die Präsentation des Antigens SSEA-1 auf der Zelloberfläche (Solter 1978, Knowles 1980) und eine erhöhte Aktivität der

alkalischen Phosphatase. Mittels dieser Merkmale kann man die Pluripotenz der ES-Zellen überprüfen.

#### 5.2.3.1.4 Kultivierung von ES-Zellen

Die ES-Zellen wuchsen adhärent in Kulturflaschen/Platten, die zuvor mit 0,1% Gelatine (w/v in PBS) beschichtet wurden oder auf sogenannten Feederlayer, die auf Gelatine-beschichteten Flaschen wuchsen. Sie wurden alle 48 Stunden 1:2 umgesetzt. Dazu wurden sie mittels PBS/EDTA (0,05% w/v) vom Substrat abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde 1 × mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend in Medium aufgenommen und 1:2 auf beschichtete Kulturflaschen/Platten ausplattiert.

In bestimmten Zeitabständen wurde immer mal wieder die Pluripotenz der ES-Zellen überprüft. Dazu wurde die Präsentation des SSEA-1 Antigens mittels FACS analysiert, die Oct-4 Expression mittels RT-PCR und die Aktivität der alkalischen Phosphatase mittels eines einfachen Farbttests analysiert.

Medium für ES-Zellen:	15 % (v/v)	FCS (Fetal Calf Serum)
	1 ml	LIF (ESGRO, Leukemia Inhibitory Factor, 2000 U/ml Endkonzentration)
	6 ml	Nukleoside
	1 ml	β-Mercaptoethanol (0,1 mM)
	5 ml	NEAA (0,2 mM Non-Essential Amino Acids)
	5 ml	L-Glutamin (2 mM)
	add 500 ml DMEM	

Zusammensetzung der Nukleosidlösung:

80 mg	Adenosin
85 mg	Guanosin
73 mg	Uridin
73 mg	Cytidin
24 mg	Thymidin
add 100 ml H <sub>2</sub> O bidest.	

Die Substanzen wurden bei 40°C gelöst und danach sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

#### ***5.2.3.1.5 Generierung embryonaler Stammzellen von Mäusen***

Für die Generierung embryonaler Stammzellen, wurden +/- GNE-heterozote Mäuse miteinander verpaart und am nächsten Tag (E 0,5) auf Vaginalplug untersucht und drei Tage später (E 3,5) für die Blastocystenisolation eingesetzt. Die Tiere wurden mittels CO<sub>2</sub>-Begasung und Genickbruch getötet. Das Fell wurde mit 100 %igem EtOH desinfiziert und die obere Hautschicht ohne Beschädigung der Peritonealhöhle geöffnet. Daraufhin wurde die Bauchhöhle geöffnet und der Uterus mit den anhängenden Eileitern präpariert. Durch Anheften auf ein Papiertuch wurden Fett und Blutgefäße mit einer Schere vom Uterus getrennt. Die Blastocysten wurden mit Hilfe einer Kanüle aus den Eileitern gespült und für die Gewinnung von ES-Zellen verwendet. Blastocysten bestehen aus einer äußeren Hülle und einer inneren Zellmasse. Aus dieser inneren Zellmasse werden die ES-Zellen gewonnen. Die Isolierung der ES-Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Elvira Rohde vom FMP Berlin. Sie isolierte und subklonierte die ES-Zellen.

#### ***5.2.3.1.6 Isolierung, Kultivierung und Inaktivierung von Feederzellen***

Es wurden zunächst von Mäusen, die 15-17 Tage schwanger waren, die Embryonen entfernt und diese in PBS gespült. Dann wurde die Placenta und fetale Membranen sowie Kopf, Leber und Herz der Embryonen entfernt. Die Kadaver wurden anschließend mit Trypsin-Lösung gespült. Das embryonale Gewebe wurde zerkleinert und in 5 ml frischer Trypsin-Lösung aufgenommen und für 25-45 min in einem Erlenmeyerkolben auf einem Magnetrührer gerührt. Danach wurde die Lösung durch ein Sieb filtriert und 10 ml Medium zugegeben und abzentrifugiert (900 rpm, 3', RT). Das Pellet wurde in ca. 3 ml Medium aufgenommen und auf 100-mm Kulturschalen mit 10 ml Medium ausplattiert ( $2 \times 10^6$  Zellen/100-mm Kulturschale) und 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurde das Medium gewechselt, um Trümmer, Erythrocyten und nicht adhärenzte zelluläre Aggregate zu entfernen. Die Feederzellen wurden für weitere 1-2 Tage kultiviert. Nun wurden die Feederzellen 1:2 bis 1:3

umgesetzt und weitere 1-3 Tage kultiviert. Die Zellen von Passage 2-4 sind am besten geeignet als Feederzellen für die Stammzellkultur. Zur Inaktivierung der Feederzellen wurden diese mit MC-Puffer für 2-3 h inkubiert. Anschließend sind die Zellen 2-3 mal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und replattiert worden. Feederzellen, die einen Tag zuvor präpariert wurden, sind optimal für die ES-Zellkultur.

Medium für Feederzellen:	10 % (v/v)	FCS
	1 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol (0,1 mM)
	5 ml	NEAA (0,2 mM Non-Essential Amino Acids)
	5 ml	L-Glutamin (2 mM)
	add 500 ml DMEM	

MC-Puffer: 2 mg Mitomycin C add 10 ml PBS

Diese Stocklösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt. Von dieser Stocklösung wurden 300  $\mu$ l in 6 ml PBS (Endkonzentration 0,01 mg/ml) aufgenommen und dann für die Inaktivierung der Feederzellen benutzt.

