

6. Material und Methoden

Allgemeine methodische Details zu den durchgeführten Untersuchungen

Zellkultur und Zelllinien

Die humanen HL-Zelllinien L1236¹⁵⁴, HDLM2¹⁵⁵, KM-H2¹⁵⁶, L428¹⁵⁷, L540¹⁵⁸; die ALCL-Zelllinien Karpas 299¹⁵⁹ und JB6¹⁶⁰; die Cervixkarzinomzelllinie HeLa, die Teratokarzinomzelllinie Tera-2¹⁶¹ und die Colonkarzinomzelllinie Colo-320¹⁶²; sowie die humane T-Zell Leukämie Zelllinie Jurkat¹⁶³ wurden in RPMI 1640 Medium (Gibco-BRL) mit 10% (V/V) FCS und 10 µg/ml Ciprofloxacin (Ciprobay, Bayer) kultiviert. Die embryonale humane Nierenzelllinie 293 wurde in DMEM-Medium (Gibco-BRL) mit 10% (V/V) FCS und 10 µg/ml Ciprofloxacin (Ciprobay, Bayer) kultiviert. Die Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen oder waren Spenden von Dr. V. Diehl, Köln und Dr. M. Kadin, Boston (U.S.A.).

Herstellung von Zelllysaten

Hierfür wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen bei Raumtemperatur (RT) pelletiert (260 xg, 5 Min.), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml eiskaltem PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, Gibco-BRL) resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde noch ein weiteres mal wiederholt und nach dem zweiten Waschschrift das PBS vorsichtig von den Zellen abgenommen. Danach wurde 1 ml eiskalter RIPA-Puffer [PBS, 1% (V/V) Nonidet P-40, 0,5% (m/V) Natriumdeoxycholat, 0,1% (m/V) SDS] mit 1 mM frisch zugesetztem COMPLETE-Proteinaseinhibitormix (Roche) zugegeben, vorsichtig mit einer Pipette das Pellet resuspendiert und auf Eis 30 Min. inkubiert. Durch mehrfaches Aufziehen durch eine 21 gauge Nadel wurde das Zelllysate homogenisiert und weitere 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde Zelldebris bei 10000 xg und 4°C 10 Min. abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein frisches Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis oder für die spätere Verwendung bei -80°C gelagert.

RNA-Präparation

Alle RNA-Proben wurden mit Hilfe des S.N.A.P.-Total-RNA-Isolation-Kit (Invitrogen) gewonnen. Die Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

RT-PCR

Die Erzeugung der cDNA erfolgte nach Standard-Methode mit MuLV-Reverse-Transkriptase und Random-Primern des GeneAmp® RNA PCR Kits der Firma Perkin Elmer. Die Amplifikation wurde mit mit AmpliTaq® DNA-Polymerase im Heißstart-Verfahren in einem T3 Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt.

Klonierung und Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden nach der Gelelektrophorese mittels Gelextraktion mit QIAquick® (Qiagen) aufreingt. Nach Klonierung in den pCR®II-Topo®Vektor oder pCR®4-Topo®Vektor (Invitrogen) wurden die Konstrukte in E. coli des Top10-Stammes (Invitrogen) nach Standardmethode vermehrt. Die Präparation der Plasmide erfolgte mit Hilfe des QuantumPrep® Kits (Bio-Rad). Eine Verifikation durch Sequenzierung erfolgte in einem automatischen Sequenzierer mit der BigDye® Terminationsmethode (AbiPrism® 377 Sequenziergerät, Perkin Elmer). Zur weiteren Klonierung in andere Vektoren wurden die Produkte aus dem pCR-Vektor durch Restriktionsenzymverdau herausgetrennt, dephosphoryliert (alkalische Shrimp Phosphatase, Boehringer Mannheim) und in entsprechend vorbehandelte Zielvektoren ligiert (Rapid DNA Ligation Kit, Roche).

Versuche zu der Expressionsanalyse und den funktionellen Analysen (Abschnitt 3.1-3.2)*Gewebeschnittsmaterial*

Die in Paraffin gebetteten Proben entstammen der Sammlung des Institutes für Pathologie, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Freie Universität Berlin. Die Lymphomfälle wurden nach der WHO-Klassifikation klassifiziert ¹⁶⁴.

