

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellen und Zellkulturtechnik

2.1.1 Humane Myelomzelllinien

Die humanen Myelomzelllinien MM.1S und AMO-1 wurden im Brutschrank bei 37°C kultiviert, bei einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%, um die Verdunstung des Mediums gering zu halten. Die Zelllinie MM.1S wächst teilweise adhärent, AMO-1 ist dagegen eine reine Suspensionszelllinie. Das RPMI 1640-Medium (PAA Laboratories) wurde mit 10% fötalem Rinderserum (FBS; Biochrom), 2 mM L-Glutamin (1x GlutaMAX-I; Invitrogen), 1 mM Natrium-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (die drei letztgenannten wurden von PAN Biotech bezogen) versetzt.

2.1.2 Gewinnung primärer Myelomzellen

Primäre Myelomzellen wurde aus Knochenmarkaspiraten von insgesamt 30 verschiedenen Patienten gewonnen. Alle sind zuvor in Übereinstimmung mit dem Helsinki-Protokoll aufgeklärt worden und haben ihre Zustimmung schriftlich gegeben. Eine Genehmigung der Ethikkommission der Universität Würzburg liegt vor.

Aus dem bluthaltigen Knochenmarkaspirat wurden die mononukleären Zellen mittels eines Ficoll-Gradienten isoliert. Die Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/cm³; Biochrom) wurde mit dem Knochenmarkaspirat, das zuvor im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt wurde, überschichtet und mit 2000 x g 15 Minuten zentrifugiert. Die mononukleären Zellen sammeln sich an der Phasengrenze zwischen verdünnter Probe und Ficoll-Lösung, die Erythrocyten befinden sich am Boden des Gefäßes. Anschließend wird eine positive Selektion auf den Oberflächenmarker CD138 durchgeführt, der nur von Plasmazellen exprimiert wird. Dazu werden die Zellen mit 4°C-kaltem Puffer aus PBS mit 5% FCS und 2,5 mM EDTA gewaschen und mit winzigen Metallkügelchen an die anti-CD138-Antikörper gebunden sind (Anti-CD138-Microbeats; Miltenyi Biotech) bei 4°C 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Probe über eine MACS-Säule, die in einem Magnet steckt gegeben, an der die CD138-positiven Zellen durch die Metallkügelchen hängen bleiben und der Rest von der Säule gewaschen wird. Die Säule wurde vom Magnet genommen und die CD138-positiven Zellen mit RPMI 1680-Medium von der Säule eluiert (Stühmer *et al.*, 2005).

Die Reinheit der Aufreinigung wurde von Zeit zu Zeit durch eine Pappenheim-Färbung überprüft. Dazu wurden 2 x 10⁴ der aufgereinigten Zellen mit einer Zytospin-Zentrifuge auf

Objektträger zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurden die Zellen erst nach May-Grünwald (für 5 Minuten) und anschließend nach Giemsa (für 20 Minuten) gefärbt. Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung war der Anteil an Plasmazellen immer über 90%.

2.1.3 Gewinnung von Knochenmarkstromazellen (KMSZ)

Die primären Knochenmarkstromazellen wurden nach einem in der Literatur beschriebenen Protokoll gewonnen (Prokop, 1997). Dazu wurden die mononukleären Zellen aus Knochenmarkaspiraten wie in 2.1.2 beschrieben verwendet. Diese wurden in DMEM-Medium (PAA Laboratories) mit 20% FBS, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natrium-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin für 4-6 Wochen kultiviert. Als Selektionskriterien wurde die Fähigkeit der Stromazellen zu adhärentem Wachstum und robuster Langzeitkultur genutzt. Adhärente Zellen aus dem hämatopoetischen System, wie beispielsweise Osteoklastenvorläufer sind kurzlebiger und werden tot zusammen mit den nicht-adhären Zellen beim Mediumwechsel entfernt. Nach ungefähr zwei Wochen erscheinen fibroblastäre Zellen die anfänglich stark, mit zunehmender Kulturdauer (ab ungefähr 6 Wochen) aber nur noch minimal proliferieren. So bildet sich ein fibroblastärer, einheitlicher Stromazellrasen.

2.1.4 Kokultur von Myelomzellen mit KMSZ

Für die Experimente zur Viabilität der Myelomzellen wurden diese in Kokultur mit KMSZ gehalten. KMSZ wurden mit Trypsin aus der Kulturschale abgelöst, gezählt und in 96-Loch-Platten in einer Dichte von 2×10^3 Zellen je Loch ausgesät. Das ergab über Nacht einen zusammenhängenden Stromazellrasen von dem das DMEM-Medium mit PBS abgewaschen und 1×10^4 (für die Experimente zur Viabilität) oder 5×10^4 Myelomzellen (für die Experimente zur Signaltransduktion) pro Loch ausgesät wurden. Nach dem Absinken adhären die MM Zellen auf den KMSZ. Die MM Zellen wurden über Nacht mit KMSZ kokultiviert bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.1.5 Transiente Transfektion von Myelomzelllinien mittels Elektroporation

Um siRNA-Expressionskonstrukte (s. 2.2.1) in Myelomzellen zu transfizieren, wurden pro Ansatz 2×10^7 Zellen gepoolt und in 0,5 ml RPMI 1640-Medium ohne jegliche Zusätze aufgenommen. Die Konzentration der Plasmide betrug für pSUPER-Akt1 15 µg/mL, für pSUPER-Akt2 15 µg/ml oder/und für pSUPER-Akt3 20 µg/ml. Leerer pSUPER-Vektor wurde als Kontrolle verwendet. Da nur ungefähr 25% der Zellen transfiziert werden, muß

eine Anreicherung diese Zellen durch Sorten erfolgen. Dafür wurde ein Proteinexpressionskonstrukt für "GreenFluorescenceProtein" (GFP) pcDNA3.1-EGFP (10 µg/ml; Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden in Kuvetten der Stärke 4mm (Invitrogen) mit einem Elektroporator (Gene Pulser II; Bio-Rad) elektroporiert (Chatterjee *et al.*, 2004). Die optimale Geräteeinstellung mit einer möglichst großen Anzahl transfizierter bei möglichst wenig toter Zellen wurde durch Testelektroporationen mit Spannungen von 200 bis 360 V und konstanten 950 µF Kapazität bestimmt. Es wurde die Einstellung mit 300 V (MM.1S), beziehungsweise 280 V (AMO-1) verwendet. Nach der Elektroporation wurden die Zellen 15 Minuten in Medium ohne Zusätze bei 37°C inkubiert und anschließend in Medium mit Zusätzen überführt. Innerhalb von 24 Stunden bilden die stark transfizierten Zellen ausreichend GFP und können mit einem Zell-Sorter von den nicht bzw. nur schwach transfizierten Zellen abgetrennt werden.

