

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

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 Qualitätsstufe 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 entweder sterile Einmal-Artikel oder sie wurden durch Hitze im Labor sterilisiert.

#### 2.1.2. Geräte

Brutschrank (Bakterien)	BK 6160, Heraeus
Brutschrank (Zellkultur)	6000 Heraeus
Cleanbench	Faster 1, Bio-Flow-Technik
Coulter (Particel-Counter)	Z-Serie, Coulter Electronics
Elisa-Reader	Spectra, SLT-Lab Instruments
Gelelektrophoresesystem	Mini-Protean 2, BioRad
Hybaid-Thermo-Cycler	Touch-Down, MWG-Biotech
Heizblock	Thermomixer 5336, Eppendorf
Kühlzentrifuge	Centrikon H-401, Kontron Instruments
Mikroskop	TMS, Nikon
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Mikrowelle	RZV2G, Sharp
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf
Power Supply	Power Pac 1000, BioRad
Spektralphotometer	Ultorspec 3000, Pharmacia
Tischzentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus
Ultrazentrifuge	Centrikon T-2070, Kontron Instruments
Vortex	Vortex-Genie 2, Bender & Hobein

#### 2.1.3. Nährmedien für Bakterien

LB-Medium:	10 g NaCl
	10 g Pepton (Gibco BRL)
	5 g Yeast Extract (Gibco BRL)
	auf 1 l mit aqua bidest.
LB/Amp-Medium:	wie LB-Medium, zusätzlich 50 µg/ml Ampicillin (Boehringer Mannheim)

**2.1.4. Puffer und Lösungen**

10 x TAE-Puffer:	0,4 M	Tris-Acetat, pH 8,0
	0,2 M	Na-Acetat
	0,02 M	EDTA
5 x TBE-Puffer:	0,45 M	Tris/HCl, pH 8,0
	0,45 M	Borat
	0,01 M	EDTA
TE-Puffer	0,01 M	Tris/Hcl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
P/C/I-Extraktionsgemisch:	25 Volumenanteile Phenol	
	24 Volumenanteile Chloroform	
	1 Volumenanteil Isoamylalkohol	
	mit 0,01 M Tris/Hcl, pH 8, gesättigt	
	(unter Lichtabschluß bei 4°C lagern)	
C/I-Extraktionsgemisch:	24 Volumenanteile Chloroform	
	1 Volumenanteil Isoamylalkohol	
	(bei 4°C lagern)	

**2.1.4.1. Lösungen für Plasmidpräparation : Minilysat**

Lösung 1:	0,05 M	Glucose
	0,025 M	Tris/Hcl, pH 8
	0,01 M	EDTA
	2 mg/ml	Lysozym
Lösung 2:	0,2 N	NaOH
	1 %	SDS
Lösung 3:	3 M	Na-Acetat, pH 4,8

**2.1.4.2. Lösungen für Plasmidpräparation : Qiagensäulen**

QBT:	0,75 M	NaCl
	0,05 M	MOPS, pH 7
	15 %	Ethanol (v/v)
	0,15 %	Triton X-100
QC:	1,0 M	NaCl
	0,05 M	MOPS, pH 7
	15 %	Ethanol (v/v)

QF:	1,2		
	0,05	M	MOPS (v/v)
	15	%	Ethanol
BPB-Puffer (10 x):	50	%	Glycerin
	0,05	M	EDTA
	0,05		
PBS:	8	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,5	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	140	mM	NaCl
	3	mM	KCl
	pH 7,4		
Triton X-100-Puffer	150	mM	NaCl
	10	mM	Tris/Hcl, pH 7,8
	1	mM	CaCl <sub>2</sub>
	1	%	Triton X-100

#### 2.1.4.3. Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Lösung A: Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (30% w/v)

Lösung B: 0,8 g SDS  
36,3 g Tris/Hcl, pH 8,8  
auf 200 ml mit aqua bidest.

Lösung C: 0,4 g SDS  
6,0 g Tris/Hcl, pH 6,8  
auf 100 ml mit aqua bidest.

7,5%ige Trenngellösung	2,25	ml	Lösung A
	2,5	ml	Lösung B
	4,5	ml	aqua bidest.
	45	µl	APS
	3	µl	TEMED
4%ige Sammelgellösung	0,4	ml	Lösung A
	0,75	g	Lösung C
	1,85	ml	aqua bidest
	12	µl	APS
	3	µl	TEMED
5 x Probenpuffer	2,5	g	SDS
	0,72	g	Tris, pH6,8
	10	ml	Glycerin
	5	ml	Mercaptoethanol
	0,3	ml	1%iges Bromphenolblau mit aqua bidest. ad 20 ml

5x nicht reduzierender Probenpuffer: wie 5 x reduzierender Probenpuffer, aber ohne Mercapto-  
propandiol

10 x Laufpuffer	30	g	Tris/HCl,pH8,8
	144	g	Glycin
	10	g	SDS
	mit aqua bidest. ad 1		

#### 2.1.4.4. Lösungen für die Tricin-Gele

Lösung A: Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (30 % w/v)

Gel-Puffer: 0,1 M Tris; pH 8,45  
0,3% SDS  
auf 200 ml mit aqua bidest.

#### Ansätze für zwei Mini-Tricin-Gele

7,5%ige Trenngellösung	3	ml	Lösung A
	3	ml	Gel-Puffer
	0,9	ml	Glycerin
	2,1	ml	aqua bidest.
	50	µl	APS
4% ige Sammelgellösung	5	µl	TEMED
	0,4	ml	Lösung A
	0,75	g	Gel-Puffer
	1,85	ml	aqua bidest.
	25	µl	APS
	2,5	µl	TEMED

10 x Laufpuffer			
Anoden-Puffer	0,2 M		Tris/HCl, pH 8,9
Kthoden-Puffer	0,1 M		Tricin
	0,1%		SDS
	0,1 M		Tris/HCl, PH8,25

#### 2.1.4.5. Lösungen für den Immunoblot

Blot-Kammerpuffer	42,75	g	Glycin
	15,15	g	Tris,pH8,3
	0,5	l	Ethanol
	mit aqua bidest ad 5 l		

Ponceau-Färbelösung	2	%	Ponceau-Rot
	30	%	TCA
	30	%	Sulfsalicylsäure
	vor Gebrauch 1:4 mit aqua bidest. verdünnen		

Waschpuffer (Westernblot):

	0,1	%	Tween 20 (v/v) in PBS
Lösung a	6,8	mM	p-Cumarsäure in DMSO
Lösung b	1,25	mM	Luminol in 0,1 M Tris, pH8,5
Lösung c	3	%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Entwicklerlösung : Kodak GBX Entwicklerkonzentrat, 1:5 verdünnen mit aqua bidest.

Fixierlösung: Kodak GBX Fixiererkonzentrat, 1:5 verdünnen mit aqua bidest.

#### 2.1.4.6. Lösungen für Silbergele

Fixierlösung	50	%	Methanol (v/v)
	12	%	Essigsäure (v/v)
	0,02	%	Formaldehyd (v/v) in aqua bidest.
Lösung A	0,02	%	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · 5 H <sub>2</sub> O (w/v) in aqua bidest.
Silbernitratlösung	0,2	%	AgNO <sub>3</sub> (w/v)
	0,03	%	Formaldehyd (v/v) in aqua bidest.
Entwicklungslösung	6	%	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (w/v)
	0,0005	%	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> · x 5 H <sub>2</sub> O (w/v)
	0,02	%	Formaldehyd (v/v) in aqua bidest. mit aqua bidest. ad 1 l
Solubilisationpuffer	0,15	M	NaCl
	0,01	M	Tris, pH7,4
	0,001	M	CaCl <sub>2</sub>
	0,001	M	MgCl <sub>2</sub>
	1	%	Triton X-100
			pH7,4

### 2.1.5. Antikörper

#### Antikörper für die Immunoblots

##### Primär-Antikörper:

<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>gerichtet gegen:</b>
Antiserum, Integrin $\alpha 3$	Chemicom	$\alpha 3$ -Integrin
Anti-Integrin $\alpha 3$ (Klon 42) monoklonal	BD Transduction	$\alpha 3$ -Integrin
(Anti-CD49f), monoklonal	DPC-Biermann (GB)	$\alpha 6$ -Integrin-Cyto
Anti- $\alpha V$ -Integrin, monoklonal	Santa Cruz	$\alpha V$ -Integrin
AS3K5, polyklonal	(Löster et al., 1995) AG-Reutter	$\alpha 1$ -Integrin
AS7K4, polyklonal	(Löster et al., 1994) AG Reutter	$\beta 1$ -Integrin
Anti-IL2-sR $\alpha$ (N19), polyklonal	Sigma	IL2/Rezeptor
Anti-N-Cadherin, monoklonal	BD Transduction	NCadherin
5B8, monoklonal	AG Reutter	N-CAM
Anti-c-Myc, monoklonal	Sigma	c-Myc
Anti-Rac1, monoklonal	Pierce	Rac1
Anti-RhoA, monoklonal	Pierce	RhoA
Anti-Laminin-1 (Rate)	Chemicon	$\beta 1$ -Kette-des Laminin-1
Anti-Laminin-5 (Maus)	Chemicon	$\gamma 2$ -Kette des Laminin-5
Anti-p-MAPK	Promega	p-ERK1/-ERK2