Erzeugung von Sonden für die Transkripte der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle

Die RNA wurde aus der Zelllinie Karpas 299 gewonnen. Für die Sonden wurden jeweils spezifische Bereiche der kodierenden Sequenz mit den in nachfolgender Tabelle aufgeführten Primerpaaren amplifiziert. Für die PCR wurden folgende Bedingungen gewählt: 40 Zyklen, 55°C Anlagerungstemperatur, 72°C Elongationsschritt, 94°C Denaturierung.

| Molekül | Zugangsnummer | Nukleotidbereich (b) | Primer |
|--------------|------------------|----------------------|---|
| TRAF1 | U19261 | 192-633 | 5'-AGGCTGTCTCTCTGAGAACCC-3' 5'-AAGCTTCTCCTTCATGAAGTGC-3' |
| TRAF2 | U12597 | 73-708 | 5'-GCTCCCTGGAGTTGCTACAG-3' 5'-GAATCTGCAAGGGACTCGAC-3' |
| TRAF3 | U19260 | 250-867 | 5'-CCTGAACAAGGAGGTTACAAGG-3' 5'-GCAGCCATAGCGCTTAAAC-3' |
| TRAF5 | AB000509 | 55-1728 | 5'-ATGGCTTATTCAGAAGAGC-3' 5'-GACTAGAGATCCTCCAGGTCAG-3' |
| TRAF6 | D84655 | 243-536 | 5'-AACAGCTGTGGATCCAGCC-3' 5'-ACATTTGTGACCTGCATCCC-3' |
| TRADD | L41690 | 602-1233 | 5'-CCTCTCTGTCCGAGGTGAAG-3' 5'-GTGAGGCTGATCTCCAAAGC-3' |
| FADD | U24231 | 62-456 | 5'-CCGAGCTCAAGTTCCTATGC-3' 5'-CCCCACATTATCACATATGACG-3' |
| RIP | U25994 | 422-1005 | 5'-CCAGTGCAGCCAGTCATG-3' 5'-CTTTTGGAGCATCTGGTAAACC-3' |
| TRIP | U77845 | 636-1117 | 5'-TGAGGTGGAGGAGATGATCC-3' 5'-TTTCGTAGTAACCATGCTGGG-3' |
| A20 | J05610 | 1790-2539 | 5'-TTGCCACAGAGCTGGAAAC-3' 5'-CCACTGTTGCAGTGGCAG-3' |
| TANK | NM004180 | 1068-1395 | 5'-AAAACAACTGACAAAACAAAGCCC-3' 5'-CCATTACATCCAGGGGGGATT-3' |
| clAP-1 | L49431 | 207-933 | 5'-GCCTCCCAAAGACTTTTCCC-3' 5'-AGTTGGGAAAATGCCTCCG-3' |
| clAP-2 | L49432 | 159-821 | 5'-TTGATGAAAAGCGCCAACAC-3' 5'-TGGGCATTTGGGAAAATGTC-3' |
| NIK | Y10256 | 2241-2816 | 5'-AAGAACCAAGACATCCACCG-3' 5'-TCACACCATTGAAATAGCTTGG-3' |
| FLIP | U97074 U97075 | 983-1390 | 5'-TTCAGGCTCCATAATGGGAG-3' 5'-GATGTGATGCAGGGGGAG-3' |
| IKK α | AF012890 | 855-1819 | 5'-GCAGAGAGGAGGACCTGTTG-3' 5'-GACCAAACAGCTCCTTGAGC-3' |

Die EBER-Sonden wurden wie von P. Jat und J.R. Arrand beschrieben hergestellt ¹⁶⁵.

In situ Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung wurde durchgeführt nach der von Milani et al. ¹⁶⁶ beschriebenen Methode. Hierbei wurden mehrere Gewebeschnitte eines jeden Falles mit antisense Sonden und sense Sonden, als negative Kontrolle, inkubiert. Für die Autoradiografie wurden die Schnitte mit radiografischer Emulsion (Amersham) beschichtet und bei 4°C drei bis zehn Wochen inkubiert. Die Entwicklung erfolgte in einem Kodak D19 Entwickler (Kodak). Danach wurden die Schnitte mit