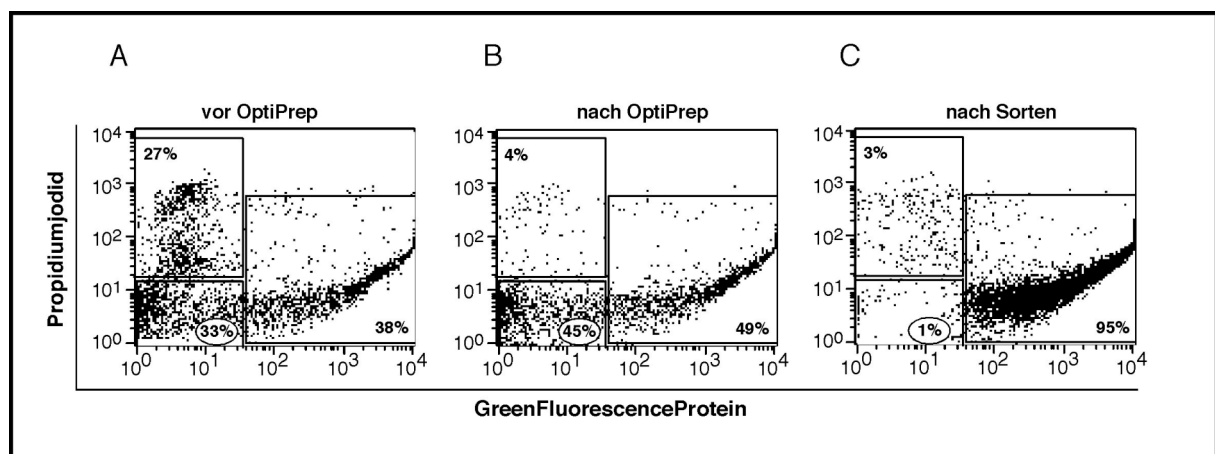


Abb. 2.1.4: Aufreinigung von "GreenFluorescenceProtein" (GFP)-exprimierenden Zellen mit einem Zell-Sorter nach der Transfektion

Durchflusszytometrische Analyse von AMO-1 Zellen, die am Vortag mit einem GFP-Konstrukt transfiziert wurden. Die Zellen wurden vor der Messung in FACS-Puffer aufgenommen und die toten Zellen mit Propidiumjodid gefärbt. (A) Im oberen linken Rechteck befinden sich die toten Zellen (Propidiumjodid+/GFP- (27%)). Im unteren linken Rechteck sind die lebenden untransfizierten (Propidiumjodid-/GFP- (33%)) und im rechten unteren Rechteck sind die lebenden transfizierten Zellen (Propidiumjodid-/GFP+ (38%)) zu sehen. (B) Nach dem OptiPrep hat sich die Anzahl toter Zellen stark verringert (oberes linkes Rechteck; 4%). Es befindet sich noch eine großer Anteil lebender untransfizierter Zellen in der Probe (unteres linkes Rechteck; 45%). (C) Nachdem auf stark GFP-positive Zellen gesortet wurde ist die Zahl der toten (3%) und untransfizierten (1%) Zellen minimal. Man kann die stark transfizierten Zellen (95%) für weitere Versuche verwenden.

Dafür werden zunächst mittels OptiPrep (Axis-Shield) die lebenden von den toten Zellen abgetrennt. OptiPrep ist eine Iodoxanollösung. Es wird eine Verdünnung hergestellt, die eine höhere Dichte als lebende Zellen hat (in diesem Fall 0,9 ml OptiPrep-Lösung mit 3 ml

Medium), die Zellen in dieser aufgenommen und mit PBS überschichtet. Die Lösung dringt in tote Zellen ein und erhöht so deren Dichte, wodurch bei einer anschließenden Zentrifugation die toten Zellen absinken und die lebenden Zellen aufsteigen und sich an der Phasengrenze zwischen PBS und Zuckerlösung sammeln. Die lebenden Zellen werden abgenommen, mit PBS gewaschen und gesortet.

Die dadurch gewonnenen stark transfizierten Zellen wurden für folgende Experimente verwendet:

1. Um zu zeigen, dass das Zielprotein abnimmt, wurden MM.1S und AMO-1 Zellen, die mit einem siRNA-Konstrukt gegen (1) Akt1, (2) Akt2, (3) Akt3 (nur MM.1S), (4) Akt1 und Akt2 und (5) Akt1, Akt2 und Akt3 (nur MM.1S) transfiziert wurden 72 Stunden nach Transfektion und Sorten pelletiert und für Western-Blot-Analysen verwendet. Als Kontrolle wurden jeweils Zellen mit einer entsprechenden Menge leeren pSUPER-Vektors verwendet.
2. Viabilitätsmessungen wurden mit den gleichen MM.1S und AMO-1 Zellen wie in 1. durchgeführt. Die Zellen wurden direkt nach dem Sorten auf KMSZ gesetzt und die Viabilität am 6. Tag nach Transfektion gemessen.

2.1.6 Behandlung mit dem Akt Inhibitor Akti-1/2

Um zu zeigen, dass Akti-1/2 (Calbiochem) die Phosphorylierung von Akt selektiv hemmt, wurden primäre MM Zellen, sowie Zellen der Linien AMO-1 und MM.1S über Nacht mit 10 μM Akti-1/2 oder einer entsprechenden Menge DMSO inkubiert und anschließend entweder mit IL-6 und IGF-1 für 15 Minuten stimuliert (primäre MM Zellen für Western-Blot-Analyse) oder direkt geerntet (primäre MM Zellen für intrazelluläre Phospho-Akt Färbung und durchflusszytometrische Analyse; AMO-1 und MM.1S Zellen für Western-Blot-Analyse).

Desweiteren wurde die Viabilität von MM.1S und AMO-1 Zellen nach 5-tägiger Behandlung mit dem Akt Inhibitor Akti-1/2 in den Konzentrationen 20, 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,625 μM in Kokultur mit KMSZ bestimmt. Ebenso wurden primäre Myelomzellen aus insgesamt 30 Patientenproben in Gegenwart von KMSZ mit Akti-1/2 in den Konzentrationen 10, 5, 2,5, 0,625 und 0,0625 μM behandelt. Myelomzellen aus 4 dieser Patientenproben wurden in RPMI Medium supplementiert mit 10 ng/mL IL-6 kultiviert und mit dem Inhibitor in gleicher Weise behandelt. Die Viabilität wurde nach 5 Tagen Akti-1/2 Behandlung mittels AnnexinV-FITC/PI-Färbung bestimmt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Konstruktion vektorbasierter siRNA-Expressionskonstrukte gegen Akt

Für die effiziente und spezifische Reduzierung der Akt1, Akt2 und Akt3 Expression durch siRNA, wurde ein Vektorsystem mit dem Namen pSUPER (SUPpression of Endogenous RNA) verwendet.

pSUPER (3176 bp)

Key Sites

BglII: 928
HindIII: 934
EcoRI: 707
Sall: 949
XhoI: 955

Vector Features

f1(+) origin: 441-135
H1 promoter: 708 - 934
pUC origin: 1373-2040
Ampicillin resistance ORF: 3048-2191