##### Sekundäre Antikörper:

SAR, Peroxidase-konjugiert	Dianova	Kaninchen-Immunglobulin
GAM, Peroxidase-konjugiert	Dianova	Maus-Immunglobulin
RAG, Peroxidase-konjugiert	Dianova	Ziege-Immunglobulin
RAM, Peroxidase-konjugiert	Dianova	Maus-Immunglobulin

#### Antikörper für die Immunofluoreszenz und FACS

##### Primäre-Antikörper:

<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>gerichtet gegen:</b>
33.4, monoklonal	AG-Reutter	$\alpha 1$ -Integrin
Ralph 3.2, monoklonal	Santa Cruz (USA)	$\alpha 3$ -Integrin
P1B5	Chemicon	$\alpha 3$ -Integrin
Human CD25, monoklonal	Dianova	IL2/Rezeptor
Human CD25, FITC-konjugiert, monoklonal	Dianova	IL2/Rezeptor
CBL-151 FITC-konjugiert, monoklonal	Cymbus Biotechnology, LTD, USA	IL2/Rezeptor

CD49f (GoH3), monoklonal	BD PharMingen	$\alpha$ 6-Integrin
c-Myc-Cy3-konjugiert, monoklonal	Sigma	c-Myc-Tag

Sekundär-Antikörper:

GAM/FITC (Maus-Immunglobulin)	Sigma
GAR/FITC (Ratte-Immunglobulin)	Sigma
CAR/Cy3 (Ratte-Immunglobulin)	Promega

Antikörper zur Blockierung des Neuritenwachstums

Antikörper	Herkunft	gerichtet gegen:
33.4	AG Reutter	$\alpha$ 1-Integrin
Ralph 3.2	Santa Cruz	$\alpha$ 3-Integrin
GoH3	BD Pharmingen	$\alpha$ 6-Integrin
Ha2/5	BD Pharmingen	$\beta$ 1-Integrin
BM165	M. Koch, Köln	$\alpha$ 3-Kette des Laminin-5

### 2.1.6. Primer, PCR und RT-PCR-Reagentien

Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR):

Primer für GAPDH (10 pm)	3` -ACCACCCTGTTGCTGTAGC-5` 5` -CATCACCATCTTCCAGGAGC-3`
Primer für die $\alpha$ 6-Integrin-Untereinheit (10 pm)	3` -ATCGATACGAGAAACGGCAG-5` 5` -GATGTGCTGACTTCATGTCTC-3`
Primer für die $\alpha$ 1-Integrin-Untereinheit (10 pm)	3` -TCCTGTACTGTACCCAATTGG-5` 5` -TCAGGAGGATAACCCACAGC-3`

PCR und RT-PCR-Reagentien:

dNTPs	MBI Fermentas
5 x First-Strand-Buffer	MBI Fermentas
DTT	MBI Fermentas
10 x PCR-Puffer	MBI Fermentas
MgCl <sub>2</sub>	MBI Fermentas
Random Primer	MBI Fermentas

### 2.1.7. Bakterien und Plasmidvektoren

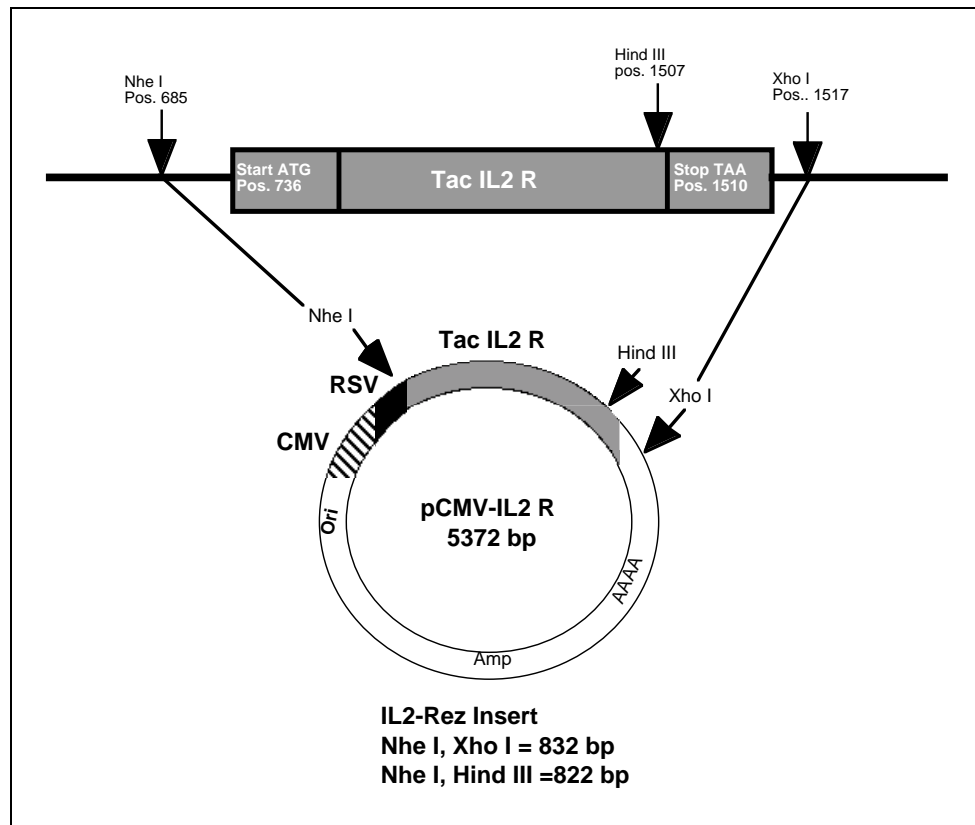
#### Bakterienstamm:

E.coli. HB 101 [Boyer & Roulland-Dussoix, 1969].

F<sup>-</sup>, dsd S20 (r<sub>B</sub>, m<sub>B</sub>), sup E 44, ara, λ<sup>-</sup>, lacY1, pro A2, rps L20, xyl-5, mtl-1, rec A 13.

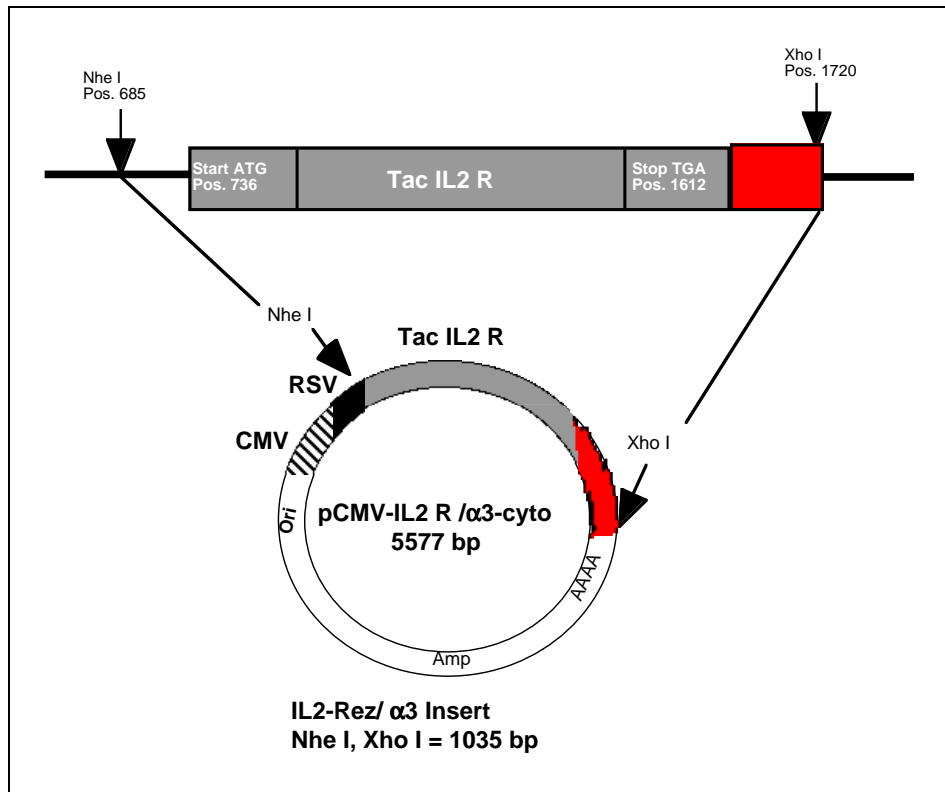
#### Vektoren:

pCMV-IL2R-Vektoren:

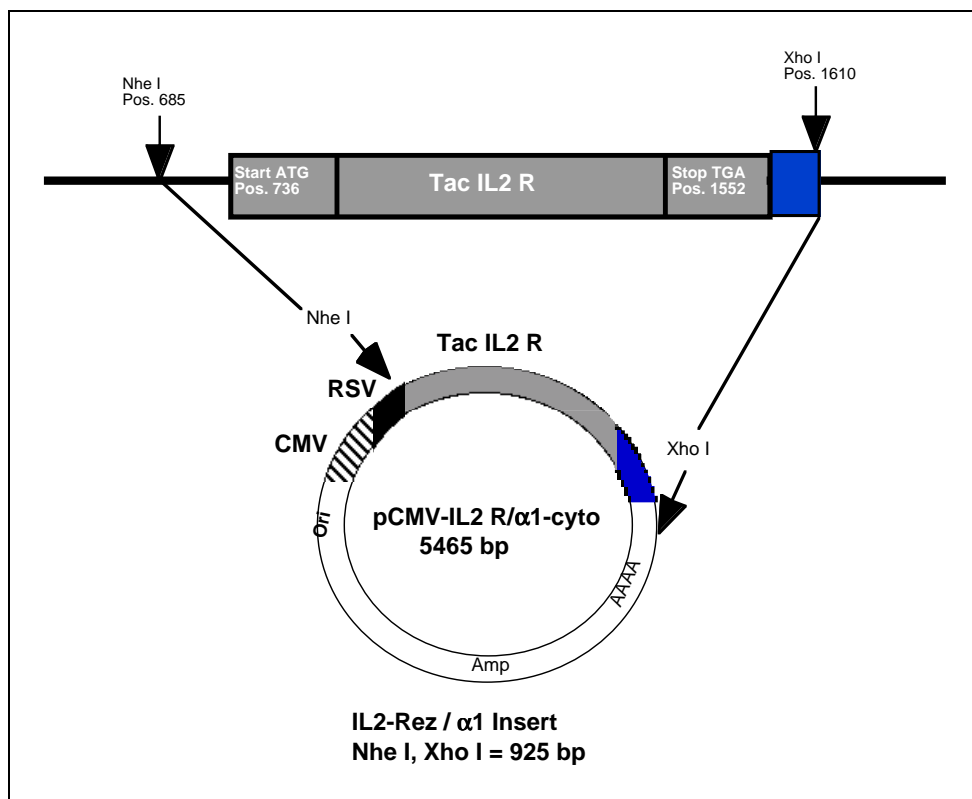


**Abb. 1:** Aufbau des Vektors pCMV-IL2-Rezeptor (als Kontroll-Vektor) (LaFlamme): Dargestellt sind die Ampicillin-Resistenzen, der pCMV-Promotor, das SV40 ori, der RSV-Promotor und die Restriktionsenzyme (NheI und Xho I oder NheI und Hind III), mit denen das Insert herausgeschnitten werden kann.





**Abb. 2: pCMV-IL2R- $\alpha$ 3- cyto (AG Reutter):** Dieser Expressionsvektor enthält als Insert den IL2R- $\alpha$ 3-cyto. Dargestellt sind die Ampicillin-Resistenzen, der pCMV-Promotor, das SV40 ori, der RSV-Promotor, und die Restriktionsenzyme (NheI und Xho I), mit denen das Insert herausgeschnitten werden kann.



**Abb. 3: pCMV-IL2R- $\alpha$ 1- cyto (AG Reutter):** Dieser Expressionsvektor enthält als Insert den IL2R- $\alpha$ 1-cyto. Dargestellt sind die Ampicillin-Resistenzen, der pCMV-Promotor, das SV40 ori, der RSV-Promotor und die Restriktionsenzyme (NheI und Xho I), mit denen das Insert herausgeschnitten werden kann.

**pCMV-Myc-Vektoren:**

- pCMV-Myc / N17Rac
- pCMV-Myc / L61Rac
- pCMV-Myc / Wt-Rac

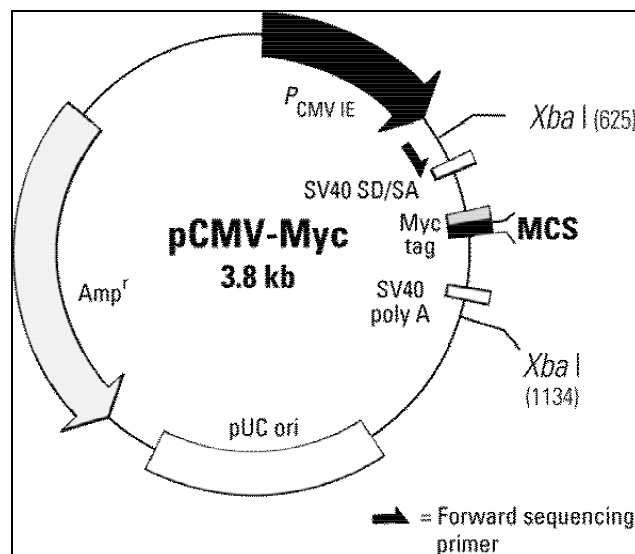
**AAH04247: Rac1-Protein (*Homo sapiens*)**

Die Aminosäuresequenz vom humanen Rac1. Bei dem dominant negativen Rac1 (T17N Rac) ist das Threonine 17 durch Asparagin ausgetauscht worden und bei dem constitutiv aktiven Rac1 (Q61LRac) ist das Glutamine durch Leucine ausgetauscht worden. Die modifizierten Aminosäuren sind fettgedruckt dargestellt.

```

1  mqaikcvvvg dgavgktcll isyttnafpg eyiptvfdny sanvmvdgkp
vnlglwhtag
61  qedydrlrpl sypqtdvfli cfslvspasf envrakwype vrhhcpntpi
ilvgtkldlr
121 ddkdtieklk ekklipityp qglamakeig avkylecsal tqrglktvfd eai-
ravlcpp
181 pvkkrkrkcl ll

```



**Abb. 4: Expressionsvektor pCMV-Myc J3.** Eine Modifikation von pCMV-Myc (Clontech), Jian Zhong, University of California [Liu & Burrigde, 2000] Der pCMV-Myc mammalia Expressionsvektorexprimiert ein Protein, das am N-terminalen c-Myc einen Tag-Epitop enthält. Das Tag-c-Myc-Epitop ist hochimmunreaktiv. Zusätzlich besitzt der Vektor eine Multiplen-Clonings-Site (MCS), ein Polyadenylierungssignal des SV40 und eine Ampicillin-Resistenz für die Genexpression in *E. coli*.

**2.1.8. Zelllinien und Zellkulturmaterialien****PC12-Zellen :**

Stammen von einem Phäochromozytom (DSMZ Nr. ACC 159) [Greene & Tischler, 1976]. Es wurde festgestellt, dass wenn sich die PC12-Zellen in der entsprechenden Umgebung befinden, Katecholamine (Dopamin, Norepinephrin) ausschütten können. Als Antwort auf den Wachstumsfaktor NGF konnte ein reversibler Neuronalen-Phenotyp induziert werden. [Greene & Tischler, 1976] [Levi et al., 1985]. Die Linie wurde von ATCC (CRL. 171) in Rockville, Maryland, USA, erworben.

CHO-Zellen: (Chinese-Hamster-Ovary-Cells) (**ATCC, Rockville, USA**).

Die CHO/ $\alpha$ 1-Zellen exprimieren stabil die  $\alpha$ 1-Integrin-Untereinheit [Vossmeier et al., 2000].

SCC25-Zellen: (Tong-Squamous-Carcinoma-Cell, Human) (**ATCC, USA**)

Diese Tumor-Zellen sezernieren eine Laminin-5-reiche Matrix.

ES-Zellen: (embryonale Stammzellen der Maus) (Embryonic-Stem-Cells) (**AG Reutter**).

RLF : (Rattenlungen-Fibroblasten) (**ATCC, USA**)

NBT II: (Blasenkarzinom der Ratte) (Rat-Bladder-Carcinoma-Cells) (**ATCC, USA**).

BRE: (Rattenhirn-Endothelzellen) (Rat-Brain-Endothel-Cells) (**B.Öbrink, Stockholm Schweden**).

Die Zellkulturartikel wurden von den Firmen Falcon (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) und TPP (Renner, Darmstadt) bezogen.

Bei den verwendeten Zellkulturmaterialien handelte es sich entweder um sterile Einwegartikel, oder sie wurden im Labor durch Autoklavieren sterilisiert.