Hämatoxylin und Eosin gegengefärbt. Die Detektion von EBER erfolgte nach der Methode von Herbst et al. ¹⁶⁷. Durch Bestimmung der Anzahl an negativen und positiven Zellen wurde die Evaluierung vorgenommen. Die Intensität der Signale wurde durch Auszählung der Silber-Halogenid-Körner (Signale) über 20 Zellen jeden Falles nach einer Expositionszeit von 10 Wochen ermittelt. Die Hybridisierung mit den TRAF1-, A20- und cIAP-2-sense-Sonden zeigte nur geringe Hintergrundsignale von 5-8 Körnern pro Zelle. Deshalb wurden Zellen auf mit der antisense-Sonde hybridisierten Schnitten mit 10 oder weniger Körnern als negativ bewertet. Eine geringe Intensität wurde definiert als Auftreten von weniger als 30, aber mehr als 10 Körnern; eine mittlere mit mehr als 30, aber weniger als 100 Körnern und eine starke mit mehr als 100 Körnern pro Zelle. Die Daten wurden statistisch mit X²-Test ausgewertet.

Immunhistochemie

Paraffinschnitte von 5-6 µm wurden auf Objektträger aufgebracht, getrocknet und 2 Min. in 10 mM Citratpuffer (pH 6.0) gekocht. Nach *in situ* Hybridisierung wurde die Immunhistochemie mittels der alkalischen Phosphatase anti-alkalische Phosphatase (APAAP) Technik durchgeführt ¹⁶⁸. EBV-Infektionen wurden mit einer Antikörpermischung gegen LMP-1(CS1-4, DAKO) analysiert. Die LMP-1+ Fälle wurden weitergehend auf Expression von EBNA2 (mAb PE2, DAKO) und ZEBRA (mAb BZ1, DAKO) untersucht, um die Form der EBV-Infektion zu überprüfen. Das CD30-Antigen wurde durch den im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum B. Franklin, FU-Berlin) hergestellten mAb Ber-H2 detektiert. Der TRAF1 mAb H-3 wurde von der Firma Santa Cruz bezogen.

Northern Blot

Die Northern Blot-Analysen wurden mit Gesamt-RNA durchgeführt. Als Vorversuche wurden zur Feststellung des mRNA-Gehaltes Hybridisierungen mit Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) ¹⁶⁹- und Aktin-Sonden durchgeführt. Somit konnten äquivalente Mengen an aufgetragener mRNA in der Untersuchung sichergestellt werden. Die Herstellung der Sonden und Detektion mittels Chemiluminiszenz erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers mit dem DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit der Firma Boehringer Mannheim.

Western Blot

Die Western Blot-Analysen wurden mit den murinen mAbs gegen TRAF1 (H-3, Santa Cruz) und A20 (Ab-1, Oncogene), sowie einem polyklonalen Kaninchenserum gegen cIAP-2 (H-85, Santa Cruz) nach Standard-Protokollen ¹⁷⁰ durchgeführt.

Durchflußzytometrische Analyse der Auswirkungen der CD30-Stimulation auf die Zellproliferation und Zellzyklus

Die Zellen wurden mit dem Protein A-aufgereinigten murinen Ki-1 Antikörper (1 µg/ml, hergestellt im Institut für Pathologie) mit dem Isotyp-spezifischen (IgG3) Kontrollantikörper (1 µg/ml, SIGMA) oder ohne Zusatz von Antikörper mit einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml inkubiert. Die Zellen wurden hierbei in RPMI-Medium mit 1% (V/V) FCS, 10 µg/ml Ciprofloxacin und optional 2 µg/ml Cycloheximid (CHX) angezogen. Nach 16 oder 48 h wurden die Zellen zur Bestimmung der Zellproliferationsrate mit Aceton fixiert und mit einem Phycoerythrin (PE)-konjugierten Ki-67 Antikörper (DAKO) oder einem (PE)-konjugierten Isotyp-spezifischen Kontrollantikörper (IgG1, DAKO) gefärbt ¹⁷¹. Die Analyse des DNA-Gehaltes, Zellzyklus und Anzahl an apoptotischen Zellen erfolgte nach Nicoletti et al. ¹⁷².

Generation und Analyse transient transfizierter Zellen

Die kompletten cDNA-Sequenzen von TRAF1, A20 und cIAP-2 wurden aus Karpas 299-RNA mittels RT-PCR generiert, in den pCR[®]II-Topo[®]Vektor kloniert und in den pEGF-C-Vektor (ClonTech) umklont. Der Vektor pTRACER (ClonTech) diente als positive Kontrolle zur mock-Transfektion. Die Transfektion erfolgte in Karpas 299- und L540-Zellen mittels Elektroporation mit 240 V und einer Kapazität von 1050 µF. Die Zellen wurden danach 48 h kultiviert, gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Tote Zellen wurden durch Anfärben mit Propidiumiodid identifiziert. Die Transfektionsversuche wurden jeweils als Triplikate durchgeführt.