T7 primer binding site (AATACGACTCACTATAG): 627-643
T3 primer binding site (CTTTAGTGAGGGTTAAT): 989-1005
M13(-20) primer binding site (GTAAAACGACGGCCAGT): 600-616
M13 reverse primer binding site (CATGGTCATAGCTGTT): 1023-1038

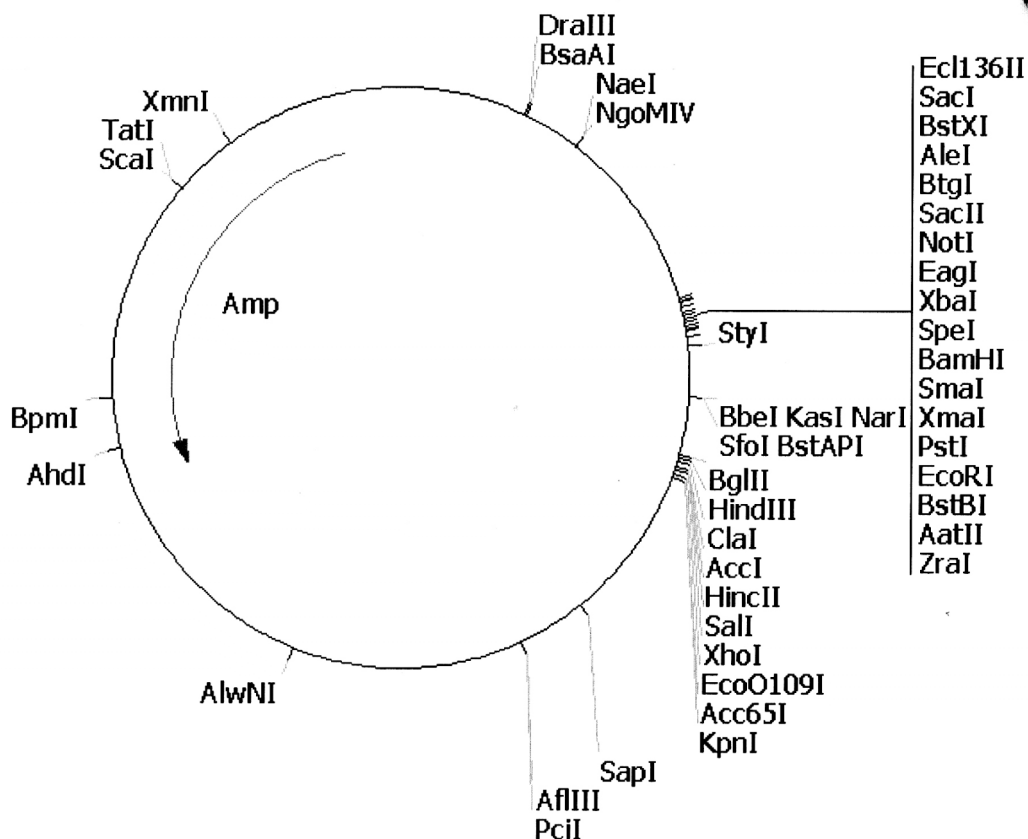


Abb. 2.2.1: Aufbau des Vektors pSUPER

Der Vektor wird als Expressionsvektor für "short hairpin" RNAs in Säugetierzellen benutzt. Die in dieser Arbeit genutzten Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind *BglII*, *HindIII* und *EcoRI*. Bei der Transformation in kompetente Bakterien wurde die Ampecillinresistenz für eine Selektion der transformierten Bakterien genutzt. Für die Sequenzierung des einklonierten Inserts wurde ein T7-Primer verwendet.

Es ist ein Derivat des Klonierungsplasmids pBlueskript II und kann zur Expression von "short hairpin" RNA in Säugetierzellen benutzt werden. Diese wird von der Zelle zur funktionellen siRNA gespalten und kann im günstigen Fall zum vollständigen Verlust der messenger RNA und des daraus abgeleiteten Proteins führen.

2.2.1.1 Spaltung und Dephosphorylierung des pSUPER-Vektors

Mit Restriktionsendonukleasen, die spezifische Basensequenzen in einem DNA-Doppelstrang erkennen und spalten, wurde der Vektor an zwei Stellen (*HindIII* und *BglII*) geschnitten, um dort ein geeignetes Insert (s. 2.2.1.2) einzufügen.

2 µg	pSUPER-Vektor
0,5 µl	<i>BglII</i> (10 U/ml) (Fermentas)
0,5 µl	<i>HindIII</i> (10 U/ml) (Fermentas)
2 µl	Puffer rot (10x) (Fermentas)

ad 20 µl *a. dest.*

Die Reaktion wurde bei 37°C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (Fermentas) für 15 Minuten bei 37°C dazugegeben, um die Phosphatreste an den 5'-Enden der Schnittstellen zu entfernen. Damit wird eine Religation unmöglich und so die Effizienz beim späteren Einklonieren des "Inserts" verbessert.

Der Vektor wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Bei diesem Schritt werden Proteine (wie z.B. die Restriktionsenzyme) denaturiert und sammeln sich nach Zentrifugation an der Phasengrenze, wohingegen die Nukleinsäuren in der oberen wässrigen Phase gelöst verbleiben. Die 20 µl des geschnittenen, dephosphorylierten Vektors wurden mit 30 µl *a. dest.* und 50 µl Phenol-Chloroform-Lösung vermischt, stark gevortext und bei 18000 x g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (die wässrige Phase) wurde abgenommen und mit 50 µl Chloroform-Isoamylalkohol gemischt, um das Phenol zu entfernen (18000 x g, 5 Minuten). Der Überstand wurde erneut abgenommen und die DNA mit Ethanol-Fällung gewonnen. Dazu wurde der Überstand mit 125 µl Ethanol (96%ig) und 4 µl Natriumacetat-Lösung (3 M) vermischt und mindestens 15 Minuten bei -20°C gehalten. Nach der Zentrifugation (18000 x g, 20 Minuten) wurde die Flüssigkeit vollständig abgenommen, das durchsichtige Pellet 10 Minuten getrocknet (damit das Ethanol verdampft), in 100 µl *a. dest.* aufgenommen (Konzentration des Vektors ist dann ungefähr 20 ng/µl) und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Vorbereitung der doppelsträngigen Oligonukleotid-Inserts

Als Matrize für das Oligonukleotid-"Insert" diente ein von Brummelkamp *et al.* veröffentlichtes Design.