### ***5.2.3.1.7 Konservierung von Säugerzellen***

Auch Säugerzellen können über einen längeren Zeitraum konserviert werden. Dazu wurden die Zellen in einem Gemisch aus Serum (je nach Zelltyp HS bzw. FCS) und 10 % DMSO resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen überführt und anschließend langsam eingefroren. Dabei wurden die Zellen zunächst ÜN bei -20°C eingefroren. Danach wurden sie bei -80°C oder für längere Zeiträume in flüssigen Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen der Zellen wurde darauf geachtet, dass der Auftauvorgang rasch erfolgte. Dafür wurden die gefrorenen Zellen in vorgewärmtes Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und die Zellen wurden ausplattiert.

### **5.2.3.1.8 Transfektion von Säugerzellen mit DNA**

Zur Transfektion von Säugerzellen mit Plasmid-DNA wurde die Nukleofektor™-Technologie der Firma Amaxa Biosystems eingesetzt. Diese Technologie beruht auf der Methode der Elektroporation, wobei unter einem Elektropuls und optimierten Puffersubstanzen die Aufnahme der DNA direkt in den Zellkern ermöglicht wird. Für die Transfektion wurden HL60-Zellen verwendet. Es wurden jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen pro Transfektion eingesetzt. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l Transfektionspuffer (Nukleofektor™ Solution V), dem zuvor 5  $\mu$ g Plasmid-DNA zugesetzt wurde, aufgenommen und in eine Küvette überführt. Die Küvette wurde in das Nukleofektor-Gerät gestellt und das entsprechende Programm (T-19) gestartet. Dann wurden die Zellen unverzüglich in 1,5 ml vorgewärmtes Medium aufgenommen und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **5.2.3.1.9 Inhibition des Proteasoms in Säugerzellen**

Transfizierte HL60-Zellen wurden zunächst 24 h im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurden 50  $\mu$ M des Inhibitors MG132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) zu den Zellen gegeben und weitere 90 Minuten inkubiert. Als Kontrolle dienten transfizierte Zellen, die mit der gleichen Menge DMSO behandelt wurden, denn das Lösemittel für den Inhibitor war DMSO und man musste sicher gehen, dass die Effekte, die man nach der Behandlung sah, nicht vom Lösemittel stammten. Desweiteren wurden auch nichttransfizierte Zellen, die ebenfalls mit Inhibitor und DMSO behandelt wurden, als Kontrollen verwendet, um den Effekt auf die Inhibitorbehandlung zurückschließen zu können und nicht auf eventuelle Artefakte der Transfektion. Anschließend wurden die Zellen geerntet und einmal in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 50  $\mu$ l reduzierenden SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C gekocht. Die durch genomische DNA zähflüssige Probe wurde auf RT abgekühlt und mit 1  $\mu$ l Benzonase (25 U/ $\mu$ l) für 30 Minuten bei RT behandelt. Durch diese Behandlung wurde die DNA abgebaut und die Probe ließ sich dann ohne Probleme pipettieren, was für das Auftragen auf das SDS-PAGE von großer Bedeutung war. Der Nachweis der UDP-GlcNAc 2-Epimerase/ManNAc Kinase und des Ubiquitins erfolgte im Immunoblot.

#### **5.2.3.1.10 *Auslösen oxidativen Stress in Säugerzellen***

Oxidativer Stress kann in Zellen durch Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelöst werden. Es wurde zunächst ebenso verfahren, wie bei der Proteasominhibition (vorherige Seite). Der Unterschied bestand darin, dass anstelle des Inhibitors MG132 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min zu den Zellen gegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen geerntet und wie oben beschrieben verfahren.

#### **5.2.3.1.11 *Durchflußcytometrie/FACS (fluorescence-activated cell scanning)***

Um die Präsentation bestimmter Antigene auf der Oberfläche von Zellen zu analysieren, wurde die sogenannte FACS-Analyse verwendet. Dabei wurden Zellen mit einem Antikörper, der gegen das Antigen gerichtet ist, inkubiert. Dieser Antikörper war entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert oder mußte zusätzlich mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubiert werden. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff in einem Durchflußcytometer mit einem Laser angeregt und die abgegebene Strahlung analysiert. Das verwendete FACS-Gerät stammte von der Firma BD Biosciences Immunocytometry Systems und besaß einen Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Theoretisch hätten drei verschiedene Fluorochrome gleichzeitig verwendet werden können, da das Gerät über drei Emissionskanäle verfügt. Alle drei Fluorochrome müssen jedoch im Bereich der Anregungswellenlänge von 488 nm liegen und ihre Emission darf sich dabei nicht überlappen. In dieser Arbeit wurde jedoch nur mit einem Fluorochrom (FITC) gearbeitet. Außerdem können in einem Durchflußcytometer weitere Daten über die Zellen gesammelt werden. Die vereinzelt Zelle muß eine Meßzelle passieren in der sie von dem Laser angestrahlt wird. Die Zelle verursacht eine charakteristische Streuung des Lichts und lässt so Aussagen über Größe und Granularität der Zelle zu. Die Analyse wurde an noch lebenden Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst geerntet und in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und pro Analyse wurden  $5 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Diese wurden in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Nun wurden die Zellen mit 5-10 µg des primären Antikörpers für mindestens 45 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit je 1 ml FACS-Puffer gewaschen und weitere 45 Minuten auf Eis und im Dunkeln mit dem

sekundären Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und zum Schluß wieder in 500 µl FACS-Puffer (BD FACSFlo<sup>TM</sup>) aufgenommen und am FACS-Gerät analysiert.