Versuche zur Verminderung der Proteinkonzentrationen von TRAF1, A20 und cIAP-2 in den Zellen

Hierzu wurden die cDNA-Sequenzen in antisense Richtung in den pEGF-N-Vektor (ClonTech) kloniert. Die Zellen wurden nach obiger Beschreibung transfiziert. Die Sonden für die *in vivo* Blockade

der Translation der Proteine TRAF1, A20 und cIAP-2 wurden von der Firma Biognostik GmbH angefertigt. Durchgeführt wurden die Versuche mit dem zugehörigen ANTISENSE®-Kit nach Herstellerangaben. Die Aufnahme der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierten Sonden wurde durch Fluoreszenzmikroskopie sichergestellt. Eine mögliche Verringerung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Western Blot-Analyse.

Versuche zur Identifikation neuer Interaktionspartner von CD30, TRAF1 und TRAF5 (Abschnitt 3.3)

Das Prinzip des 2H-Systems

Das im Jahre 1989 publizierte Hefe-2H-System zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen basiert auf den Eigenschaften des Gal4-Proteins aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*¹⁷³. Dieses Protein ist der Transkriptionsaktivator des Genproduktes zur enzymatischen Spaltung von β -Galaktose, der β -Galaktosidase. Es besteht aus zwei teilbaren und funktionell essentiellen Untereinheiten, einer DNA-bindenden Domäne (BD) und einer die Transkription aktivierenden Domäne (AD). Generiert man Fusionsproteine aus der BD mit Protein X und eines aus AD und Protein Y, dann bringt eine Wechselwirkung der Proteine X und Y die Gal4 Domänen in räumliche Nähe, die Transkription der β -Galaktosidase erfolgt und messbare β -Galaktosidaseaktivität tritt auf.

Etablierung eines speziellen 2H-Systems

Neben den Gal4-2H-Systemen, gibt es auch solche, die methodisch auf der Fusion von LexA als bindender Domäne und dem B42-Protein als aktivierender Domäne basieren. Allerdings interagiert LexA sowohl mit B42 als auch mit der DNA-bindenden Untereinheit von Gal4 und bewirkt die Transkription von β -Galaktosidase¹⁷⁴. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Hybrid Hunter™-System (Invitrogen) und das HybriZap®-2.1-System (Stratagene) miteinander kombiniert angewandt. Als Vorversuche wurden 2H-Assays mit positiven und negativen Kontrollen durchgeführt und hiermit die Methode als einsetzbar verifiziert.

Erstellung der cDNA-Banken in 2H-Vektoren

Aus der Gesamt-RNA der Zelllinien Karpas 299, JB6, L1236 und L428 wurde mRNA mit Hilfe des FastTrack® 2.0-Kits (Invitrogen) gewonnen. Die Erstellung der cDNA-Banken erfolgte in den pAD-Gal4-2.1 Phagemid-Vektor (Stratagene) mit Hilfe des HybriZAP®-2.1 Two-Hybrid cDNA Synthesis und Gigapack® Cloning Kits (Stratagene).

Konstruktion der BD-Köderproteininfusionsprodukte und Köderhefestämme

Hierfür wurden die cDNA des cytoplasmatischen Anteils des CD30-Rezeptors (CD30_{cyt}), TRAF1 und TRAF5 aus Karpas 299-Zellen amplifiziert, zuerst in den pCR®II-Topo®Vektor kloniert, dann in den Vektor pHybLex/Zeo (Invitrogen) umkloniert, in E. coli vermehrt und durch Sequenzierung verifiziert. Hiefür wurden die folgenden Primerpaare mit angefügten Restriktionsschnittstellen (fett) verwendet.

| Molekül | Zugangsnr. | Nukleotidbereich (b) | Primer | Restriktionsenzym |
|---------------------|------------|----------------------|---|-------------------|
| TRAF1 | U19261 | 76-1326 | 5'-GAATTCATGGCCTCCAGCTCAGGC-3' 5'-CTCGAGCGCCCACCCTAAGTGCTG-3' | EcoRI XhoI |
| TRAF5 | AB000509 | 55-1728 | 5'-GGGCCCATGGCTTATTCAGAAGAGC-3' 5'-CTCGAGGACTAGAGATCCTCCAGGTCAG-3' | ApaI XhoI |
| CD30 _{cyt} | M83554 | 1468-2012 | 5'-GAATTCATTCGGCAGAAGCTCCACC-3' 5'-GGTACCCCTCACTTTCAGAGGCAGC-3' | EcoRI KpnI |