Matrixproteine:

Kollagen Type IV	(humane Plazenta)	Sigma
Fibronectin	(humane Plazenta)	Sigma
Laminin-1	(EHS-Sarkom, Maus)	Sigma / Roche
Laminin-10 /11	(humane Plazenta)	chemicon
Poly-L-Lysin		Sigma
Laminin-5-reicher Matrix (von SCC25-Zellen)		AG Reutter

Wachstumsfaktoren:

NGF (7S) (Speicheldrüse der Maus) Roche

Medien für die Kultivierung von Zellen:

<u>Medium für PC12-Zellen:</u>	0,3	g	Glutamin
	1	ml	500 x PEN / STREP
	50	ml	HS 10%
	mit RPMI 1640 ad 500 ml (F 1215, Biochrom KG)		

Medium für CHO/α1-Zellen:

700-800	mg/l	Geniticine
50	ml	FKS 10%
0,3	g	Glutamin

mit αMEM ad 500 ml (F 0925, Biochrom KG)

Medium für SCC25-Zellen:

400	ng/ml	Hydrocortisone
1	ml	500 x PEN/STREP
50	ml	FKS 15%

mit Ham's F-12 Medium (F0815) 45%, DMEM Medium (F 0415, Biochrom) 45%, ad 500ml

Medium für RLF-Zellen:

0,3	g	Glutamin
1	ml	500 x PEN/STREP
50	ml	FKS 20%

mit RPMI 1640 ad 500 ml

Medium für ES-Zellen:

0,3	g	Glutamin
1	ml	500 x PEN/STREP
75	ml	FCS 15%
1	ml	β-Mercaptoethanol
5	ml	Nicht-essentielle Aminosäuren
6	ml	Nukleoside
1	ml	LIF (leukemia-Inhibiting-Factor) 10 <sup>6</sup> Units/500 ml Medium

mit DMEM ad 500 ml

Medium für NBT-II-Zellen:

0,3	g	Glutamin
1	ml	500 x PEN/STREP
50	ml	FKS 10%

mit DMEM ad 500 ml

Medium für RBE-Zellen:

0,3	g	Glutamin
1	ml	500 x PEN/STREP
50	ml	FKS 20%

**2.1.9. Enzyme, Kits und Marker**Kits:

BCA Protein Assay Kit  
RNeasy-Mini-Kit  
Plasmid-Mini-Kit  
Plasmid-Midi-Kit  
Plasmid-Maxi-Kit

Pierce, Rockford, USA  
Quiagen, Hilden  
Quiagen, Hilden  
Quiagen, Hilden  
Quiagen, Hilden

Enzyme:

Reverse Transkriptase (Superscript)	Gibco BRL, Detroit, USA
Taq-Polymerase	Perkin-Elmer, Überlingen
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas

Marker:

Protein-Molekulargewichtsstandards:

Prestained Molecular Weight Standard (185, 116, 84, 61,5, 55, 36, 31 kD)	Sigma, München
Precision Plus Protein Standards Dual Color: (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 25, 20, 15, 10 kD)	Bio-Rad, Deutschland
DNA-Molekulargewichtsstandard: 1 kB-Basenpaar-Leiter 1 kB Plus DNA-Leiter	Gbco-BRL, Detroit, USA Invitrogen, Leek , Niederlande

mit RPMI 1640 ad 500 ml

**2.1.10. Sonstige Materialien**

Photomaterialien stammten von Kodak:	Röntgenfilme : X-Omat AR und Biomax ML Röntgenfilmentwickler LX-24 Entwickler und Fixierer GBX
und von Polaroid:	Schwarzweiß-Sofortbilder Typ 667
Nitrozellulose-Membran:	Schleicher & Schüll, Dassel
ROK $\alpha$ -Inhibitor Y27632	Bayer

Antibiotika:

Ampicillin	Boehringer Mannh.
Geneticin	PAA
Penicillin	PPA
Streptomycin	PAA

Trypsin:

Accutase	PAA
Viralex	PAA

**2.2 Methoden****2.2.1. Zellbiologische Methoden**

Alle verwendeten Materialien wurden durch Autoklavieren für 20 min bei 120°C oder durch Erhitzen auf 130°C für 8 h sterilisiert. Nicht zu autoklavierende Lösungen wurden steril filtriert (0,22  $\mu$ m).

### 2.2.1.1. Passagieren von Zellen

In Kultur wachsen strikt adhärenente Zellen nicht mehr weiter, wenn die als Substrat dienende Kulturschale von den Zellen vollständig eingenommen ist. Tumorzellen können bei entsprechend häufiger Erneuerung des Mediums zwar weiterwachsen, jedoch sinkt bei hoher Zelldichte die Proliferationsrate der Zellen stark ab. Gleiches gilt auch für in Suspension wachsende Zellen. Daher ist es notwendig, die Zellen unter Verdünnung in ein neues KulturGefäß zu überführen. Dieser Vorgang wird als „Passagieren,“ der Zellen bezeichnet.

Die Zellsuspension wurde aus dem KulturGefäß in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und für 3 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in wenig frischem Medium resuspendiert und in ein mit frischem Medium gefülltes KulturGefäß überführt.

### 2.2.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zu den noch gefrorenen Zellen wird vorgewärmtes Medium pipettiert und sofort in eine Kulturschale mit vorgewärmtem Medium überführt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis die gesamte Zellsuspension aufgetaut ist.

Zum Einfrieren werden  $1 \times 10^5$ - $10^6$  Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert und in 1 ml FKS mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wird in Einfrierröhrchen überführt und für 2 h bei  $-20^\circ\text{C}$  gefroren. Danach können sie bei  $-80^\circ\text{C}$  oder für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff gelagert werden

### 2.2.1.3. Herstellung der Laminin-5-reichen Matrix

Die Laminin-5-reiche-Matrix wird von SCC25-Zellen (squamous cell carcinoma) sezerniert. SCC25-Zellen werden in Kulturschalen (10 cm, 6 cm, 3 cm, 96-Well-Mikrotiterplatten (TPP, Renner, Darmstadt) und auf Glassobjekträger) mit Ham's F-12 Medium 45%, DMEM Medium 45%, 15% FCS und Antibiotika kultiviert. Nach 7-10 Tagen werden die SCC25-Zellen mit  $1 \times$  Viralex in PBS/EDTA von der Platte abgelöst.

Die auf den Platten deponierte Laminin-5-reiche-Matrix wird 2 x mit PBS gewaschen.

Anschließend werden die Schalen steril getrocknet und bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Die abgelösten SCC25-Zellen werden auf neue Kulturschalen replattiert und für weitere 7-10 Tagen in Kultur gehalten.

### 2.2.1.4. Differenzierungsassay von PC12-Zellen

Die PC12-Zellen werden mit NGF stimuliert und auf Kollagen IV-(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), Laminin-1-(20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichteten Petrischalen oder auf Laminin-5-reicher Matrix ausplattiert.

Die Zellen werden mit NGF (100  $\text{ng}/\text{ml}$ ) stimuliert und bis zu 3 Tagen in Kultur gehalten. Anschließend werden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und mit 4% PFA 10 min bei RT fixiert. Die Fixierlösung wird durch 2maliges Waschen mit PBS herausgespült und mit 0,1% Kristallviolett für 20 min bei RT gefärbt. Nach dem Trocknen der Zellen werden diese mit 40 x Objektiv am Zeiss-Mikroskop fotografiert.

Um zu prüfen, ob verschiedene Integrin-Untereinheiten am Neuritenwachstum beteiligt sind, wurde die Funktion der  $\alpha 1$ -,  $\alpha 3$ -,  $\alpha 6$  und  $\beta 1$ -Integrin-Untereinheiten mittels 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  funktionsblockierender Antikörper während der Differenzierung blockiert.

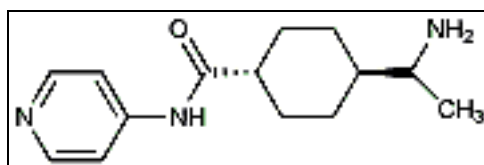
Nach Aufnahme der Zellen mit einem 40 x Objektiv, wurden die Neuriten auf eine Durchsichtfolie nachgezeichnet und die in Photoshop als Pixel umgerechnet. Die Pixelzahl ergibt die gesamte Neuritenlänge, die durch die Zahl der Zellen geteilt wurde, um die Neuritenlänge pro Zelle zu erhalten.

Verwendete funktionsblockierende Antikörper:

Antikörper (10 µg/ml)	Integrin-Untereinheit
33.4	α1-Integrin
Ralph 3.2	α3-Integrin
GoH3	α6- Integrin
Ha2/5	β1-Integrin
BM165	α3-Kette des Laminin-5

### 2.2.1.5. Behandlung der PC12-Zellen mit dem ROKα-Inhibitor Y27632

Die Rho-Familie der kleinen GTPasen sind in der Regulation des Neuritenwachstums involviert [Kozma et al., 1997]. Um zu untersuchen, ob dieser Signalweg Integrin-abhängig induziert werden kann, wurden die jeweiligen Versuchsansätze im Differenzierungsassay mit dem ROK/α-Inhibitor Y27632 behandelt, einen Inhibitor der Rho-assoziierten Kinase, der die RhoA-Inhibition durch NGF aufhebt. PC12-Zellen wurden auf Laminin-1 und auf Laminin-5-reicher Matrix ausplattiert, mit 100 ng/ml NGF stimuliert und mit Y27632 in verschiedenen Konzentrationen (10 µM, 50 µM und 100 µM) und für 72 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Weiteren wird wie für den Differenzierungsassay beschrieben verfahren.