Matrize für das "short hairpin" RNA kodierende Oligonukleotid:

5' - GATCCCC **Ziel-Sequenz: sense** TTCAAGAGA **Ziel-Sequenz: antisense** TTTTGG
AAA - 3'

Matrize für das dazu passende, um vier Basen versetzte reverse Komplement:

5' - AGCTTTTCCAAAA **Ziel-Sequenz: sense** TCTCTTGAA **Ziel-Sequenz: antisense**
GGG - 3'

Die kodierende Sequenz von Akt1, Akt2 und Akt3 wurde nach 19 Basen langen Abschnitten durchsucht, die die folgenden Kriterien erfüllen: (1) 50 – 80 % Guanin/Cytosin Anteil; (2) Adeninreste an den Positionen -1 und -2; (3) idealerweise ein Guaninrest an Position 19; (4) weniger als 4 Adenin oder Tymidin hintereinander. Für Akt1 und Akt2 wurden zusätzlich zwei in Czauderna *et al.* (2003) veröffentlichte, 21 Basen lange Sequenzen verwendet. Für Akt1 wurden 2 verschiedene Konstrukte, für Akt2 4 verschiedene Konstrukte und für Akt3 7 verschiedene Konstrukte kloniert und darauf getestet, ob sie das jeweilige Zielprotein effizient und spezifisch herunterregulieren. Die siRNA-Expressionskonstrukte gegen die folgenden Ziel-Sequenzen waren am effizientesten und wurden für die "knock-down"-Versuche verwendet:

Ziel-sequenz für:

Akt1 5'- **ACGAGGGGAGTACATCAAGAC** -3' (Czauderna *et al.*, 2003)

Akt2 5'- **GACCTGGAGGCCACGGTAC** -3'

Akt3 5'- **GCTATCCAGGCTGTAGCAG** -3'

Die Oligonukleotide wurden von der MWG-Biotech AG hergestellt, in lyophilisierter Form geliefert und in *a. dest.* in einer Konzentration von 100 pM aufgenommen. Für die Klonierung der Oligonukleotide in den pSUPER-Vektor wurden die folgenden Schritte durchgeführt.

2.2.1.2.1 "Annealing" der komplementären Oligonukleotide

1,5 µl	Vorwärtsstrang-Oligonukleotid (100 pM)
1,5 µl	Gegenstrang Oligonukleotid (100 pM)
47 µl	Oligonukleotid-Annealing-Puffer

Das Gemisch wurde in ein mit kochendem Wasser gefülltes, mit Alufolie bedecktes Becherglas gestellt, um die zufälligen Bindungen zwischen den Oligonukleotiden zu trennen und anschließend im Kühlschrank langsam auf 4°C abgekühlt. Dabei lagern sich die komplementären Oligonukleotide aneinander an. Die überhängenden, 4 Basen langen Bereiche passen in die geöffneten *HindIII* und *BglII* Schnittstellen des pSUPER Vektors.

2.2.1.2.2 Kinase-Reaktion

T4-Polynukleotidkinase katalysiert den Transfer eines Phosphatrestes von der Gammaposition des ATP zum 5'-Hydroxylende von Polynukleotiden. Dieser Schritt war nötig, damit die nachfolgende Ligationsreaktion in den dephosphorylierten Vektor möglich ist. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C inaktiviert.

1 µl	T4-Polynukleotidkinase-Puffer (10x) (Fermentas)
1 µl	ATP (10 mM) (Fermentas)
2 µl	Oligonukleotidmix aus der Annealingreaktion
1 µl	T4-Polynukleotidkinase (Fermentas)

ad 10 µl *a. dest.*

Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 37°C, dann 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

2.2.1.3 Ligation des Doppelstrang-Oligonukleotid-Inserts in den vorbereiteten pSUPER-Vektor

Das Insert wurde mit dem Enzym T4 DNA-Ligase, das die Ligation von doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren katalysiert, in den geschnittenen pSUPER-Vektor einkloniert.

4 µl	geschnittener pSUPER-Vektor (20 ng/µl) aus 2.2.1.1
2 µl	phosphoryliertes Insert aus 2.2.1.2.2
1 µl	Ligase Puffer (10x) (Fermentas)
1 µl	T4 DNA-Ligase (Fermentas)

ad 10 µl *a. dest.*

Das Gemisch wurde mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.1.4 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Für die Vermehrung des Plasmids wurden transformationskompetente *E. coli* (Stamm Top10) verwendet. Die Bakteriensuspension wurde auf Eis aufgetaut, 2 µl des Ligationsansatzes dazugegeben, vorsichtig durchmischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 1 Minute im Wasserbad auf 42°C erhitzt und anschließend 1 ml Luria-Bertani (LB)-Medium dazugegeben. Die Zellen wurden auf einem Schüttler bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, anschließend auf einer Agarplatte mit Ampicillin ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert. Nur Bakterien, die den pSUPER-Vektor mit dem Ampicillin-Resistenz-Gen aufgenommen haben, können auf dieser Platte wachsen.

2.2.1.5 Picken von Klonen

Durch das Verteilen der Bakteriensuspension auf der Agarplatte bildet jedes transfizierte Bakterium eine Kolonie. Einzelne Kolonien wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampecillin überführt. Die Kultur wurde über Nacht auf einem Schüttelinkubator (180 rpm) bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6 Plasmid-DNA-Aufreinigung mit QIAprep Miniprep

Für eine schnelle Aufreinigung der Plasmid DNA wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen verwendet. Dieser nutzt die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly. Die *E. coli* aus der Übernachtskultur wurden pelletiert (18000 x g, 10 Minuten) und in 250 µl Resuspensionspuffer P1 mit RNase A aufgenommen. Zu der Mischung wurde 250 µl Lysepuffer P2 gegeben und das Reaktionsgefäß 4-6 mal kopfüber gedreht. Anschließend wurde 350 µl Neutralisationspuffer N3 dazugegeben und das Reaktionsgefäß sofort 4-6 mal kopfüber gedreht. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (18000 x g, 30 Minuten), der Überstand in eine QIAprep spin Säule überführt und diese in einer Tischzentrifuge (18000 x g, 1 Minute) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule mit 750 µl Waschpuffer PE gewaschen. Anschließend wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, 50 µl *a. dest.* in die Mitte der Säule gegeben und 1 Minute gewartet, damit das Plasmid von der Säule gelöst wurde. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit der Säule zentrifugiert und die eluierte Plasmidlösung bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.7 Diagnostischer Verdau

Um zu bestimmen, ob die gewonnenen Plasmide das Oligonukleotid-Insert eingebaut haben wurde ein diagnostischer Restriktionsverdau durchgeführt. Dabei wurde ein Stück aus dem Vektor geschnitten, das im Falle eines nicht eingebauten Inserts 300 bp, mit eingebautem Insert dagegen 350 bp groß ist.

5 µl	aufgereinigter Vektor aus 2.2.1.6
0,5 µl	<i>EcoRI</i> (10 U/µl) (Fermentas)
0,5 µl	<i>HindIII</i> (10 U/µl) (Fermentas)
1,5 µl	Puffer rot (10x) (Fermentas)

ad 15 µl *a. dest.*

Als Negativkontrolle wurde leerer pSUPER-Vektor verdaut. Die Reaktion wurde bei 37°C für eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurden 10 µl des Verdaus auf einem 1%igen Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt.