#### **5.2.3.1.12 Alkalische Phosphatase Assay**

In ES-Zellen ist die alkalische Phosphatase sehr aktiv (Ginsburg et al., 1990, Resnick et al., 1992). Ihre Expression ist eines von vielen Merkmalen pluripotenter ES-Zellen. Sie kann mit einem einfachen Farbttest sichtbar gemacht werden. Dazu wurden die adhärenen ES-Zellen mit 4 % PFA für 20 min bei RT fixiert und anschließend 3 mal 10 mit Tris-Maleat-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen 15-20 Minuten mit der Färbelösung inkubiert. Diese wurde danach abgesaugt und die Zellen mit Wasser gespült. Anschließend konnten die gefärbten Zellen unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Tris-Maleat-Puffer:	1,8 g Tris add 500 ml H <sub>2</sub> O bidest., pH 9,0 (mit Maleinsäure eingestellt)
Färbelösung:	12 ml Tris-Maleat-Puffer
	96 µl MgCl <sub>2</sub> (10% ig)
	4,8 mg Naphthol AS-MX Phosphat (Sigma)
	12 mg Fast Red TR Salz (Sigma)

#### **5.2.3.1.13 Proliferationsassay**

Dieser Assay beruht auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) in die DNA sich teilender Zellen. Bei diesem kolorimetrischen Test wird eingebautes BrdU über einen Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper mittels eines ELISA-Readers detektiert und quantifiziert. Der BrdU-Cell-Proliferation-ELISA-Assay wurde von der Firma Roche bezogen und nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 96-well-Mikrotiterplatten verwendet. Diese wurden einen Tag zuvor mit 0,1 % Gelatine ÜN bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden die wells mit PBS gewaschen und je well wurden 10000 Zellen in 100 µl Medium ausplattiert. Die Zellen wurden ÜN bei 37°C

und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, damit sie adhäreren konnten. Dann wurde das BrdU (Endkonzentration 10 µM) zugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Danach wurden die Platten ausgeschlagen und entweder mit je 200 µl pro well FixDenat für 30 min bei RT inkubiert oder der Assay wurde an dieser Stelle unterbrochen, indem die Zellen getrocknet wurden und dann im Kühlschrank für ca. 1 Woche aufbewahrt werden konnten. Wurde der Assay nicht unterbrochen, so wurde nach dem Fixieren die Lösung wieder ausgeschlagen und es wurden je 100 µl pro well Anti-BrdU-Peroxidase (10 µl/ml) zugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Die Platte wurde erneut ausgeschlagen und 3 mal mit je 100 µl pro well 1fach Waschpuffer gewaschen. Danach wurde je 100 µl pro well Substratlösung (Tetramethylbenzidin) zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Die Messung erfolgte dann bei 405 nm im ELISA-Reader. Es wurden jeweils 8 wells für jeden Versuchsansatz zur Auswertung herangezogen und aus ihnen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Als Negativkontrollen dienten wells ohne Zellen bzw. wells mit Zellen aber ohne BrdU.

### **5.2.3.2 Zellbiologische Methoden für Insektenzellen**

#### ***5.2.3.2.1 Kultivierung von Insektenzellen***

Insektenzellen wurden bei 27°C als Suspensionskultur im Schüttelinkubator (115 rpm; Multitron; Infors, Schweiz) oder adhärent als Monolayer im Brutschrank (Heraeus, Deutschland) kultiviert.

Sf9-Zellen:	Sf-900 II Medium (GibcoBRL, USA)
	10 ml/l 200 mM Glutamin (GibcoBRL, USA)
	50 ml/l FCS (GibcoBRL, USA)
Sf-900-Zellen:	Sf-900 II Medium
	10 ml/l 200 mM Glutamin

#### **5.2.3.2.2 Konservierung von Insektenzellen**

Insektenzellen können in flüssigem Stickstoff eingefroren und so für Jahre gelagert werden. Dafür werden Zellen als Suspension oder Monolayer angezogen, 5 min bei 900 rpm (Megafuge 1.0, Heraeus) abzentrifugiert und mit einer Dichte von mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 90% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wird mit  $1^\circ\text{C}$  pro min langsam auf  $-80^\circ\text{C}$  abgekühlt und die Zellen anschließend zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und in Medium resuspendiert werden. Aufgetaute Zellen werden zunächst adhären kultiviert. Nach 4-6 h und nach weiteren 24 h erfolgt ein Mediumwechsel, um tote Zellen zu entfernen.

#### **5.2.3.2.3 Überexpression rekombinanter Proteine in Insektenzellen mit dem Baculovirus-System**

Das Baculovirus-Genexpressions-System hat den Vorteil, dass durch hohe Transfektionsraten hohe Ausbeuten an biologisch aktiven rekombinanten Proteinen gewonnen werden können. Baculoviren sind eine Familie von DNA-Viren, die ausschließlich Invertebraten und bevorzugt Insekten infizieren. Während der Infektion produzieren sie ihr Hüllprotein, Polyhedrin, in außergewöhnlich großen Mengen. Das zu exprimierende Gen wird durch den Polyhedrinpromoter reguliert. Die Produktion startet 3 bis 4 Tage nach der Infektion und dauert 4 bis 5 Tage an, bis die befallenen Zellen lysieren.

Bei dem BAC-TO-BAC<sup>®</sup>-Baculovirus-Expressionssystem wird das Fremdgen (Insert) in den Transfer-Vektor kloniert und beinhaltet flankierende Sequenzen, welche homolog zu dem Baculovirus-Genom sind. Innerhalb der Zellen findet die Rekombination zwischen den homologen Bereichen statt. Rekombinante Viren produzieren rekombinantes Protein. Es werden weitere Zellen infiziert, daraus resultieren weitere rekombinante Viren. Die Überexpression von rekombinantem Protein erfolgt dabei nach den Anweisungen des Herstellers (GibcoBRL, USA).

In dieser Arbeit wurden die Bacmid-DNA und die rekombinanten Viren nicht selber hergestellt. Da in der Arbeitsgruppe die Herstellung rekombinanter Viren eine gängige Methode ist und auch andere Kollegen mit diesen Viren arbeiteten, wurden

mir die Viren zur Infektion der Insektenzellen freundlicherweise von Ulrike Lisewski bzw. PD Dr. Stephan Hinderlich zur Verfügung gestellt. Die Expressionen wurde unter den ermittelten Bedingungen für eine optimale Proteinausbeute durchgeführt. Insektenzellen wurden bei einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml mit jeweils entsprechenden Volumina Erststock infiziert und unter Schütteln bei 27 °C inkubiert. Nach 48 h wurden die Insektenzellen durch Zentrifugieren 5 min bei 900 rpm (Megafuge 1.0) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer pro 10 ml Insektenzellsuspensionskultur resuspendiert und mittels Ultraschall oder french-Press aufgeschlossen. Zelltrümmer und unlösliche Komponenten wurden im Anschluß bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde abgenommen und für die beschriebenen Experimente eingesetzt.