Y27632

### 2.2.1.6. Etablierung der transienten Transfektion von eukaryontischen Zellen

#### Lipofektion

Durch die Methode der Lipofektion können cDNAs in eukaryontischen Zellen eingebracht werden. PC12-Zellen wurden auf Laminin-1 oder Laminin-5-reicher Matrix-beschichteten Schalen (Ø 10 cm) ausplattiert und bei 37°C mit RPMI und mit 10% HS ohne Penicillin unter CO<sub>2</sub>-Begasung (5%) über Nacht kultiviert. Die adhären Zellen wurden anschließend mit den cDNAs (pCMV-IL2R, pCMV-IL2R-α3 und pCMV-IL2R-α1) transfiziert. Für die transiente Transfektion wurde das Lipofectamin TM 2000 Reagenz und das OPTI-MEM I-Medium von Gibco BRL verwendet, dabei wurde folgendes Transfektionsprotokoll etabliert:

Schale (Ø)	DNA (µg)	Lipofectamin (µl)	Opti-Mem-DNA (µl)	Opti-Mem-Lipofectamin (µl)	End-Volumen (ml)
<b>6 cm</b>	4	20	480	480	1
<b>10 cm</b>	11.2	60	1440	1440	3
<b>20 cm</b>	22.4	120	2880	2880	6

Für eine optimale Transfektion wird die DNA bzw. das Lipofectamin in serumfreiem Medium ohne Antibiotika verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Schließlich wird die DNA und das Lipofectamin gemischt und für weitere 15 min inkubiert.

Dies ermöglicht die DNA-Lipofectamin-Komplex-Bildung. Dieser Komplex wird auf adhärenzte PC12-Zellen gegeben. Die Transfektionsreaktion erfolgt in RPMI-Medium 10% HS, Glutamin ohne Antibiotika. Nach 24 h werden die Zellen mit PBS/EDTA abgelöst, auf Laminin1 oder Laminin-5-reicher Matrix-beschichteten Schalen replattiert und mit RPMI Medium 10% HS, Glutamin mit Antibiotika versetzt. 24 h nach der Transfektion wird NGF (100 ng/ml) hinzugefügt. Die Zellen werden für weitere 48 h in Kultur gehalten.

Nach 72 h werden die Zellen abgelöst und für nachfolgende Analysen (Immunblot, FACS, Adhäsion, Proliferation, und Immunfluoreszenz) eingesetzt.

Für Proliferationsassays werden die Zellen schon 24 h nach der Transfektion mit PBS/EDTA abgelöst und mit PBS gewaschen, DNA auf einer mit Matrix beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte ausplattiert.

### Doppel-Transfektion von PC12-Zellen

Zur Untersuchung der Rolle der kleinen Rac1-GTPase bei  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin-abhängigen Prozessen, werden PC12-Zellen auf Laminin-5 reicher-Matrix ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert (95% dicht). Nach 24 h erfolgt die Transfektion mit den chimären Rezeptoren (IL2R- $\alpha 3$  und IL2R). Auf einer 10 cm-Kulturschale werden 11,2  $\mu$ g DNA eingesetzt und mit jeweiligen Rac1-Konstrukten (s. Kapitel 2.1.12). Als Kontrolle wurde der pCMV-Myc-Vektor ohne die Inserts verwendet. RacN17, RacL61 oder der Kontroll-Vektor wurden gleichzeitig mit IL2R- $\alpha 3$  oder IL2R in PC12-Zellen mittels Lipofectamin 200 TM Reagenz transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen neu replattiert und für weitere 48 h mit NGF (100 ng/ml) in Kultur gehalten.

Für die CHO/ $\alpha 1$ -Zellen wurden in  $\alpha$ MEM mit 10% FKS ohne Penicillin für die Transfektion kultiviert. Das gleiche Protokoll wie für die PC12-Zellen wurde hier verwendet (auf einer 10 cm-Kulturschale werden 11,2  $\mu$ g DNA), nur die Zeiten sind hier verändert worden.

CHO-Zellen proliferieren, besitzen eine höhere Proliferationsrate als PC12-Zellen, deshalb wurden die CHO-Zellen 24 h nach der Transfektion in serumhaltiges Medium für die indirekte Immunfluoreszenz und FACS-Analysen eingesetzt.

### Nucleofektion

Die Nucleofektion mit dem Amaxa-Nucleofector-Kit verspricht eine höhere Transfektionsrate (80%) als die Transfektion mittels Lipofectamin bei PC12-Zellen.

Die Zellzahl der PC12-Zellen aus einer 75 cm<sup>2</sup>-Flasche wird bestimmt. Es werden 2 x 10<sup>6</sup> Zellen für die Nucleofektion eingesetzt. Diese Zellen werden bei 900 rpm abzentrifugiert und das Pellet mit 1ml Viralex in PBS/EDTA für 10 min inkubiert, um die Zellen zu vereinzeln. Die Reaktion wird zur Gabe von 500  $\mu$ l Medium mit 10% Pferdeserum gestoppt. Anschließend werden die Zellen bei 700 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in 100  $\mu$ l Nucleofektionsreagenz resuspendiert, mit 5  $\mu$ g cDNA versetzt und mittels Programm U29 im Amaxa-Gerät transfiziert. Die transfizierten Zellen werden in einer mit Medium vorinkubierten 6-Well-Platte (1,5 ml Medium/Well) transferiert und bei 37°C für 24 h inkubiert.

#### **2.2.1.7. Adhäsionsassay zur Untersuchung von Zell-Matrix-Wechselwirkung**

Die Fähigkeit, von Zellen auf Matrixproteinen zu adhären, kann im Adhäsionsassay getestet werden.



Die dabei involvierten Integrine der Zellen können durch Hemmung der Adhäsion mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden. Die absolute Zellzahl der eingesetzten lebenden Zellen wird durch unspezifische Adhäsion auf Poly-L-Lysin ermittelt. Die Zahl der adhären-ten Zellen wird nach der Färbung der fixierten Zellen photometrisch im ELISA-Reader be-  
stimmt.

96-Well-Mikrotiterplatten (TPP, Renner, Darmstadt) werden über Nacht bei 4°C mit jeweils 100 µl/Well Fibronectin, Laminin-1 und Kollagen IV (je 20 µg/ml in PBS) und Poly-L-Lysin (1:10 Verdünnung in PBS) beschichtet. Die Platten werden mit PBS gewaschen und mit 1% (w/v) BSA in PBS für 4 h bei 4°C abgesättigt.

PC12-Zellen, die auf Matrixprotein-beschichteten Kulturschalen wuchsen, werden mit 0,05% EDTA in PBS von der Schale gelöst. Die Zellen wurden für Adhäsionsassays einge-  
setzt.

NBT II- und RBE-Zellen werden von den Kulturplatten mit 1 x Accutase in PBS/EDTA (RBE-Zellen) oder mit 1 x Viralex in PBS/EDTA (NBT II-Zellen) abgelöst und anschließend 1 x mit PBS gewaschen und für einen Adhäsionsassay eingesetzt.

Nach dreimaligem Waschen der beschichteten 96-Well-Mikrotiterplatten werden 100 µl/well Zellsuspension ( $1 \times 10^6$ /ml) zugegeben.

Die Adhäsion erfolgt 2 h bei 37°C. Anschließend wird die Platte mehrmals mit PBS gewa-  
schen, um nicht-adhären- te Zellen zu entfernen. Die adhären-ten Zellen werden für 15 min mit 1% Glutardialdehyd in PBS fixiert und gewaschen. Zur Quantifizierung der Zellen werden diese mit 0,1% Kristallviolett (Hexamethylparafuchsin, in aq.bidest.) für 25 min gefärbt. Der Farbstoff wird gründlich mit aqua bidest. herausgewaschen und bei RT getrocknet. Die Zellen werden mit 0,1% Triton in aqua bidest., für 1 h Stunde lysiert. Die Färbung wird bei 570 nm im ELISA-Reader photometrisch bestimmt. Mittelwerte werden von mindestens vier Wells pro Ansatz bestimmt. Die Fehler stellen die Standardabweichung dar.

#### **2.2.1.8. Proliferationsassay**

Bei diesem Assay beruht die Quantifizierung der Zell-Proliferation auf der Messung des Ba-  
senanalogons BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin). Zur Messung der Proliferation wurde der Cellproliferation-ELISA-BrdU-Colorimetric-Kit der Firma Roche eingesetzt. 96-Well-  
Mikrotiterplatten werden über Nacht bei 4°C mit jeweiligen Matrixproteinen, Laminin-1, Kollagen IV, Fibronectin und Poly-L-Lysin) beschichtet.