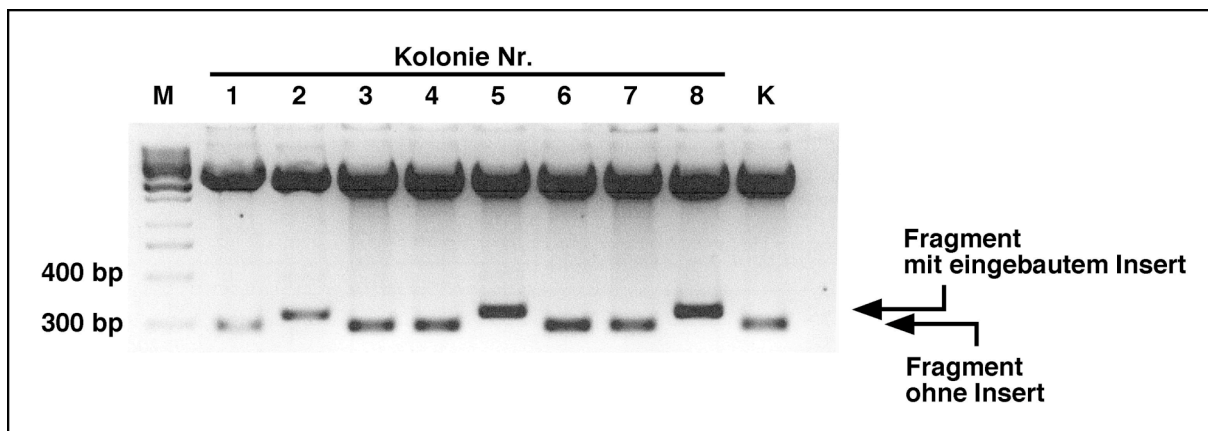


Abb. 2.2.1.7: Ergebnis des diagnostischen Verdaus nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben in einem Agarosegel

Um herauszufinden welche der Bakterienkolonien 1-8 ein Plasmid mit eingebautem Insert vervielfältigt haben, wurde das Plasmid mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut und die Fragmente aufgetrennt. Links wurde ein Marker aufgetragen, um die Größe der Fragmente zu bestimmen. Das ausgeschnittene Fragment hat eine Größe von 300 Basenpaaren (bp), wenn kein Inset enthalten ist (siehe Kolonie Nr. 1, 3, 4, 6, 7) und in der Negativkontrolle (K). Wenn das Insert eingebaut wurde ist das Fragment 350 Basenpaare groß (siehe Kolonie Nr. 2, 5, 8).

2.2.1.8 Sequenzierung des Expressionsplasmids und Test auf Funktionalität

Die Minipreps mit eingebautem Insert wurden sequenziert (AGOWA), um sicher zu stellen, dass die Sequenz des Inserts korrekt ist. Als Sequenzierprimer wurde T7 Primer (siehe auch Abbildung 2.2.1) verwendet. War in dem Expressionskonstrukt das Insert korrekt eingebaut, wurde überprüft, ob das Konstrukt die Expression des Zielproteins supprimiert. Dazu wurden die Plasmide in einer Konzentration von 20 µg/ml in MM Zellen transfiziert (siehe 2.1.5) und die Abnahme des Zielproteins mittels Western-Blot-Analyse bestimmt. Das siRNA-Expressionskonstrukt das die deutlichste Verminderung des Zielproteins bewirkte wurde mittels MaxiPrep (siehe 2.2.1.9) vervielfältigt, um eine größere Plasmidmenge für die weiteren Versuche zu bekommen.

2.2.1.9 Protokoll zur Plasmidgewinnung mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit

Das Prinzip eines MaxiPreps ist dasselbe wie bei einem MiniPrep, nur dass dabei bis zu 500 µg Plasmid gewonnen werden können. Dazu wird die Bakterienkolonie, von der der MiniPrep gemacht wurde, erneut gepickt und in einer Vorkultur aus 3 ml LB-Medium mit Ampecillin über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator (160 rpm) kultiviert. Die Vorkultur wurde in Kolben mit Schikanen und 1 l LB-Medium mit Ampicillin überführt und 24 Stunden bei 37°C in einem Schüttelinkubator (160 rpm) geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (6000 x g, 30 Minuten, 4°C) und das Pellet in 10 ml Resuspensionspuffer P1 mit RNase A aufgenommen. Zu dem Gemisch wurde 10 ml Lysepuffer P1 gegeben, das Reaktionsgefäß 4-6 mal kopfüber gedreht und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde 10 ml eiskalter Neutralisationspuffer dazugegeben, das Reaktionsgefäß sofort 4-6 mal kopfüber gedreht und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (20000 x g, 30 Minuten, 4°C) und der Überstand auf eine Säule, die mit 10 ml Equilibrationspuffer QBT gewaschen wurde, gegeben. Die Säule wurde anschließend zwei Mal mit Waschpuffer QC gewaschen und die DNA mit 15 ml Elutionspuffer QF von der Säule eluiert. Um das Plasmid in einer kleineren Menge Wasser aufzunehmen, wurde die DNA gefällt. Dazu wurden 10,5 ml Isopropanol zu der eluierten Plasmidlösung gegeben und die gefällte DNA sofort mit 15000 x g 30 Minuten bei 4°C herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA Pellet mit 5 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation (15000 x g, 10 Minuten) wird das Ethanol vorsichtig abgenommen, das DNA Pellet für 5-10 Minuten luftgetrocknet und in 100 µl *a. dest.* aufgenommen. Die Konzentration des Plasmids wurde mit einem Spektrophotometer (N-1000, Peqlab) bestimmt.

2.2.2 Sequenzanalyse von Akt1

2.2.2.1 Synthese von cDNA

2.2.2.1.1 Präparation von RNA aus Myelomzellen

Für die Synthese wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen je MM Patientenprobe oder Myelomzelllinie verwendet. Aus den Zellen wurde die RNA mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen gewonnen. Dazu wurden die MM Zellen mit 350 μ l Puffer RLT lysiert und mit 350 μ l 70%igem Ethanol versetzt. Dieses Gemisch wurde auf eine "RNeasy mini column" überführt und die Säule bei 10000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 700 μ l Waschpuffer RW1 gewaschen (8000 x g, 2 Minuten). Anschließend wurden zwei weitere Waschschrirte mit jeweils 500 μ l Waschpuffer RPE durchgeführt (8000 x g, 2 Minuten) und anschließend die Säule in einem neuen Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert, um Reste des Puffer RPE zu entfernen (10000 x g, 1 Minute). Dann wurde die RNA von der Säule mit 50 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Dazu wurde die Säule erneut bei 8000 x g für 1 Minute zentrifugiert.

2.2.2.1.2 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase, die RNA in cDNA umzuschreiben. Die cDNA dient anschließen als Matrize, um mittels spezifischer Oligonukleotid-Primer in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) (siehe 2.2.2.2) DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Für diese reverse Transkription wurde der RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) verwendet und die nachfolgend verwendeten Reagenzien stammen, wenn nicht anders angegeben, aus diesem Kit.