Lysepuffer:	10 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) pH 7,5
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT (frisch zugegeben)
	1 mM	PMSF (frisch zugegeben)

### 5.2.3.3 Mikrobiologische Methoden für Bakterienzellen

#### 5.2.3.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E.coli*-Stämmen erfolgte in LB-Medium mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums entweder in Flüssigkultur oder auf Agarplatten bei 37°C. Die Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben bzw. Schikanen 1:100 von einer ÜN-Kultur angeimpft. Zur Herstellung einer ÜN-Kultur wurde einen Abend zuvor in 3-4 ml LB-Medium eine einzelne Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt (220 rpm). Bei den Flüssigkulturen wurden Erlenmeyerkolben bzw. Schikanen verwendet, die das 3-5fache Volumen der Flüssigkultur fassen konnten, damit eine ausreichende Belüftung und somit ausreichende Sauerstoffversorgung während der Inkubation der Bakterienkultur gewährleistet war.

Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium:	10 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest.

LB-Agar: wie Flüssigmedium mit 15 g Agar

### **5.2.3.3.2 Konservierung von Bakterien**

Bakterienkolonien können auf Agarplatten bei 4°C für ca. 6 Wochen gelagert werden. Für eine längerfristige Konservierung der Bakterien wurden sogenannte Glycerolstocks angefertigt. Dazu wurde eine ÜN-Kultur mit 20-50% sterilem Glycerin (v/v) versetzt, gut gemischt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### **5.2.3.3.3 Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989)**

Die Transformation von Bakterienzellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Hitzeschock-Methode von Sambrook et al. Es wurden hierfür 50 µl kompetente Zellen (OneShot®TOP10) langsam auf Eis aufgetaut und mit dem halben oder ganzen Ligationansatz bzw. 0,1-0,5 µg Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann folgte der Hitzeschock für 30-45 sec bei 42°C. Nachdem der Ansatz auf Eis wieder abgekühlt war, wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt (225 rpm). Dann wurden 10-100 µl des Transformationsansatzes auf Selektionsplatten (LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

## **5.2.4 Identifizierung interagierender Proteine mittels des Yeast Two Hybrid-Systems**

Das Yeast Two Hybrid-Screening wurde in Zusammenarbeit mit U. Stelzl von der Arbeitsgruppe Prof. E. Wanker (MDC, Berlin) durchgeführt. Die großtechnische und systematische Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen basiert auf der Interaktionspaarung in einem Matrixformat. Dabei werden zwei verschiedene haploide Hefestämme vom entgegengesetzten Paarungstyp (MAT $\alpha$  und MATa) mit einem AD (activation domain)-Fusionsprotein und DB (DNA binding domain)-

Fusionsprotein transformiert und anschließend gepaart. Interaktionen der Proteine werden dann durch die Aktivierung von drei transkriptionellen Reportern detektiert. In der Arbeitsgruppe Wanker wurde ein Satz von mehr als 3600 cDNAs einer humanen fetale brain library und zusätzlich 2000 full length ORFs in DB- und AD-Vektoren subkloniert. Es existieren in der Arbeitsgruppe die Möglichkeiten zum vollautomatischen Screening einer Protein-Protein Interaktionsmatrix von ca. 5600 humanen Proteinen.

Die LexA DNA binding domain Fusionsproteine (“baits”) wurden in dem Hefestamm L40ccua [*MATa*] und die activation domain Fusionsproteine (“preys”) wurden in dem Hefestamm L40ccα [*MATα*] exprimiert. L40ccα Klone wurden mit L40ccua Klone gemischt und für die Interaktionspaarung 24 h auf YPD Agarplatten für 24 h bei 30°C wachsen gelassen. Die Zellen wurden dann auf SDII Agarplatten (Minimalmedium, dem tryptophan und leucine fehlen) transferiert und die diploiden Zellen wurden für weitere 72 h bei 30°C wachsen gelassen. Für die Selektion der Interaktionen wurden die diploiden Zellen auf SDIV Agarplatten (Minimalmedium, dem tryptophan, leucine, histidine und uracil fehlen) transferiert und mit und ohne Nylonmembranen inkubiert für 5 Tage bei 30°C. Für die Identifizierung der Protein-Protein Interaktionen wurde die Aktivität der (*lexAop*)<sub>4</sub>-*HIS3* und (*lexAop*)<sub>8</sub>-*URA3* Reportergene mittels Wachstum auf SDVI detektiert. Die Nylonmembranen wurden für einen β-GAL-Assay verwendet, der die simultane Überprüfung der (*lexAop*)<sub>4</sub>-*HIS3*, (*lexAop*)<sub>8</sub>-*URA3* und (*lexAop*)<sub>8</sub>-*lacZ* Reporter ermöglicht.

## 5.2.5 Biochemische Methoden

### 5.2.5.1 Aufarbeitung von Säugerzelllysaten

Die Zellen wurden geerntet (900 rpm, 3 min) und einmal in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte dann mittels Ultraschall (2-3 mal 20 Impulse). Bei einer Behandlung der Zellen mit Ultraschall werden nicht nur die Zellmembran sondern auch die Kernmembran kaputt gemacht, so daß im Lysat nicht nur cytosolische Proteine sondern auch Kernproteine vorhanden sind. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand für weitere Analysen verwendet.