Transfizierte PC12-Zellen werden in 100 µl/Well nicht konfluent ( $1 \times 10^6$ /ml) auf die be-  
schichtete 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät. 48 h nach der Transfektion wird das BrdU zu-  
gegeben, so dass es in den weiteren 24 h eingebaut werden kann. 72 h nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 200 µl FixDenat fixiert und denaturiert. Für 90 min wurde ein gegen das in die DNA eingebaute BrdU gerichteter, Peroxidase-gekoppelter Antikörper dazugegeben. Durch die Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin kommt es zu einer Blaufärbung in Abhängigkeit von der Zellzahl. Bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde die Proliferationsrate im ELISA-Reader gemessen.

#### **2.2.1.9. Durchflusscytometrie/FACScan (Fluorescence-Activated-Cell-Scanning)**

In der Durchflusscytometrie werden Zellen einzeln in einem Flüssigkeitsstrom an einem Analysepunkt vorbei geleitet (hydrodynamische Fokussierung), wo sie auf ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften hin durch einen Laser untersucht werden. Am Analysepunkt kann anhand des Vorwärtsstreulichts des Laserstrahls die Zellgröße und anhand des Recht-  
winkelstreulichts die Zelldichte und Granularität bestimmt werden.

Die Zellen können des weiteren durch Markierung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen bestimmte Proteine charakterisiert werden. Es können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig gemessen werden, wenn sich ihre Absorptionsspektren überlappen, ihre Emissionsspektren aber unterschiedlich sind.

Für die FACS-Analyse werden pro Ansatz ca.  $1 \times 10^5$  Zellen in PBS suspendiert und gut verteilt. Die Zellen werden bei 900 rpm pelletiert und in 500  $\mu$ l primärer Antikörperlösung in PBS aufgenommen. Die Zellen werden für 45 min auf Eis inkubiert und 3 x mit 2 ml PBS gewaschen. Es folgt eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 45 min auf Eis im Dunkeln. Für die Feststellung des Nullwertes werden Vektor- transfizierte Zellen (IL2R) nur mit dem sekundären Antikörper gefärbt.

Nach viermaligem Waschen werden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und im Lysis II-Programm des FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

#### Verwendete Erstantikörper:

Antikörper	Verdünnung in PBS
Anti- $\alpha$ 1-Integrin: 33.4, monoklonal	1:200
Anti- $\alpha$ 3-Integrin: P1B5 (Ascitis), monoklonal	1:200
Anti- $\alpha$ 6-Integrin: GoH3, monoklonal	1:200
Anti- $\beta$ 1-Integrin/FITC, monoklonal	1:200
Anti-IL2R/FITC, monoklonal	1:50

## 2.2.2. Biochemische Methoden

### 2.2.2.1. Solubilisation von Zellen

Etwa 20 ml PC12-, RBE, NBT II und ES-Zellen (entsprechend dem Inhalt einer 10 cm-Zellkulturschale) werden 3  $\mu$ l min bei 500 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird einmal mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 150  $\mu$ l Solubilisationspuffer und 3  $\mu$ l Proteaseinhibitormix aufgenommen. Nun wird für 1 h bei 4°C stark geschüttelt, wobei das im Solubilisationspuffer enthaltene Detergenz-Triton X-100 die Zellen solubilisierte. Die abschließende Zentrifugation bei 10000 g und bei 4°C lieferte im Überstand das Membransolubilisat. Dieses Solubilisat kann bei -20°C gelagert werden.

### 2.2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode [Smith et al., 1985]

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurden die Reagenzien Lösung A (enthält u. a. die Bichinolin-4-Carbonsäure) und Lösung B (4 %  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) der Firma Pierce verwendet.

Proteine reduzieren im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ . Bichinolin-4-Carbonsäure reagiert mit  $\text{Cu}^+$ , wobei zwei Bichinolin-4-Carbonsäure-Moleküle einen intensiv purpurgelbten Chelatkomplex mit einem  $\text{Cu}^+$ -Ion eingehen.

Für die Proteinbestimmung wurde von der zu untersuchenden Probe und von einer BSA-Standardlösung (10 mg/ml) eine Verdünnungsreihe in einer ELISA-Platte erstellt. Jede Probe wurde anschließend mit 200  $\mu$ l der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen der Lösung A und einem Teil der Lösung B bestand, versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm gemessen und die Proteinkonzentration errechnet.

### 2.2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen [Laemmli, 1970]

Proteine können unter denaturierenden Bedingungen durch eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden, wobei unter denaturierenden Bedingungen die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur molekularen Masse des jeweiligen Proteins ist. Die zu analysierenden Proben (entsprechend jeweils 50 µg Protein) wurden mit einem Fünftel Volumen 5 x Probenpuffer versetzt und durch fünfminütiges Kochen im Wasserbad denaturiert. Für das Trenngel wurde eine 7,5%ige Trenngellösung bis ca. 3 cm unterhalb des oberen Glasplattenrandes gegossen und vorsichtig etwa 0,5 cm hoch mit 50%igem Isopropanol überschichtet.

Nach 30 min war das Trenngel polymerisiert, und das Isopropanol konnte abgegossen werden. Das Trenngel wurde nun mit einer 4%igen Sammelgellösung überschichtet. Das so erhaltene Gel war 0,1 cm dick und besaß eine Trenngelstrecke von 7 cm. Die Sammelgelstrecke betrug 2 cm. Nun wurden die Proben und 15 ml eines Molekulargewichtstandards aufgetragen und die Elektrophorese bei 200 V durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Front den Fuß des Gels erreicht hatte.

### 2.2.2.4. Nachweis von Proteinen mittels Westernblot-Analyse [Towbin et al., 1979]

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die so aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert.

Eine Blotkammer (Biorad) wurde mit Blot-Kammerpuffer gefüllt und das auf eine Nitrocellulosemembran aufgelegte Gel in diese eingespannt. Unter Kühlung im Eisbad wurden nun bei einer Spannung von 100 V innerhalb von einer Stunde die Proteine auf die Membran übertragen. Die Proteine werden durch zweiminütige reversible Färbung mit Ponceau-Rot sichtbar gemacht. Das Entfärben erfolgte mit Wasser; anschließend wurde die Membran mit PBS vollständig entfärbt und 1 h in 10%iger Magermilch-Suspension (in PBS) blockiert. Nun wird die Blotmembran 2 x 15 min in PBS gewaschen und anschließend der erste Antikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgt schüttelnd über Nacht bei 4°C. Danach wird die Blotmembran zunächst 4 x 15 min mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei RT auf dem Schüttler mit einem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Abschließend wird die Blotmembran 4 x 15 min in PBS gewaschen.

Für den Nachweis von Tyrosin-Phosphat wird die Blotmembran mit 2% BSA FRac1tionV/pH 7 (Serva, Heidelberg) in TBS-Earp abgesättigt. Inkubation mit dem PT66 (1:2000 in Blockierungspuffer) erfolgt für 1 h. Alle Waschschritte und Verdünnungen werden mit TBS/Earp durchgeführt.

#### Verwendete Erstantikörper:

Antikörper	Verdünnung in PBS
Antiserum, Integrin $\alpha 3$	1:100
Anti-Integrin $\alpha 3$ (Klon 42)	1:500
Anti-Integrin $\alpha V$	1:500
AS7K4, monoklonal, gegen $\beta 1$ -Integrin	1:200
5B8, monoklonal gegen NCAM	1:200
(CD49f) gegen $\alpha 6$ -Integrin	1:500
AS3K5, polyklonal gegen $\alpha 1$ -Integrin	1:500
Anti-L2-sR $\alpha$ (N19) gegen IL2/Rezeptor	1:500
Anti-N-Cadherin gegen N-Cadherin	1:500

Anti-Laminin-1, gegen die $\beta$ 1-Kette	1:500
Anti-Laminin-5, gegen die $\gamma$ 2-Kette	1:500
Anti-c-Myc, gegen den c-Myc-Tag	1:500

### 2.2.2.5. Entwicklung des Immunoblots mit Luminol

Die mit primären und sekundären Antikörpern markierten Proteine auf der Membran können durch die ECL (Enhanced-Chemiluminescence) -Methode nachgewiesen werden. Die am Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert eine Reaktion, die von einer Chemilumineszenz begleitet wird, die detektiert werden kann. Die Membran wird mit Whatman-Papier getrocknet und anschließend mit einer Mischung aus 10  $\mu$ l Luminol-Lösung A, 1 ml Luminol-Lösung B und 3  $\mu$ l Luminol-Lösung C für 1 min inkubiert.

Nach Trocknen mit Whatman-Papier wird die Membran in eine Folie gelegt und für 5 sec bis 20 min mit dem Imager der Firma analysiert. Werden sehr schwache Signale erwartet, wird der Blot einem Röntgenfilm exponiert, der anschließend in Entwickler- und Fixierlösung manuell entwickelt wird.