Sequenzierungsprimer:

| | |
|------------------|---------------------------------|
| pHybLex/Zeo.for | 5'-AGGGCTGGCGGTTGGGGTTATTCGC-3' |
| pAD-Gal4-2.1.for | 5'-AGGGATGTTTAATACCACTAC-3' |

Für die Versuche wurde der Hefestamm L40 (Phänotyp: His-, Trp-, Leu-, Ade-) verwendet, dessen vollständiger Genotyp noch nicht charakterisiert ist. Zur Transformation wurde eine Kolonie der Hefe in 10 ml YPAD übernacht bei 30°C angezogen. Die Kultur wurde zu einer OD₆₀₀ von 0,4 in 500 ml YPAD eingestellt, 2-4 weitere Stunden inkubiert, pelletiert (2000 xg, 5 Min., RT) und in 40 ml TE resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2 ml 100 mM LiAc / 0,5xTE resuspendiert und die Zellen 10 Min. bei RT belassen. Für jede Transformation wurde 1 µg Plasmid und 100 µg denaturierte Lachsspermien-DNA zu 100 µl der Hefesuspension gegeben, 700 µl 100 mM LiAc / 40% PEG-3350 / TE zugegeben, gut durchmischt und die Suspension inkubiert (30°C, 30 Min.). Nach Zugabe von 88 µl DMSO und durchmischen erfolgte ein Hitzeschock für 7 Min. bei 42°C. Der Überstand wurde abgetrennt und verworfen (10000 xg, 10 Sek.). Die Zellen wurden nun in 1 ml

TE gewaschen. Nach Resuspendierung in 50-100 µl TE wurde die Suspension auf YPAD Z300-Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

L40 Hefestamm [*MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::(4lexAop-HIS3) URA3::(8lexAop-lacZ) GAL4*]

YPAD [1% (m/V) Hefeextrakt, 2% (m/V) Pepton, 2% (m/V) Dextrose, 0,1 g/l Adenin, optional 2% (m/V) Agar]

Zeocin® wurde für die Selektion in *E. coli* zu 25 µg/ml, in Hefen zu 300 µg/ml konzentriert eingesetzt.

TE [10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA]

Expressionskontrolle der Köderproteine

Dazu wurden 5 ml YPAD Z300 mit einer Kolonie des zu testenden Köderstammes und als Negativ-Kontrolle L40 inokuliert und über Nacht angezogen. Die Zellen wurden dann pelletiert (1000 xg, 5 Min., RT) und das Medium dekantiert. Nach 10 Min. bei -80°C wurde das Pellet in 100 µl auf 60°C vorgewärmten Cracking-Puffer [8M Harnstoff, 5% SDS, 40 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 mM EDTA, 1% (V/V) β-Mercaptoethanol, 0,4 mg/ml Bromphenolblau] resuspendiert. Die Lösung wurde nun in Röhrcchen mit 100 µl vorgelegten Glaskörnchen transferiert und die Suspension bei 70°C 10 Min. inkubiert. Nach mehrfachem vortexen wurde abzentrifugiert (10000 xg, 5 Min., RT) und der Überstand im Western Blot mit einem gegen LexA gerichteten mAb (Invitrogen) analysiert.

Filter-Lift-Assay

Sowohl die Tests auf Autoaktivierung der β-Galaktosidase als auch die Analyse auf Interaktionen wurden mit dieser Methode durchgeführt. Hierzu wurden die Testklone auf YPAD Z300-Platten angezogen und ein trockenes Nitrozellulosefilterpapier (Schleicher & Schuell) aufgedrückt. Der Abdruck der Hefekolonien wurde auf flüssigem Stickstoff abgekühlt (30 sek.), auf ein mit 1,5 ml Z-Puffer mit 30 µl X-Gal getränktes Whatman-Filterpapier in Petrischalen (Ø 85 mm) gebracht und bei 30°C inkubiert. Nach spätestens 30 Min. sollte eine Aktivität der β-Galaktosidase als Blaufärbung sichtbar sein.

Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7H₂O, pH 7,0)

X-Gal-Lösung [50 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) in N,N-Dimethyl-formamid (DMF)]

Erzeugung kompetenter Köderhefen zur Transformation

Die Köderhefen wurden in 5 ml YPAD Z300 inokuliert und über Nacht bei 30°C angezogen. Zur Erzeugung einer Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase, wurde von der Übernachtskultur eine Verdünnung in 100 ml YPAD Z300 hergestellt, die nach einer Inkubationszeit von 16 h eine OD₆₀₀ von 3-4 aufweist. Diese neue Übernachtskultur wurde nun auf 1l YPAD Z300 mit einer Konzentration von 0,3 OD₆₀₀/ml eingestellt und unter Schütteln inkubiert (3 h, 30°C). Die Hefen wurden nun pelletiert (1000 xg, 10 Min., RT), der Überstand verworfen und in 500 ml TE resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet in 20 ml 100 mM LiAc/0,5xTE resuspendiert und in eine sterile 1l Flasche überführt.

Transformation der cDNA-Banken-Plasmide in die Köderhefen

Zu der kompetenten Hefesuspension wurden 1 ml Mischung aus denaturierter Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) und 500 µg der zu transformierenden cDNA gegeben und weiter mit 140 ml 100 mM LiAc/40% (m/V) PEG-3350/TE versetzt. Nach Inkubation (30 Min., 30°C) wurden 17,6 ml DMSO zugefügt, die Suspension einem Hitzeschock ausgesetzt (42°C, 6 Min.) und unter Zugabe von 400 ml YPAD in einem Wasserbad auf RT abgekühlt. Die Hefen wurden pelletiert, das Pellet mit 500 ml YPAD gewaschen, in 1l YPAD resuspendiert und unter Schütteln inkubiert (1 h, 30°C). Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurde vor Inkubation 1 ml Hefesuspension abgenommen, pelletiert, das Pellet in 1 ml YC-UL Z300 Medium resuspendiert und jeweils 1 und 10 µl auf YC-UL Z300-Platten ausplattiert.

YC-Medien [0,12% (m/V) Hefe-Stickstoff-Base (ohne Aminosäuren), 0,5% (m/V) Ammoniumsulfat, 1% (m/V) Succininsäure, 2% (m/V) Glukose, 0,1% (m/V) (Adenin, Arginin, Cystein, Lysin, Threonin, Tryptophan), 0,05% (m/V) (Asparaginsäure, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin), optional 2% (m/V) Agar]. Zur Herstellung von YC-UI wurde 0,05% (m/V) Histidin zugesetzt.

Selektion der Transformanden

Dazu wurde die Hefesuspension nach der Inkubation pelletiert, mit 500 ml YC-UI gewaschen, erneut pelletiert und in 1l auf 30°C vorgewärmtem YC-UL Z300 resuspendiert. Nach erfolgter 16 stündiger Inkubation wurden die Hefen wieder pelletiert, zweifach mit 500 ml YC-HUL gewaschen und in 10 ml YC-HUL Z300 resuspendiert. Es wurden jeweils 5 µl, 10 µl, 25 µl und 50 µl dieser Suspension auf die Selektionsplatten (YC-HUL Z300) ausplattiert und 2-5 Tage bei 30°C inkubiert, um das optimale auszuplattierende Volumen für die Durchsuchung zu bestimmen. Der Rest der Hefesuspension wurde

bei 4°C gelagert, später auf 30 Selektionsplatten ausplattiert und die Hefen zu einer Koloniegröße von 1-2 mm angezogen (3-5 Tage).

Test auf β -Galaktosidaseaktivität und Identifikation putativer Interakteure

Die 30 Platten wurden mit dem Filter-Lift-Assay auf positive Interaktion der exprimierten Proteine untersucht. Positive Hefen wurden auf eine in Sektoren unterteilte Platte (YC-HUL Z300) übertragen, wiederum einige Tage inkubiert und erneut einem Test auf β -Galaktosidaseaktivität unterworfen. Die zweifach als positiv identifizierten Hefen wurden amplifiziert, die AD-Vektoren mit der cDNA der interagierenden Proteine mit dem Yeast Plasmid Isolation-Kit der Firma Bio 101 extrahiert, in *E. coli* transformiert und vervielfältigt. Nach der Sequenzierung erfolgte ein Vergleich der Sequenzdaten mit der EMBL-Datenbank und die Identifikation der putativ interagierenden Proteine.