Lösungen zur Aufarbeitung von Zelllysaten

PBS (Phosphate buffered Saline)

Lysepuffer: PBS (+ 1 mM PMSF, + 1:500 PIC, +10 µg/mlRNAse/DNAse  
Endkonzentration)

### 5.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Da in den Probelösungen keine Detergenzien vorhanden waren, eignete sich die Methode nach Bradford, die durch Pufferchemikalien und reduzierende Stoffe kaum gestört wird, sehr gut zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Probelösung. Die Methode beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brillant-Blue G250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn diese in saurer Lösung an Proteine (hauptsächlich Arginin-Reste) bindet. Der Farbkomplex ist längere Zeit stabil. Die Probelösung kann 10 bis 100 µg Protein enthalten. Die Probe wurde auf 1 ml Bradford-Reagenz aufgefüllt und gut gemischt. Dann wurde die Absorption nach 5 min RT bei 595 nm bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration mußte ebenfalls eine Eichkurve aufgenommen werden. Dazu wurde ein Serumalbumin-Standard (BSA) verwendet, mit dem in dem Bereich von 10 bis 250 µg eine Eichkurve aufgenommen wurde. Da im Bereich bis 50 µg die Eichkurve linear verläuft, konnte für jede Charge Bradford-Reagenz ein Faktor bestimmt werden, so dass die Eichkurve nur in größeren Abständen aufgenommen werden mußte.

Bradford-Reagenz:	100 mg	Coomassie-Brillant-Blue
	50 ml	EtOH
	100 ml	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> konz.
	ad 1 l H <sub>2</sub> O (Lösung vor Gebrauch filtrieren)	

### 5.2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist ein Trennverfahren, bei dem geladene, von einer idealen Kugel- oder Stäbchenform mehr oder minder abweichende, verformbare, mehr oder minder hydrophobe Partikel von einem elektrischen Feld durch eine Matrix aus einem hydrophilen synthetischen Polymer gerichtet bewegt werden. Die wandernden Proteine oder andere Biomakromoleküle

sind von den Ionen des Puffersystems umgeben und meist mit einem ionischen denaturierenden Detergenz wie SDS beladen. Durch das Beladen der Proteine mit SDS erhält das Proteinmolekül eine stark negative Ladung und die eigene Ladung des Proteins tritt in den Hintergrund. Die elektrophoretische Beweglichkeit dieser Moleküle ist jedoch nur in erster Näherung der Molmasse proportional. Dies ist aber für die meisten Analysen ausreichend genau. Je nach Zusammensetzung des Polyacrylamidgels (z.B.: 7.5, 10 oder 12.5 %ige Gele) kann man eine bessere Auftrennung von großen oder kleineren Proteinen erzielen. Für die in dieser Arbeit durchgeführte vertikale Elektrophorese von Proteinen wurde das Mini-Protean-System II der Firma Biorad verwendet. Es kamen diskontinuierliche Gelsysteme mit Sammelgel und Trenngel zum Einsatz. Zunächst wurden die Lösungen für das Trenngel gemischt und in die Gelapparatur gegossen. Nach der Polymerisation des Trenngels wurden die Lösungen für das Sammelgel gemischt und auf das Trenngel gegossen, in das dann der Kamm eingesetzt wurde. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Gelapparatur endgültig zusammengebaut und mit Laufpuffer gefüllt. Die SDS-PAGE wurde unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden die Proteinproben mit 5fachem reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C gekocht. Zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde eine Spannung von 40-50 V angelegt. Für das Auftrennen der Proteine im Trenngel wurde die Spannung auf 10-15 V/cm Trenngellänge erhöht.

Lösungen für die SDS-Page

Lösung A:	30%	Acrylamid (w/v)
	0,8%	N,N'Methylenbisacrylamid (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
10fach Laufpuffer:	0,25 M	Tris, pH 8,8 (kein HCl zum Titrieren)
	1,92 M	Glycin
	1%	SDS (w/v)

5fach Probenpuffer:	12,5%	SDS (w/v)
	0,3 M	Tris-HCl, pH 6,8
	50%	Glycerin (v/v)
	0,015%	Bromphenolblau (w/v)

Zusammensetzung der Trenngele (ausreichend für 2 Trenngele)

Bsp.: 7,5%iges Gel	2,25 ml	Lösung A
	2,25 ml	Lösung B
	4,5 ml	H <sub>2</sub> O
	45 µl	APS
	4,5 µl	TEMED

Zusammensetzung der 4%igen Sammelgele (ausreichend für 2 Sammelgele)

0,4 ml	Lösung A
0,75 ml	Lösung C
1,85 ml	H <sub>2</sub> O
12 µl	APS
3 µl	TEMED

#### 5.2.5.4 Coomassie-Blau-Färbung

Proteine lassen sich im Gel mit Coomassie-Blau G250 (*Coomassie brilliant blue* CBB). Die Empfindlichkeit der Färbung ist nur mäßig: die untere Detektionsgröße liegt bei 200-400 ng pro Proteinbande. In erster Näherung kann man bei der CBB-Färbung davon ausgehen, dass die Signalintensität für alle Proteinspezies auf die gleiche Weise mit der Proteinmenge korreliert und man entsprechende Färbeverfahren daher für eine Quantifizierung heranziehen kann. 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 %	Ethanol (v/v)
	10 %	Essigsäure (v/v)
	1 %	Serva Brilliant Blue G-250 (w/v)
Entfärbelösung:	5 %	Ethanol (v/v)
	7,5 %	Essigsäure (v/v)

### 5.2.5.5 Elektrotransfer von Proteinen (Towbin 1979, Burnette 1981)

Der Elektrotransfer von Proteinen dient der Übertragung elektrophoretisch aufgetrennter Proteinspezies auf proteinbindende Oberflächen, auf denen diese Proteine für Reaktionen mit Makromolekülen leicht zugänglich sind. Als proteinbindende Membran wurde eine Nitrocellulosemembran verwendet. Der Transfer wurde nach dem sogenannten "semi-dry"-Verfahren in einer Blotapparatur der Firma Biorad durchgeführt. Dabei wurde der Blot so zusammengebaut, daß das Gel und die Membran so ausgerichtet waren, daß die Nitrocellulosemembran in Richtung der Anode angeordnet war. Die Apparatur wurde mit Transferpuffer gefüllt und der Transfer erfolgt bei 4°C und einer konstanten Stromstärke von 250 mA für eine Stunde. Durch Färbung der Proteine auf der Nitrocellulosemembran mit einer Lösung, die den Farbstoff Ponceau-Rot enthält, kann der Transfer überprüft werden. Dazu wurde die Membran für ca. 1 min in die Ponceau-Lösung gelegt und anschließend in 1%iger Essiglösung gewaschen, damit die Proteinbanden sichtbar wurden. Zum Entfärben der Membran wurde diese in TBS-Tween so lange eingelegt, bis der Farbstoff von der Membran gewaschen war.