### 2.2.2.6. Färben der Gele

#### Silberfärbung

In der Silberfärbung bilden Ag-Ionen Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Die Ag-Komplexe werden durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert. Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von geringen Proteinmengen, die untere Grenze liegt bei 10 ng pro Bande. Sie wird nach Heukeshoven und Dernick durchgeführt. Das Gel wird mindestens 20 min in Fixierlösung gebadet und anschließend 3 mal für 5 min in Ethanol/aqua bidest. (1:2) gewaschen. Es folgt eine einminütige Inkubation des Gels in der Silbernitratlösung, dreimaliges Waschen für 20 s in aqua bidest. und Inkubation für 20 min in Silbernitratlösung. Nach zweimaligem Waschen wird das Gel in der Entwicklungslösung so lange inkubiert, bis die gewünschte Intensität erreicht ist. Die Reaktion wird durch Waschen in 1% Essigsäure in aqua bidest. gestoppt. Anschließend wird das Gel nochmals gewaschen und fixiert.

### 2.2.2.7. Nachweis der Laminin-5-reichen Matrix

Für die Beschichtung von Petrieschalen mit LN5-reicher Matrix wurden SCC25-Zellen auf die Platten ausgesät. Diese Carzinoma-Zellen sezernieren in das Kulturmedium Laminin-5-reicher-Matrix die nach einigen Tagen auf die Platte deponiert wird. Nach Ablösen der Zellen wird die Matrix von einer 10  $\varnothing$  cm Schale mit 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 0,5 x Proben-Puffer im Wasserbad erhitzt, die abgeschabte Matrix wird auf eine zweite Schale mit Laminin-5-reicher Matrix übertragen und wieder mit 250  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 0,5  $\mu$ l 5 x Proben-Puffer noch einmal erhitzt. Nach dem einige  $\mu$ l eingedampft sind, wird der Rest der Matrix in ein Eppendorf-Gefäß überführt und DTT zugegeben, das Gemisch wird aufgeköcht bei 95°C für 5 min und anschließend auf ein 7%iges Gel aufgetragen. Die Blotmembran wurde mit einem anti-Laminin 5 BM165 inkubiert welcher die  $\gamma$ 2-Ketten des Laminin-5 erkennt.

### 2.2.3. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.3.1. Chromatographische Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi-Plasmid-Präparation): (Qiagen-Protokoll, modifizierte Methode)

Für die Maxi-Plasmid-Präparation werden die mit den jeweiligen cDNAs transformierten E.coli-Zellen (HB101) in 300 ml LB-Vollmedium mit Ampicillin (1:1000) über Nacht bei 37°C in Schüttelkulturen bei 220 rpm angezchtet. Anschließend wird die Maxi-Präparation nach dem "Quiagen-Maxi-Protokoll" durchgeführt.

Es handelt sich hierbei um einen Anionenaustauscher, der unter den gegebenen Bedingungen Plasmid-DNA bindet. Reste chromosomaler DNA und andere Verunreinigungen können auf diese Weise entfernt werden. Die Plasmid-DNA wird schließlich durch Erhöhung der Salzkonzentration und des pHs von der Säule eluiert. Die so gewonnene Plasmid-Präparation kann für Reaktionen, die einen hohen Reinheitsgrad erfordern, beispielsweise Sequenzreaktionen oder Transfektionen, verwendet werden.

Zellen von 300 ml einer Übernachtskultur wurden für 10 min bei 5000 rpm sedimentiert. Das Zellpellet wird in 10 ml Lösung I mit 2mg/ml Lysozym resuspendiert.

Nach Zugabe von RNase A (0,5 mg/ml) wird der Ansatz für 5 min bei Raumtemperatur und 15 min auf Eis inkubiert.

Es werden 10 ml Lösung II zupipettiert, vorsichtig gemischt und nach weiteren 5 min auf Eis erfolgt die Fällung der genomischen DNA durch Zugabe von 4,5 ml Lösung III, kräftigem Mischen und 30 minütiger Inkubation auf Eis. Nach Zentrifugation für 15 min bei 16000 rpm (SS-34-Rotor) wird der Plasmid-haltige Überstand abgenommen und bei 4°C aufbewahrt. Die Qiagensäulen werden zunächst mit 10 ml Lösung QBT (zusätzlich 0,15% Triton X 100) äquilibriert.

Der Überstand wird auf die Säule aufgetragen und anschließend zweimal mit 2 x 30 ml Lösung QC gewaschen. Die Elution erfolgt mit 15 ml QF. Die Plasmid-DNA wird mit 10,7 ml für 30 min bei 11000 rpm Isopropanol gefällt. Der Überstand wird entfernt und das Pellet mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen für 10 min bei 11000 rpm und nach dem Trocknen in 300 µl aufgenommen.

#### 2.2.3.2. Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen [Brooks, 1987]

Nachdem die Plasmide isoliert werden, wird ein enzymatischer Verdau durchgeführt zur Überprüfung der Richtigkeit der Fragmentgrößen. Für die Analyse von DNA-Molekülen wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Es handelte sich um Enzyme, die eine 4-6 bp lange, palindromische Sequenz erkennen. Sie schneiden spezifisch innerhalb oder in der Nähe dieser Sequenz, ohne dafür ATP zu benötigen.

Analytische Verdau wurden mit ca. 2 µg DNA, 13 Units des jeweiligen Restriktionsenzym unter den von der Lieferfirma angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Das Gesamtvolumen betrug meist 15 µl. Der Ansatz wurde für mindestens 3 h bei der für das Enzym angegebenen Temperatur, in der Regel 37°C, inkubiert. RNA-haltige Proben wurden zusätzlich für 30 min mit 1 µl RNase A (0,5 mg/ml) behandelt. Es wurden 5-10 µg DNA eingesetzt und sowohl Enzymmenge als auch Gesamtvolumen entsprechend erhöht (100 bzw. 600 µl je nach DNA-Konzentration). Präparative Spaltungen erfolgten immer über Nacht. Alle Verdauansätze wurden auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.3.3. Analytische Agarose-Gelelektrophorese [Sambrook et al., 1989]

DNA-Moleküle können abhängig von ihrer Größe mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer Moleküle ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Dieses wird durch einen mitlaufenden Standardgrößenmarker bestimmt. Es können DNA-Mengen von bis zu  $1 \hat{E}ng$  nachgewiesen werden. Gelelektrophoresen werden zur Größenbestimmung nach Restriktionsverdau und zur Isolierung präparativ gespaltener DNA-Fragmente benutzt. Die aufgetrennten Fragmente werden durch Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert und unter UV-Licht eine rötliche Fluoreszenz abgibt, sichtbar gemacht. Da die Fluoreszenzintensität sowohl von der Fragmentgröße als auch von der DNA-Menge abhängig ist, kann durch Vergleich mit der Fluoreszenz der Markerbanden die ungefähre DNA-Menge einer Bande abgeschätzt werden.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte horizontal in 1,5%igen (w/v) Agarosegelen. Die Agarose (Pharmacia-LKB) wurde durch Kochen in TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf etwa  $50^{\circ}C$  in die entsprechenden Gelschlitten gegossen (Dicke ca. 0,4 cm).

In die noch flüssige Agarose wurde ein Kamm eingesetzt, der nach dem Herausziehen aus der erstarrten Agarose die Probenaschen bildete.

Das Gel wird in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben werden mit einem Zehntel Volumen BPB-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Das Auftragsvolumen lag bei analytischen Gelen zwischen 10 und 20  $\mu l$ . Als Größenstandard dient ein 1 kb-Leiter-Marker (25 ng/ $\mu l$ , Gibco BRL), von welchem 10  $\mu l$  aufgetragen werden.

Die Elektrophorese erfolgt bei 70-80 V, bis der Farbmaler (läuft bei ca. 500 bp) die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hat. Das Gel wird anschließend für 10 min in ein Ethidiumbromidbad (0,5  $\mu g/\mu l$ ) gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

### 2.2.3.4. Reinigung von DNA durch Phenolextraktion

Proteine, Lipide und andere Verunreinigungen werden aus DNA-Präparationen durch Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) entfernt.