5 μ g	RNA aus 2.2.2.1.1
1 μ l	Random Hexamer Primer (0,2 μ g/ μ l)

ad 12 μ l *a. dest.*

Die Reagenzien wurden gemischt und bei 70°C für 5 Minuten inkubiert. Durch das Auflösen möglicher Sekundärstrukturen wird so eine gleichmäßigere Anlagerung der Primer an die RNA bewirkt.

Auf Eis wurden die folgenden Reagenzien dazugegeben:

4 µl	5x Reaktionspuffer
1 µl	RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor (20 U/µl)
2 µl	dNTP Mix (10 mM)

Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 25°C inkubiert und anschließend 1 µl Reverse Transkriptase dazugegeben, was ein Gesamtvolumen von 20 µl ergibt. Für die reverse Transkription wurde das Gemisch 10 Minuten bei 25°C, anschließend 60 Minuten bei 42°C inkubiert und, um die Reaktion zu beenden, für 10 Minuten auf 70°C erhitzt.

2.2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Ist die Sequenz des Zielgens bekannt werden zwei Oligonukleotide (Primer) synthetisiert, die den gewünschten Genabschnitt eingrenzen und von denen eines komplementär zum kodierenden Strang und das andere komplementär zum nicht-kodierenden Strang ist. Durch hohe Temperatur (96°C) wird die DNA denaturiert, durch Absenkung der Temperatur kommt es zur Anlagerung der Primer an die DNA und zur Synthese der komplementären Gegenstränge durch die Taq-DNA-Polymerase. Diese Verlängerungsreaktion geht ausschließlich vom 3'-Ende der Primer aus. Der Vorgang wird zyklisch wiederholt, so dass das DNA-Stück exponentiell vervielfältigt wird.

Sequenz des 5'-Primers für Akt1: 5'- GCACCATGAGCGACGTGGCT -3'

Sequenz des 3'-Primers für Akt1: 5'- CCTGCTTCTTGAGGCCGTCA -3'

PCR-Ansatz für Akt1:

1 µl	cDNA aus 2.2.2.1.2
2 µl	MgCl ₂ (Fermentas)
2,5 µl	dNTP Mix (10 mM)
1 µl	5'-Primer Akt1 (50 pmol/µl)
1 µl	3'-Primer Akt1 (50 pmol/µl)
1 µl	Taq-DNA-Polymerase (Fermentas)
2,5 µl	10x Taq-Puffer ((NH ₄) ₂ SO ₄) (Fermentas)

ad 25 µl *a. dest.*

PCR-Protokoll:

94°C	2 Minuten	
94°C	30 Sekunden] 35 Zyklen
59°C	1 Minute	
72°C	1 Minute	
72°C	10 Minuten	

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (PepqLab, Primus 25) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden von der Firma AGOWA sequenziert. Als Sequenzierprimer wurde der Akt1 5'-Primer verwendet.

2.2.3 Reagenzien für die molekularbiologischen Methoden

Agar-Platten mit Ampicillin	250 ml LB-Medium 7,5 g Agar 100 µg/ml Ampicillin 250 ml <i>a. dest.</i>
Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung	Mischungsverhältnis 49:1
LB-Medium	5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Bacto-Trypton 10 g/l Natriumchlorid
Oligonukleotid-Annealing-Puffer	100 mM Kaliumacetat 30 mM HEPES, pH 7,4 2 mM Magnesiumacetat
Phenol-Chloroform-Lösung	Mischungsverhältnis 1:1

2.3 Biologische und proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Viabilität von MM Zellen

Für die Bestimmung apoptotischer und toter Zellen nach Behandlung mit Akti-1/2 wurde AnnexinV-FluoresceinIsoThioCyanat (AnnexinV-FITC) und Propidiumjodid (PI; beides von Bender MedSystems) verwendet. Da GFP Licht in derselben Wellenlänge wie FITC emittiert, wurde für Experimente mit GFP-transfizierten Zellen AnnexinV-ATTO 647 (Alexis Incorporation) und PI verwendet.

Wenn Zellen den programmierten Zelltod, die Apoptose, durchlaufen, gelangt Phosphatidylserin, welches in intakten Zellen nur intrazellulär vorkommt, an die Außenseite der Zellmembran. AnnexinV bindet an Phosphatidylserin und markiert so die Zellen, die sich in einer frühen Phase der Apoptose befinden. Während des Fortschreitens der Apoptose wird die Zellmembran durchlässig, wodurch PI in die Zelle eindringen kann und mit der DNA irreversibel interkaliert. Dadurch kommt eine Doppelfärbung mit AnnexinV-FITC und PI zustande, die die in fortgeschrittener Apoptose befindlichen und toten Zellen kennzeichnet.

Für die Messungen wurden die MM Zellen vorsichtig von Stromazellen abgespült oder direkt aus der 96-Loch-Platte entnommen, mit PBS gewaschen und in 100 µL 4°C-kaltem FACS-Puffer aufgenommen. Dazu wurden 2 µl AnnexinV-Lösung und 2 µl PI-Lösung (50 µg/ml) gegeben, 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend in einem FACS-Calibur (Becton Dickinson) gemessen (Chatterjee *et al.*, 2004).

2.3.2 Western-Blot-Analyse

2.3.2.1 Präparation des Zellproteins, elektrophoretische Auftrennung und "blotten" auf eine Nitrozellulosemembran

Die Zellpellets wurden in 4°C-kaltem Lysepuffer aufgenommen und auf Eis 10 Minuten lysiert. Anschließend wurden die Zellmembrantrümmer mittels Zentrifugation (10000 x g, 4°C) von den im Puffer gelösten Proteinen abgetrennt. Bei Experimenten mit Zelllinien wurde die Proteinkonzentration im Überstand mit dem DC Protein Assay der Firma BioRad bestimmt (siehe 2.3.2.2).

Für die später beschriebenen Experimente mit primären Myelomzellen wurden pro Ansatz 2×10^5 Zellen verwendet, diese lysiert und der Überstand nach der Zentrifugation als Ganzes verwendet.