#### Lösungen für Western blot

Transferpuffer:	150 mM	Glycin
	20 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	10%	Methanol (v/v)
Ponceau-Lösung:	2%	Ponceau-Rot (w/v)
	30%	TCA
	30%	Sulfosalicylsäure (w/v)
	vor Gebrauch 1:4 mit H <sub>2</sub> O bidest. verdünnen	
Ponceau-Entfärbelösung:	1%	Essigsäure (v/v)
Waschpuffer		
TBS-Tween:	140 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	0,05%	Tween 20 (v/v)

### 5.2.5.6 Immunchemischer Antigennachweis nach Elektrotransfer

Der immunchemische Nachweis eines transferierten Antigens kann in einem oder zwei Schritten erfolgen, je nachdem, ob der mit einem Indikatorenzym gekoppelte Antikörper direkt oder über einen primären antigen-spezifischen Antikörper mit dem Antigen reagiert. Nach dem Western blot und dem Entfärben der Blotmembran wurde die Nitrocellulosemembran für ca. eine Stunde bei RT in ausreichend Blockpuffer geschüttelt, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blocken. Je nach verwendetem Antikörper und den Herstellerangaben des Antikörpers wurde zum Blockieren der Membran Magermilchpulver oder Rinderserum-Albumin (BSA) verwendet. Alle anschließenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen in TBS-Tween. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (in der dem Titer der Antikörperlösung entsprechenden Verdünnung) erfolgte bei 4°C ÜN. Darauf folgten mindestens 3 Waschschrte á 10 min bei RT. Darauf wurde die Membran mit dem sekundären POD-gekoppelten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung für mindestens 1 h bei RT inkubiert. Nach gründlichem Waschen kann der Blot anschließend mit Luminol entwickelt werden.

Lösungen für den Immunoblot

Blockpuffer: 5-10% Magermilchpulver (w/v) oder 3% BSA (w/v) in TBS-Tween

Wasch- und Inkubationspuffer: TBS-Tween s. Lösungen für Western blot

#### 5.2.5.6.1 Detektion von Meerrettich-Peroxidase (POD)

Die Blotmembran wird kurz mit Whatmanpapier getrocknet und dann mit einer Mischung aus 10 µl Lösung A, 1 ml Lösung B und 3 µl Lösung C für ca. 1 min inkubiert. Die Membran wird dann in eine Folie gewickelt und die Signale mit dem digitalen Imaging-System von Fuji sichtbar gemacht.

Lösungen für die POD-Reaktion

Lösung A: 6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO

Lösung B: 1,25 mM Luminol in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

Lösung C: 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v)

### 5.2.5.7 Reinigung überexprimierter poly-Histidin-markierter Fusionsproteine

Die Überexpression erfolgte in Insektenzellen mittels des Baculovirus-Systems. Die Zellen wurden wie schon beschrieben mittels Frech-Press (0,5 bar) aufgeschlossen und abzentrifugiert. Das Cytosol wurde für die Aufreinigung des Fusionsproteins weiterverwendet. Die chromatographische Aufreinigung erfolgte über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose von Qiagen, die zuvor mit 5 × 1 Säulenvolumen Waschpuffer äquilibriert wurde. Die sechs Histidine am N-Terminus der überexprimierten Fusionsproteine können immobilisierte zweiwertige Kationen komplexieren. Zweiseitige Nickelionen können durch Kopplung von Nitrilotriessigsäure (NTA), eines 4-zähligen Liganden, an die Agarose-Matrix komplexiert werden. Nickel besitzt insgesamt 6 Ligandenbindungsstellen, so können die verbleibenden zwei Bindungsstellen durch die hochaffine Bindung von zwei Histidinen besetzt werden. Gebundene Proteine können mit Imidazol eluiert werden. Imidazol ist dem Histidin strukturell ähnlich, besitzt aber keine Seitenkette. Aufgrund der ähnlichen Struktur und höheren Affinität kompetiert Imidazol mit Histidin um die Ni<sup>2+</sup>-Bindungsstellen und verdrängt die Histidine, wodurch die Proteine eluiert werden. Es wurde dann also das Cytosol auf die äquilibrierte Säule gegeben und mindestens 1 h drehend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen bis kein Protein mehr nachweisbar war. Dazu wurden in bestimmten Abständen Aliquots (1 Tropfen) in 500 µl Bradfordreagenz tropfen gelassen. Die Blaufärbung und damit der Proteinnachweis zeigten an, dass noch weitergewaschen werden mußte. Erst wenn keine Blaufärbung mehr zu sehen war, war der Waschschrift beendet. Dann erfolgte die Elution des Proteins mit 2 ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde in Fraktionen á 3 Tropfen gesammelt. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde ebenfalls mittels Bradfordreagenz bestimmt (10 µl der Fraktion auf 500 µl Bradfordreagenz). Die Fraktionen, die Protein enthielten wurden gepoolt und weiterverwendet.