Immunpräzipitationen (IP) zur Verifikation der Interaktionen

Das Zelllysate wurde mit einem speziellen IP-Puffer [PBS, 0,02 % (m/V) NaN_3 , 1 % (V/V) Nonidet P-40, 0,5 % (V/V) 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat, vor Verwendung frisch zugesetztes 1 mM PMSF und 1 mM COMPLETE Proteinaseinhibitormix (Roche)] gewonnen. Zur Vorreinigung des Zelllysats wurde 1 μg Kontrollantikörper (Santa Cruz) gleichen Isotyps wie die zur IP verwendeten Antikörper mit 20 μl Protein G Plus-Agarose-Suspension (Santa Cruz) zu dem Lysat gegeben und in einem Überkopfschüttler inkubiert (4°C, 30 Min.). Nachfolgend wurde das Präzipitat pelletiert (1000 xg, 4°C) und der Überstand in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Zur IP wurde 1 μg des primären Antikörper mAb Ber-H2, respektive TRAF5 (C-19, Polyklonales Ziegen Serum, Santa Cruz) zugefügt und inkubiert (1 h, 4°C). Nach Zusatz von 20 μl Protein G Plus-Agarose-Suspension wurde über Nacht die Immunkomplexe gefällt (Überkopfschüttler, 4°C). Die Immunpräzipitate wurden nachfolgend pelletiert (1000 xg, 4°C, 5 Min.), der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet vierfach mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 40 μl Probenpuffer für nachfolgende Western Blot-Analyse aufgenommen und 3 Min. bei 100°C denaturiert. Die Detektion der hUBC-9-Konjugate erfolgte mit dem polyklonalen Kaninchenserum gegen hUBC-9 (Ab-1, Santa Cruz). Die Detektion der zur Kontrolle aufgetragenen IP-Antikörper erfolgte mit HRP-konjugierten Anti-Maus-, respektive Anti-Ziegen-Antikörpern (Santa Cruz).

Versuche zum Nachweis einer Sumoisierung

Die Zellyse erfolgte nach der Methode von Kawabe et al.¹⁷⁵. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, pelletiert und in 250 µl 4xIP-Puffer [50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 4% (V/V) Nonidet P-40, 2% (m/V) Natriumdeoxycholat, 0,4 % (m/V) SDS, 2 mM Dithiothreitol] resuspendiert, auf Eis Ultraschall ausgesetzt, das Lysat mit 750 µl Verdünnungspuffer [50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 2 mM Dithiothreitol, 20 mM N-Ethylmaleimid und 1 mM COMPLETE Proteinaseinhibitormix (Roche)] verdünnt und 20 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 Min., 1000 xg, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und in die Versuche eingesetzt. Die IP wurde hierbei zusätzlich mit p53 mAb (Do-7, Novocastra), den Anti-SUMO-1-Antikörpern 21C7 (mAb, Zymed) und FL-101 (polyklonales Kaninchenserum, Santa Cruz) durchgeführt. Als einzige Abweichung wurde zum Waschen des Präzipitates 1xIP-Puffer [aus 4xIP-Puffer + Verdünnungspuffer] verwendet.

Mutageneseversuche

Hierfür wurden die gesamten cDNAs der Proteine CD30, TRAF5, hUBC-9 und SUMO-1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1/V5-His-Topo® (Invitrogen) kloniert. Die putativen Sumotylierungsstellen in CD30 und TRAF5 wurden mit Mutageneseprimern modifiziert. Die hierfür verwendeten Primerpaare sind nachfolgend aufgeführt.

| Primer | Zugangsnummer | Sequenz |
|-------------|---------------|--|
| CD30 | M83554 | 5'-ATGCGCGTCCTCCTCGCCGC-3' 5'-CCTCACTTCCAGAGGCAGC-3' |
| TRAF5 | AB000509 | 5'-ATGGCTTATTCAGAAGAGC-3' 5'-GACTAGAGATCCTCCAGGTCAG-3' |
| hUBC-9 | U66867 | 5'-TTTGAACATGTCGGGGATCG-3' 5'-TTATGAGGGCGCAAACCTC-3' |
| SUMO-1 | NM_003352 | 5'-ATCATGTCTGACCAGGAGGC-3' 5'-CTAAACTGTTGAATGACCCCC-3' |
| Mut 1-CD30 | | 5'-AGACCTCCCAGCCCAGGCTAGAGCTTGTGGA-3' 5'-TCCACAAGCTCTAGCCTGGGCTGGGAGGTCT-3' |
| Mut 2-CD30 | | 5'-TCGTGGGGACCGTGAGGGCTGAGCTGCCGGA-3' 5'-TCCGGCAGCTCAGCCCTCACGGTCCCCACGA-3' |
| Mut 1-TRAF5 | | 5'-CGAAGATTATTCTAAGAAGTGGTAGATGA-3' 5'-TCATCTACCTCAGTTCTTAGAATAATCTTCG-3' |

Die Mutagenese wurde mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers realisiert.