Die Proteinlysate wurden mit doppelt konzentriertem Lämmli-puffer vermischt (1:1) und für 5 Minuten gekocht. Anschließend wurden die Proteine nach ihrer Größe mittels SDS-

Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurden 10%ige Polyacrylamidgele verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher&Schuell) übertragen. Diese Membran wurde mit einem ersten Antikörper gegen das jeweilige Zielprotein und anschließend mit einem zweiten HRP-gekoppelten Antikörper, der das speziesspezifische Immunglobulin des ersten Antikörpers erkennt (Kaninchen, Maus oder Ratte) inkubiert. Dabei wurde die auf den jeweiligen Datenblättern der Antikörper vorgeschlagene Prozedur eingehalten. Als Detektionssystem wurde ECL-Lösung (Amersham) verwendet und das bei der chemischen Reaktion entstehende Licht durch Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Es wurden die folgenden Antikörper und Verdünnungen verwendet:

anti-Akt1	Verdünnung 1:1000	#2967 (Cell Signaling)
anti-Akt2	Verdünnung 1:1000	#2962 (Cell Signaling)
anti-Akt3	Verdünnung 1:1000	#4059 (Cell Signaling)
anti-gesamt-Akt	Verdünnung 1:1000	#9272 (Cell Signaling)
anti-phospho-Akt (Ser473)	Verdünnung 1:1000	#4058 (Cell Signaling)
anti-phospho-GSK-3 β (Ser9)	Verdünnung 1:1000	#9336 (Cell Signaling)
anti-phospho-FoxO1	Verdünnung 1:1000	#9464 (Cell Signaling)
anti-phospho-ERK1/2	Verdünnung 1:1000	#9101 (Cell Signaling)
anti- α -tubulin	Verdünnung 1:1000	03568 (Biozol)
anti-rabbit-HRP	Verdünnung 1:2500	NA9310V (GE Healthcare)
anti-mouse-HRP	Verdünnung 1:10000	NA9340V (GE Healthcare)
anti-rat-HRP	Verdünnung 1:10000	NA9350V (GE Healthcare)

2.3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Diese Methode beruht auf einer Folin Reaktion nach Lowry (Lowry, 1951). Dabei reagieren die Proteine hauptsächlich über ihre Tyrosin- und Tryptophanreste im alkalischen Medium mit Kupfertartrat. Das Folin-Reagenz wird von dem Protein-Kupfer-Komplex reduziert, wobei charakteristische blaue Produkte mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm entstehen. Es wurden jeweils 5 μ l der Proteinextrakte mit 50 μ l Reagenz A' (1 ml Reagenz A + 20 μ l Reagenz S) versetzt. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 200 μ l Reagenz B gestartet. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur kann die Farbentwicklung am Spektralphotometer gemessen werden. Dazu wurde eine Standardkurve mittels einer Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) erstellt und anschließend der

Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt. Die Proben wurden auf eine einheitliche Proteinkonzentration mit Lysepuffer verdünnt.

2.3.2.3 Testen der Isoformspezifität der Antikörper gegen Akt1, Akt2 oder Akt3

Um festzustellen, ob die Antikörper gegen Akt1, 2 oder 3 spezifisch nur die jeweilige Isoform erkennen wurden je 1 µg rekombinantes Akt1, Akt2 oder Akt3 Protein (CST) mit einer äquivalenten Menge Lämmli-Puffer (2x) gemischt und aufgeköcht. Die Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Western-blotting auf eine Nitrocellulosemembran gebracht und mit anti-Akt1, anti-Akt2, anti-Akt3 und anti-gesamt-Akt Antikörpern detektiert.

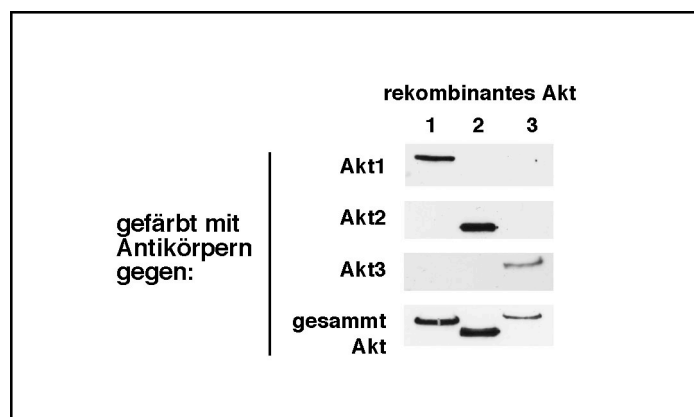


Abb. 2.3.2.3: Testen der Isoformspezifität der Antikörper gegen Akt1, Akt2 oder Akt3

Rekombinantes Akt1, Akt2 oder Akt3 Protein wurde geblottet und mit Antikörpern gegen Akt1, Akt2, Akt3 oder gesamt Akt detektiert. Der oberste Film zeigt, dass der anti-Akt1 Antikörper Akt1 Protein erkennt, Akt2 und Akt3 aber nicht. Dasselbe gilt für die Antikörper gegen Akt2 und Akt3.

Die Proteine laufen auf unterschiedlichen Höhen, da es bei Akt1 und Akt2 nur Teile des jeweiligen Proteins sind: Akt1 (Val107-Ala480), Akt2 (Ala107-Glu481), Akt3 (Met1-Glu479; vollständiges Protein).

2.3.3 Bestimmung von phosphoryliertem Akt-Protein mit intrazellulärer Färbung und durchflusszytometrischer Analyse

Um die Menge an phosphoryliertem Akt-Protein in primären Mylomzellen zu bestimmen wurden folgende Versuchsansätze gewählt: jeweils 5×10^4 primäre Mylomzellen wurden (1) mit Akti-1/2 in einer Konzentration von 10 µM über Nacht oder (2) einer entsprechenden Menge DMSO kultiviert. (3) Eine weitere Probe wurde 15 Minuten vor dem Ernten mit IL-6 und IGF-I inkubiert. Zwei weitere Proben wurden mit KMSZ für 24 Stunden kokultiviert und anschließend (4) mit Akti-1/2 in einer Konzentration von 10 µM über Nacht oder (5) DMSO

inkubiert. Die geernteten Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit Fix-Puffer I (Becton Dickinson) für 20 Minuten im Inkubator bei 37°C fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen herunterzentrifugiert (1500 x g, 3 Minuten) und zur Permeabilisierung in 90%igem, 4°C kaltem Methanol aufgenommen und bei 4°C unter kräftigem Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mittels Zentrifugation pelletiert, zwei Mal mit PBS mit 3% Rinderserumalbumin (PBS-B) gewaschen, in 100 µl anti-phospho-Akt Antikörperlösung aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen herunterzentrifugiert, zwei Mal mit PBS-B gewaschen und in 100 µL Lösung des zweiten Antikörpers aufgenommen. Der zweite Antikörper erkennt die Spezies Kaninchen, da der phospho-Akt Antikörper in Kaninchen hergestellt wurde und ist mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 647 gekoppelt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen zwei Mal mit PBS-B gewaschen und in 100 µl PBS-B aufgenommen (Krutzig *et al.*, 2004).

Um die Methode zu etablieren wurden die Zelllinien AMO-1 und MM.1S verwendet (siehe Abbildung 2.3.3).