Waschpuffer:	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8,0
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
Elutionspuffer:	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8,0
	300 mM	NaCl
	200 mM	Imidazol

### **5.2.5.8 Umpuffern von Proteinlösung mittels Gelfiltration**

Da das gereinigte Protein in einem Puffer mit viel Imidazol vorlag und dieses weitere Reaktionen stören kann, wurde das Protein umpuffert. Dazu wurde eine Gelfiltration mittels einer PD10-Säule (Sephadex™G-25M) durchgeführt, um niedermolekulare Substanzen abzutrennen. Die Säule wurde mit 10-15 ml des Puffers, in den das Protein umpuffert werden sollte, äquilibriert. Dann wurde die Proteinlösung auf die Säule gegeben (max. 2 ml) und wieder mit Puffer (2-3 ml) eluiert. Das umpufferte Protein wurde in Fraktionen á 4-5 Tropfen gesammelt. Mittels Bradford wurden die proteinhaltigen Fraktionen bestimmt und gepoolt. Zur Kopplung des gereinigten Proteins an CNBr-aktivierte Sepharose wurde das Protein in Kopplungspuffer umpuffert.

### **5.2.5.9 Kopplung von gereinigtem Protein an CNBr-aktivierte Sepharose**

Über primäre Aminogruppen können Proteine mit der CNBr-aktivierten Sepharose eine kovalente Bindung eingehen. Für die Kopplung von Protein an CNBr-aktivierte Sepharose muß die Proteinlösung in Kopplungspuffer vorliegen. Zunächst wurde die Sepharose vorbereitet, indem 0,3 mg Sepharose-Puder abgewogen wurden und in 1 ml 1 mM HCl quellen gelassen wurde. Anschließend wurde die Sepharose mit ca. 180 ml 1 mM HCl in einem gesinterten Glasfilter gewaschen und zum Schluß trocken gesaugt. Es wurden 5-10 mg Protein pro ml Gel eingesetzt und ÜN bei 4°C drehend inkubiert. Am nächsten Tag wurde die CNBr-aktivierte Sepharose zunächst mit 5 Gelvolumen Kopplungspuffer gewaschen. Danach wurden alle verbleibenden aktiven Gruppen mit Blockierungspuffer für 2 h bei RT geblockt. Dann wurde das Produkt mit 3 Zyklen von alternierendem pH gewaschen, wobei jeweils 5 Gelvolumen Puffer eingesetzt wurden. Zuerst wurde mit einem Acetat-Puffer pH 4,0 und anschließend mit einem Tris-Puffer pH 8,0 gewaschen. Dann war die Säule zur weiteren Verwendung für die Aufreinigung des Anti-GNE-Antikörper vorbereitet.

Kopplungspuffer:	0,1 M	NaHCO <sub>3</sub> pH 8,3
	0,5 M	NaCl
Blockierungspuffer:	0,1 M	Tris-HCl pH 8,0
Waschpuffer sauer:	0,1 M	Acetat pH 4,0
	0,5 M	NaCl
Waschpuffer basisch:	0,1 M	Tris-HCl pH 8,0
	0,5 M	NaCl

### 5.2.5.10 Aufreinigung von Anti-GNE-Antikörper aus Kanninchenserum mittels Immunaffinitätschromatographie

Die Reinigung des Anti-GNE-Antikörper erfolgte mittels des an CNBr-aktivierter Sepharose gekoppelten Antigens. Die hohe Affinität des Antikörpers zum Antigen macht eine Aufreinigung des Antikörpers möglich. Das Serum wurde auf die vorbereitete CNBr-aktivierte Sepharose gegeben und für mindestens 1 h bei RT drehend inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 5 × 1 ml des basischen Waschpuffers gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte dann mit 3 ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde in Fraktionen á 500 µl gesammelt. Dabei wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen 50 µl eines Tris-Puffers vorgelegt und die Fraktionen darin aufgefangen, so daß diese sofort umgepuffert wurden. Dann erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fraktionen in einem Photometer bei 280 nm. Eine OD<sub>280</sub> von 1,33 entspricht 1 mg/ml Antikörper. Die Fraktionen mit dem meisten Antikörper wurden gepoolt. Die Säule wurde dann wieder mit dem basischen Waschpuffer gewaschen und stand zum erneuten Gebrauch zur Verfügung.

Elutionspuffer:	200 mM	Glycin pH 3,0
	300 mM	NaCl
Tris-Puffer:	1 M	Tris-HCl pH 8,0

### 5.2.5.11 Immunpräzipitation

Mittels der Immunpräzipitation (IP) lassen sich aus komplexen Proteingemischen Antigene, für die spezifische Antikörper vorliegen, für analytische Zwecke abtrennen. In dieser Arbeit erfolgte die IP der GNE aus frischen Zellysaten. Nach der

Immunpräzipitation wurde eine SDS-PAGE zur Auftrennung des interessierenden Antigens angeschlossen und danach mittels Western blot identifiziert. Für die Präzipitation wurde der Antikörper an Protein-A-Sepharose gekoppelt. Protein-A ist ein Protein der bakteriellen Zellwand (*Staphylococcus aureus*) mit hoher Affinität zur Fc-Region vieler Immunglobuline von Säugern. Nach Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an Protein-A bleibt der Fab-Teil des Antikörpers für die Bindung des Antigens zugänglich. Pro IP wurden 5 mg Protein-A-Sepharose mit 450 µg Antikörper gekoppelt. Die Protein-A-Sepharose wurde zuvor in PBS für 1 h bei 4°C drehend gequollen. Dazu wurden 100 mg Protein-A-Sepharose eingewogen und in 3 ml PBS aufgenommen. Von dieser gequollenen Protein-A-Sepharose wurden pro IP 150 µl (entspricht 5 mg) eingesetzt. Die Kopplung des Antikörpers an Protein-A erfolgte 1 h bei 4°C drehend. Für die Immunpräzipitation wurden zwischen 0,5-2 mg Protein eingesetzt und ÜN bei 4°C mit der mit Antikörper gekoppelten Protein-A-Sepharose drehend inkubiert. Das Zellysat wurde zuvor an Protein-A-Sepharose präadsorbiert, um unspezifische Bindungen an Protein-A zu vermeiden. Dazu wurde das Zellysat mit 150 µl Protein-A-Sepharose versetzt und 1 h bei 4°C drehend inkubiert. Danach wurde die Sepharose abzentrifugiert (900 rpm, 3 min) und der Überstand für die IP verwendet. Nach der Inkubation des präadsorbierten Lysats mit der Antikörper gekoppelten Sepharose wurde diese erneut abzentrifugiert (900 rpm, 3 min) und mindestens 3 mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Zum Schluß wurde das Pellet in 50 µl reduzierendem SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C gekocht. Somit war die Probe fertig für die Auftrennung im SDS-PAGE und die Analyse im Western blot.