Transfektion von 293-Zellen mit der Kalziumphosphat-Methode

5·10⁵ exponentiell wachsende Zellen wurden in eine 10 cm Kulturplatte mit 10 ml Medium eingesät. Zur Bestimmung der optimalen Menge an DNA wurden drei Platten mit je 10, 20, 30 µg Plasmid-DNA am Vortag zur Probe transfiziert. Zur Transfektion wurden 500 µl 0,25 M CaCl₂ mit den Testmengen und später der optimalen Menge an DNA gemischt und diese Mischung zu 500 µl vorgelegter 2xBBS-Lösung [50 mM N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ (pH 6,95)] gegeben. Die Mischung wurde inkubiert (5-20 Min., RT) bis die Präzipitation einsetzte und dann die Kalziumphosphat -DNA-Lösung tropfenweise unter leichtem schwenken auf die Kulturschale gegeben. Die Zellen wurden 15-24 h inkubiert (37°C, 3% CO₂). Spätestens beim ersten Anzeichen der Ablösung der Zellen vom Grund, wurden sie 2 mal mit 5 ml PBS gewaschen, mit 10 ml neuem Medium versorgt und weitere 48 h inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Versuche zu den Mutationsanalysen (Abschnitt 3.4)*Isolation primärer Blutlymphozyten (PBL)*

Die PBL wurden aus Vollblutproben verschiedener Spender durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque (Pharmacia) gewonnen. Dazu wurde das Vollblut 1:2 mit eiskaltem PBS verdünnt und diese Verdünnung auf vorgelegtes Ficoll in einem Zentrifugationsröhrchen aufgetragen. Das Volumen des Ficoll betrug hierbei in etwa die Hälfte der aufzutragenden Blutverdünnung. Bei RT wurde bei 4000 xg 30 Min. ohne Einsatz der Bremse zentrifugiert. Die Interphase des Gradienten, die nun die PBL enthält, wurde abgezogen und 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die so gewonnen PBL wurden bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Amplifikation und Analyse der cDNAs von Apaf-1, FLICE und Caspase-3

Zur Amplifikation wurden die im Folgenden aufgeführten Primerpaare verwendet. Die klonierten cDNA-Abschnitte von Apaf-1, FLICE und Caspase-3 wurden mit T7- und Sp6- Primern sequenziert. Die Auswertung der Sequenzdaten und der Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz erfolgte mit Hilfe der SeqMan-, EditSeq-, und MegAlign-Programme der Firma DNASTar.

| Molekül | Zugangsnr. | Nukleotidbereich (b) | Primer |
|----------------------|------------|----------------------|---|
| Apaf-1-Fragment 1 | AF013263 | 575-1842 | 5'-AAGATGGATGCAAAAGCTCG-3' 5'-AACGACTTTCATTCCGATC-3' |
| Apaf-1-Fragment 2 | | 1812-2980 | 5'-TTTTATTCTGTGATCGGAATGG-3' 5'-CCTTGCACCATCAGCAGAC-3' |
| Apaf-1-Fragment 3 | | 2975-4282 | 5'-GCAAGGATAATGGTGGCAGC-3' 5'-AATGAATGCAATACTGCACAAC-3' |
| FLICE-Fragment 1 | X98172 | 291-1213 | 5'-GATGGACTTCAGCAGAAATCTTT-3' 5'-CCATGTTACTGTTGGTCCATG-3' |
| FLICE-Fragment 2 | | 1121-1736 | 5'-TTCATTTTGAGATCAAGCCCCAC-3' 5'-CACCATCAATCAGAAGGGAA-3' |
| Caspase-3-Fragment 1 | XM_037104 | 21-760 | 5'-TATTGTGAGGCGGTTGTAGAAG--3' 5'-TCAACACCACTGTCTGTCTCAA-3' |
| Caspase-3-Fragment 2 | | 669-1149 | 5'-AGAAGTCTAACTGGAAAACCCA-3' 5'-GTAGGTCAAAATGAGAGGGAAA-3' |