Es wurden die folgenden Antikörper verwendet:

anti-phospho-Akt (Ser473)	Verdünnung 1:100 in PBS	#4058 (Cell Signaling)
anti-Kaninchen-Alexa Fluor 647	Verdünnung 1:100 in PBS	A21244 (Invitrogen)

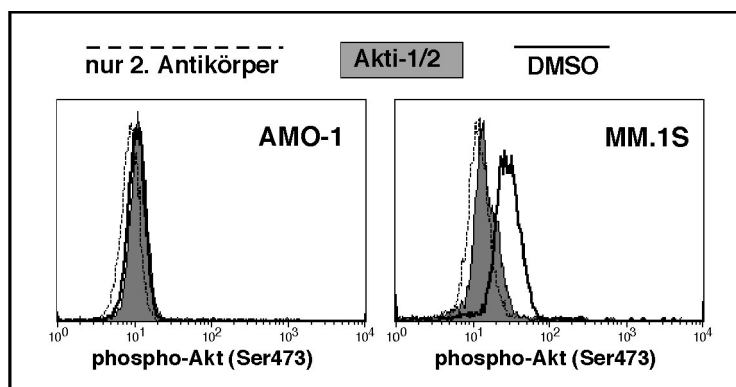


Abb. 2.3.3: Intrazelluläre phospho-Akt Färbung in den Myelomzelllinien AMO-1 und MM.1S

Um die Methode der intrazellulären Färbung und durchflusszytometrischen Analyse zu etablieren, wurde AMO-1, eine Zelllinie ohne konstitutive Akt-Aktivierung und MM.1S, in der Akt konstitutiv phosphoryliert ist, verwendet. Jeweils eine Zellprobe wurde mit dem Akt-Inhibitor Akti-1/2 oder einer entsprechenden Menge DMSO behandelt und die Menge an phosphoryliertem Akt bestimmt. Eine weitere Probe unbehandelter Zellen wurden nur mit dem fluorochrom-gekoppelten 2. Antikörper inkubiert. Bei MM.1S Zellen sieht man, im Gegensatz zu AMO-1 Zellen, eine erhöhte Fluoreszenz in der unbehandelten Probe (DMSO). Das zeigt, dass der 1. Antikörper, der phosphoryliertes Akt erkennt, gebunden hat.

Für die Auswertung der gemessenen Proben wurde das Programm CellQuest Pro (Becton Dickinson) verwendet. Für jede Probe wurde der mediane Fluoreszenzwert (MFI) bestimmt und, um zwei Proben zu vergleichen, als Vervielfachung des MFI angegeben.

Beispielrechnung:

Median der Akti-1/2 behandelten Probe ($MFI_{Akti-1/2}$): 300

Median der DMSO behandelten Probe (MFI_{DMSO}): 600

Vervielfachung des MFI = $(MFI_{DMSO}) / (MFI_{Akti-1/2}) = 600 / 300 = 2$

Demnach ist der MFI in der DMSO-inkubierten Probe 2 mal so groß wie in der mit dem Inhibitor behandelten.

2.3.4 Bestimmung des phosphorylierten Akt-Proteins mit immunhistochemischer Analyse

Die in Paraffin eingebetteten Knochenmarkstanzen wurden geschnitten, auf silanierte Objektträger aufgezogen und über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden im Xylolbad (100%) für 20 Minuten entparaffinisiert und anschließend mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Dazu wurden die Schnitte für jeweils 3 Minuten in 100%iges, 90%iges, 80%iges, 70%iges Ethanol und dann in *a. dest.* getaucht. Anschließend wurden die Schnitte für 3 Minuten bei vollem Druck in einem Dampfkochtopf in Target retrieval solution (pH 6,1; Dako) gekocht und in PBS abgekühlt. Die folgende Färbung wurde mit dem Kit Advance (Dako) durchgeführt. Erst wurde mit 100 µl des 1. Antikörpers für 1 Stunde inkubiert und danach 3 Mal für 1 Minute mit PBS gewaschen. Für die anschließende Detektionsreaktion wurde erst mit 100 µl Advance-HRP-link (Dako) für 20 Minuten inkubiert, 3 Mal für 1 Minute mit PBS gewaschen, mit 100 µl Advance-HRP-enzyme (Dako) für 20 Minuten inkubiert und wiederum 3 Mal für 1 Minute mit PBS gewaschen. Danach folgt die Inkubation mit 100 µl Diaminobenzidin (Sigma) für 10 Minuten, gründliches Spülen mit Leitungswasser und eine Gegenfärbung mit Hämalaun (nach Meyer) für 3 Minuten. Im folgenden wurden die Schnitte in die Ethanolreihe in aufsteigender Konzentration und anschließend für 5 Minuten in Xylol (100%) getaucht und mit Deckgläsern eingedeckt.

Für die Färbung auf den Plasmazell-spezifischen Oberflächenmarker CD138 (Syndekan-1) wurde dasselbe Protokoll verwendet, nur dass die Schnitte anstatt mit Target-retrieval solution mit Citratpuffer (pH 6,0) für 8 Minuten im Dampfkochtopf gekocht wurden.

Für die Übersichtsaufnahme wurde eine Giemsa-Färbung durchgeführt.

Für die Immunhistochemie wurden die folgenden Antikörper verwendet:

anti-CD138	Verdünnung 1:100	M7228 (Dako)
anti-phospho-Akt (Ser473)	Verdünnung 1:50	#3787 (Cell Signaling)

2.3.5 Reagenzien für biologische und proteinbiochemische Methoden

Citratpuffer pH 6,0	4,2 g/l Zitronensäure (Roth)
FACS-Puffer	10 mM HEPES (pH 7,4) (Roth) 140 mM NaCl (Roth) 2,5 mM CaCl ₂
Lämmli-Puffer (2x)	0,1 M Tris (pH 6,8) (Roth) 20% Glycerol (Roth) 8% SDS (Roth) 10% β-Mercaptoethanol (Roth) 0,01% Bromphenolblau
Zell-Lysepuffer	20 mM HEPES (pH 7,9) (Roth) 350 mM NaCl (Roth) 1 mM MgCl ₂ (Roth) 0,5 mM EDTA (pH 8,0) (Roth) 0,1 mM EGTA (Roth) 1% NP40 (Roth) 0,5 mM DTT (Roth) 10 µg/ml Pefabloc (Roth) 1 mM Na ₃ VO ₄ (Roth) 1 µg/ml Aprotinin (Roth)
TBS-Puffer (pH 7,6)	20 mM Tris (Roth) 130 mM NaCl (Roth)
TGS-Puffer (pH 8,6)	25 mM Tris (Roth) 190 mM Glycin (Roth) 0,1% SDS (Roth)

2.4 Hersteller

AGOWA	Berlin, Deutschland
Alexis Incorporation	Lausen, Schweiz
Amersham	Braunschweig, Deutschland
Axis-Shield	Oslo, Norwegen
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Bender MedSystems	Wien, Österreich
Biochrom	Berlin, Deutschland
Bio-Rad	München, Deutschland
Biozol	Eching, Deutschland
Cell Signaling Technology	Boston, USA
Dako	Hamburg, Deutschland
Fermentas	St. Leon-Roth, Deutschland
GE Healthcare	Little Chalfont, Großbritannien
Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
MWG Biotech	Ebersberg, Deutschland
PAA Laboratories	Pasching, Österreich
Pan Biotech	Aidenbach, Deutschland
peqlab	Erlangen, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Schleicher&Schuell	Dassel, Deutschland
Sigma	Taufkirchen, Deutschland