Die wäßrige DNA-Lösung (mindestens 100  $\mu l$ ) wird mit einem Volumen des P/C/I-Gemisches versetzt und nach kräftigem Mischen 5 min bei 12000 g abzentrifugiert. Die DNA-haltige, obere wäßrige Phase wird abgenommen. Die organische untere Phase und die Interphase enthalten die extrahierten Proteine und hydrophoben Moleküle. Aus der wäßrigen Phase werden Phenolreste durch Zugabe von einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), Mischen und Zentrifugieren entfernt. Dieser Vorgang wird wiederholt. Phenolverunreinigungen stören aufgrund ihrer Protein-denaturierenden Eigenschaften anschließende Enzymreaktionen. Die gereinigte DNA wird präzipitiert, getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

### 2.2.3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Durch Messung der Extinktion bei 260 nm kann die Konzentration von DNA oder RNA in einer Lösung bestimmt werden. Die Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50  $\mu g/ml$  doppelsträngiger DNA bzw. 20  $\mu g/ml$  einzelsträngiger DNA oder RNA. Die Reinheit der DNA in einer Probe kann durch das Verhältnis der Extinktionen von 260 nm zu 280 nm abgeschätzt werden. Saubere DNA-Proben zeigen einen Extinktionsquotienten von 1,8 bis 2,0. Bei Verunreinigungen durch Proteine oder Phenole steigt der Wert über 2,0. Die Extinktionen wurden mit einem Spektralphotometer gemessen.

### 2.2.3.6. RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen (Quiagen)

Die RNA wird mittels des RNeasy™-Kits von Quiagen aus eukaryontischen Zellen isoliert. PC12-Zellen werden auf LN5-reicher Matrix beschichteten Schalen ausplattiert, mit NGF stimuliert und 3 Tage in Kultur gehalten. Die Zellen werden mit PBS/EDTA abgelöst und pelletiert und mit 600 µl RLT-Puffer im QIAshredder homogenisiert. Durch Zentrifugation werden unlösliche Bestandteile entfernt.

Es werden 600 µl 70% Ethanol zugegeben, gemischt und in eine RNeasy-Säule überführt. Nach dem Zentrifugieren bei 10000 rpm für 15 sec wird die Säule einmal mit 700 RW1-Puffer, und anschließend mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Nach nochmaligem Waschen mit 500 µl RPE-Puffer wird die Säulenmembran bei 2 min 13 000 rpm trocken zentrifugiert. Die RNA wird mit 2 x 25 µl Wasser in ein frisches Gefäß durch Zentrifugation bei 10 000 rpm eluiert.

### 2.2.3.7. Reverse Transkription (nach Perkin Elmer, Norwalk, USA)

Gesamt-RNA wurde durch das RNA-abhängige Enzym Reverse Transkriptase (Superscript, Gibco-BRL, Detroit, USA) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 10 µg der konzentrierten RNA-Lösung eingesetzt.

1 µl Oligo dT oder Random Primer  
6 µl RNase freies H<sub>2</sub>O

Der Ansatz wird für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gelagert. Ein Mix aus folgenden Reagentien wird hinzugefügt:

4 µl dNTP-Mix (10 mM insgesamt)  
4 µl 5 x First-Strand-Puffer  
2 µl 100 mM DTT  
1 µl Superscript

Der Ansatz wird für 60 min bei 37°C inkubiert (Transkriptionsreaktion) und anschließend für 5 min bei 90°C denaturiert.

### 2.2.3.8. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) [Saiki et al., 1988] [Mullis & Faloona, 1987]

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit der exponentiellen Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente *in vitro*. Dazu werden zwei Oligonukleotidprimer (15-20 Nucleotide lang) benötigt, die in gegenläufiger Orientierung flankierend der zur amplifizierenden Region, an den entgegengesetzten DNA-Strängen hybridisieren. Die DNA-Polymerase synthetisiert vom jeweiligen Primer aus in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang, so dass Sinn- und Unsinn-Strang synthetisiert werden. Die neu entstandenen Doppelstränge müssen durch Erhitzen zu Einzelsträngen denaturiert werden, damit sie nach erneutem Hybridisieren der Primer für die folgende Synthesereaktion als Matrize für die Polymerase dienen können.

Der Reaktionszyklus, der aus DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer und Synthesereaktion besteht, liefert nach jeder Wiederholung eine Verdoppelung der vorhandenen Matrizen-DNA und damit eine exponentielle Anreicherung der gewünschten Sequenz.

Für die PCR werden hitzestabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Bakterien verwendet, wie z.B. die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, so dass die Kettenreaktion in einem

Gefäß ohne erneute Zugabe von Polymerase nach jedem Denaturierungsschritt durchgeführt werden kann.

In dieser Arbeit wurde die Pfu-Polymerase aus dem thermophilen Archaeobacterium *Pyrococcus furiosus* verwendet. Diese Polymerase hat neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität eine 3'-5'-Exopolymerase-Proof-Reading-Aktivität, die falsch eingebaute Nukleotide erkennen und entfernen kann. Die Pfu-Polymerase hat eine 12 x höhere Genauigkeit als die Taq-Polymerase.

Für die PCR wurden folgende 50 µL-Ansätze mit Reagentien von Fermentas vorbereitet:

je 1 µl	5'-und 3'-Primer (50 µM)	
5 µl	10 x Taq-Puffer	(Fermentas)
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	(Fermentas)
2,5 µl	DNTPs (4 mM)	(Fermentas)
4 µl	Taq-Polymerase	(Fermentas)
30,5 µl	Aqua bidest.	
5 µl	cDNA	
(in 0,5 ml EppendorfGefässen)		

Zyklus :  
 für 15 sec bei 95°C: Denaturierung  
 für 30 sec bei 56 bzw 50°C: Primer-annealing  
 für 1 min bei 72°C: Synthese

Die Proben werden zu Anfang 3 min bei 95°C denaturiert. Nach 40 Zyklen wird die Reaktion beendet. Es folgte eine Run-off-Phase für 10 min bei 72°C, in der die Polymerase auslief, und eine 5 minütige Abkühlphase bei 4°C.

## 2.2.4. Histologische Methoden

### 2.2.4.1. Indirekte und direkte Immunfluoreszenz

#### Indirekte Immunfluoreszenz

Die Lokalisation zellulärer Proteine kann durch Fluoreszenz-Markierung und indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Objektträger werden über Nacht bei 4°C mit Matrixproteinen (20 µg/ml) oder Poly-L-Lysin (1:10 verdünnt) beschichtet und mit PBS gewaschen. PC12-Zellen werden 3 Tage lang bei 37°C im Brutschrank mit NGF inkubiert. CHO/α1-Zellen werden für 1 h serumfrei inkubiert und serumfrei 2 h auf den Objektträgern ausgesät. Die Zellen werden anschließend 3 x mit PBS gewaschen und die adhärennten Zellen mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zur Färbung intrazellulärer Proteine sowie zur Färbung des Aktin-Cytoskeletts werden die Zellen mit 0,025% Saponin in PBS für 10 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen werden die Objektträger für 20 min mit 1% BSA in PBS abgesättigt. Die Markierung mit dem primären Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C. Anschließend werden die Zellen 3 x gewaschen und für 1 h bis 2 h mit Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpern inkubiert.



Direkte Immunfluoreszenz

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden die transfizierten PC12-Zellen mit einem anti-IL2R/FITC gekoppelten Antikörper für den Nachweis der IL2R-Konstrukte inkubiert. Für die Detektion der Rac1-Konstrukte wurde der anti-c-Myc-Cy3 herangezogen.

Hierzu wird für 30 min mit Phalloidin (1:1000) in PBS bei RT inkubiert. Die Inkubation mit Fluoreszenz-gekoppelten Reagenzien erfolgt im Dunkeln.

Für die doppelt transfizierten IL2R/Rac1-Zellen wurde die Methode abgeändert. 48 h nach der Transfektion werden die Zellen zuerst mit 4%igem Paraformaldehyd für 10 min fixiert, DNA mit einem monoklonalen anti-IL2R-FITC über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen für 10 min mit 0,01% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und mit einem monoklonalen anti-c-Myc-Cy3, der die Rac1-Konstrukte erkennt, gefärbt, der auch ÜN-inkubiert wurde. Nach gründlichem Waschen werden die Objektträger getrocknet und mit Elvanol unter Objektgläschen eingedeckelt.

Die Ergebnisse werden am Zeiss-Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Bilder wurden als Photoshop-Dateien dokumentiert.

Verwendete Erstantikörper :

Antikörper	Verdünnung in PBS
Anti- $\alpha$ 1 Integrin: 33.4, monoklonal	1:200
Anti- $\alpha$ 3 Integrin: Ralph 3.2, monoklonal	1:500
Anti- $\alpha$ 6 Integrin: GoH3, monoklonal	1:500
Anti- $\beta$ 1-Integrin: Ha2/5, monoklonal	1:500
Anti-IL2R-FITC, monoklonal	1:50
c-Myc-Cy3-konjugiert	1:2000

**2.2.4.2. Elvanolherstellung**

Es werden 3 g Polyviol in 40 ml PBS gelöst und 16 h gerührt. Es werden 15 ml Glycerin zugegeben und weitere 16 h gerührt. Die Lösung wird 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverwendung dekantiert. 1 mg Phenylendiamin/ ml Gesamtvolumen werden zugegeben und lichtgeschützt gelöst. Der pH wird auf 8,0 eingestellt. Nach Lösen von 250  $\mu$ l Mercaptoethanol wird der Ansatz portioniert und bei -20°C aufbewahrt.