Lösungen für die Immunpräzipitation

Waschpuffer: PBS (s. Aufarbeitung von Zellysaten)

Lysepuffer: s. Aufarbeitung von Zellysaten

### **5.2.5.12 GST-pull down-Assay**

Mit diesem Assay kann man Proteine, die mit dem GST-Fusionsprotein interagieren, aus einer komplexen Proteinlösung präzipitieren. Hierfür wurden das GST-Fusionsprotein (in unserem Falle GST-PLZF) und das interagierende Proteine (His-GNE) zusammen in Sf900 Zellen exprimiert. Dann wurden die Zellen geerntet (1000

rpm, 5 min) und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach dem Abzentrifugieren (13000 rpm, 10 min, 4°C) wurde der Überstand für den pull-down verwendet. Dazu wurde zunächst die GST-Sepharose 3 mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Pro pull-down wurden 20 µl GST-Sepharose verwendet. Die Sepharose wurde dann mit dem Zellysat für 1 h bei RT drehend inkubiert. Anschließend wurde sie abzentrifugiert (900 rpm, 3 min) und mindestens 3 mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Zum Schluß wurde das Pellet in 50 µl reduzierendem SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Diese Proben waren dann bereit für die Auftrennung in der SDS-PAGE und für die Analyse im Western blot.

#### **5.2.5.13 GNE-Aktivitätsassay (Zeitler 1992)**

Mit Hilfe dieses Assays konnte die Enzymaktivität der GNE bestimmt werden. Die Methode basiert darauf, dass die GNE radioaktiv markiertes <sup>14</sup>C-UDP-GlcNAc genauso effizient in ManNAc und ManNAc-6-Phosphat umsetzt wie nicht markiertes, natürlich vorkommendes UDP-GlcNAc. Nach der Enzymreaktion wurden die Komponenten mittels Papierchromatographie aufgetrennt und die Radioaktivität in einem Scintillator gemessen. Pro Enzymreaktion wurden 200 µg Protein aus Zellysat eingesetzt. Diese wurden auf 80 µl mit Lysepuffer aufgefüllt. Zu dieser Proteinlösung wurde dann 35 µl einer 225 mM Na-P-Lösung und 20 µl einer 50 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung gegeben und für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Papierstreifen (3 mm Whatman-Papier) aufgetragen und ÜN mit dem Lösungsmittel (70 % 1-Propanol, 20 % H<sub>2</sub>O, 10 % NaAc pH 5,0) chromatographisch getrennt. Am nächsten Tag wurden die Papierstreifen in 2,5 cm Abschnitte zerschnitten und die Radioaktivität in 5 ml Scintillationsflüssigkeit in einem Flüssigkeitsscintillator gemessen.

#### **5.2.5.14 Resorcinol-Assay zur Bestimmung des Sialinsäuregehalts (Jourdian et al. 1971)**

Für den Assay wurden mindestens  $2 \times 10^6$  Zellen pro Versuchsansatz verwendet. Die Zellen wurden zuerst gründlich mit PBS gewaschen und dann in 250 µl PBS aufgenommen. Die Zellextrakte wurden durch wiederholtes Einfrieren (bei -80°C

oder in Flüssigstickstoff) und Auftauen hergestellt. Dann folgte ein Oxidationsschritt bei dem 5 µl einer 0,4 M Perjodsäure zu jeder Probe zugegeben wurde. Das ganze wurde gut durch Vortexen gemischt. Um den Gesamtsialinsäuregehalt zu bestimmen wurden die Proben für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Um die Glycokonjugat-gebundenen Sialinsäuren zu bestimmen und damit auch umgekehrt die freien Sialinsäuren mussten die Proben bei 37°C für mindestens 1,5 h inkubiert werden. Praktischerweise wurden die Proben zuvor aufgeteilt, so dass ein Teil zur Bestimmung des Gesamtsialinsäuregehalts verwendet wurde und der andere Teil zur Bestimmung der Glycokonjugat-gebundenen (und somit auch umgekehrt der freien) Sialinsäuren. Nach der Oxidation wurden jeweils 500 µl eines Resorcinol/CuSO<sub>4</sub>/HCl-Gemisches zugegeben und durch Vortexen gemischt. Die Proben wurden dann für exakt 15 min bei 100°C inkubiert. Danach wurden die Proben bei RT etwas abgekühlt und es wurden jeweils 500 µl tert-Butyl-Alkohol zugegeben und gemischt. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und die OD bei 630 nm bestimmt. Zur Bestimmung des Sialinsäuregehalts in den Proben wurde mit jeder Messung parallel eine Standardkurve ermittelt. Es wurden immer Doppel- oder Dreifachwerte bestimmt und aus ihnen der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Resorcinol/CuSO <sub>4</sub> /HCl-Gemisch:	10 %	6%iges Resorcinol (v/v)	2
ml			
(ausreichend für 36 Proben)	10 %	2,5 mM CuSO <sub>4</sub> (v/v)	2
ml			
	36 %	H <sub>2</sub> O (v/v)	7,2
ml			
	44 %	konz. HCl (v/v)	8,8
ml			