

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 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 entprechenden 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. Versuchstiere

Die Hirne aus adulten Ratten wurden präpariert und nach Aufarbeitung als Ausgangsmaterial für die Ligandenaffinitätschromatographie und für Pull-Down-Experimente verwendet. Die Hirne 14 Tage alter Mäuse wurden nach Aufarbeitung für Immunpräzipitationsstudien verwendet.

#### 2.1.3. Zelllinien:

PC12                      Pheochromocytoma-Tumorzelllinie der Ratte [Greene & Tischler, 1976]  
Nebennierenmarkszellen  
Diese Zelllinie wurde von American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, USA) bezogen.

#### 2.1.4. Bakterien:

*E. coli* INV $\alpha$ F': (Invitrogen, San Diego, USA)

Genotyp : F' *endA1 recA1 hsdR17* ( $r_k^-$ ,  $m_k^+$ ) *supE44 thi-1 gyrA96, relA1, f80DlacM15*  
D(*lacZYA-argF*)U169 deoR.

*E. coli* BL21(DE3)pLysS: (Invitrogen, San Diego, USA)

Genotyp : F *ompT, hsdSB*( $r_B^- m_B^-$ ) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam<sup>R</sup>).



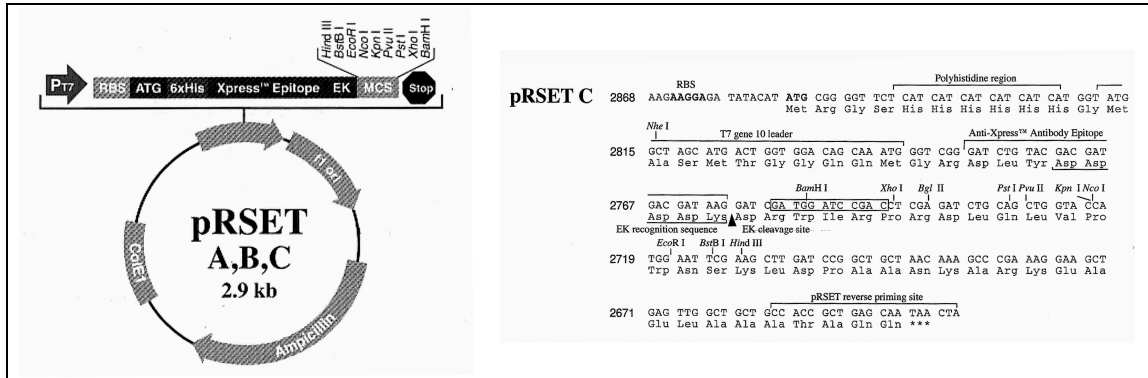
pRSET C:

(Invitrogen, Groningen Niederlande)

Dieses Plasmid ist ein geeigneter Vektor für die Protein-Überexpression und -Reinigung von klonierten Genen in *E.coli*. pRSET ist ein pUC-Abkömmling mit einem T7-Promotor für die induzierbare Expression von Proteinen, einer RBS (ribosomale Bindungsstelle), 6 aufeinander folgenden Histidin-Codons für die Reinigung von überexprimierten Proteinen, einem Xpress™-Antikörper-Epitop, einer Enterokinase-Erkennungsstelle für das Abspalten des Fusionsanteils, einem f1-Ori für die Replikation in *E.coli* und einem Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion von Transformanden.

A

B

**Abb. 6: Expressionsvektor pRSET C und Multiple-Cloning-Site.**

**A:** Aufbau des Vektors pRSET. P<sub>T7</sub>: T7-Promotor, RBS: Ribosomen-Bindungssequenz, ATG: Start-Codon, 6xHis: 6 aufeinander folgende Histidin-Codons, Xpress™-Epitop: Sequenz für die Erkennung des translatierten Proteins durch den Anti-Xpress™-Antikörper, EK: Enterokinase-Spaltstelle, MCS: Multiple-Cloning-Site, Stop: Stopcodon.

**B:** MCS von pRSET C mit Basen- und Aminosäuresequenz .

pGEX-5X-2

(Amersham Pharmacia Biotech)

### 2.1.6. Primer und PCR-Reagenzien

#### Primer für die Polymerase-Ketten-Reaction (PCR)

Primer	Sequenz
P1 Forward-Primer für TM/cyt NCAM mit Bam H1	GGATCCGGATCCTGAGCACAGGCGCCATTGTGGGCATC
P2 Forward-Primer für cyt NCAM mit Bam H1	GGATCCGGATCCTGGACATCACCTGCTACTTCCTGAACAAG
P3 Backward-Primer für cyt NCAM mit Bgl II	AGATCTAGATCTGCTTGTTGCTTGGTACCCATCATGCT
P4 cyt180 spez. Forward-Primer mit Kpn 2I	CAAAGGTCCGGACCCAGAGCCC
P5 cyt 180 spez. Backward-Primer mit Kpn 2I	GCTCTGGGTCCGGACCTTTGGT
P6 Forward-Primer für TMcyt 140/180 mit Ecp RV	GATATCGATATCGGCGCCATTGTGGGCATCCTC
P7 Backward-Primer für cytNCAM 140/180 mit Xho 2I	CTCGAGCTCGAGGCTTGTTGCTTGGTACCCATCATG
Psig1 Forward-Primer für Signalsequenz mit Hind III	AAGCTTAAGCTTAGCAGGCAGCAGAGACTATGG
P sig2 Backward-Primer für Signalsequenz mit Eco RV	GATATCGATATCGGCAGTGGTGAGAGGGCTCC

#### Primer für Sequenzierungen: (MWG-Biotech)

##### Primer für Sequenzierung von Inserts im pCR 2.1-Vektor

M13-forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13-reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

##### Primer für Sequenzierung von Inserts im pRSET C

T7 PCR II	ATACGACTCA CTATAGGG
pRSET-Reverse Primer	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

IRD-markierte Sequenzierprimer für Sequenzierung pcDNA3.1

Forward Primer:	ATTGACGCAAATGGGCGGTAGG	5`IRD 700
Backward Primer:	TTCCAGGGTCAAGGAAGGCACG	5`IRD 800

Unmarkierte Sequenzierprimer für die Sequenzierung von TMcytNCAM in pcDNA3.1

		bindet in:	forw./backw.:
Ps1:	GGAGACCCAAGCTGGCTAGC	pcDNA	f
Ps2:	GGCAAAGACA TGGAGGAGG	140, 180	f
Ps3:	GTCACCACCG TCACCACTAA CTCTG	180	f
Ps4	CCTGCCAGTG CGGGAGAG	180	f
Ps5	GCAGCCCTGG GCTCTCCTGC	180	f
Ps6	GCACAGTCGA GGCTGATCAG C	pcDNA	b
Ps7	GGTCTTGAAG TTCCCTTCGT CC	180	b
Ps8	CTCTCCCGCA CTGGCAGG	180	b
Ps9	CAGAGTTAGT GGTGACGGTG GTGAC	180	b
Ps10	CCTCCTCCAT GTCTTTGCC	140, 180	b

140: Primer bindet innerhalb der cytNCAM 140-Sequenz

180: Primer bindet innerhalb der cytNCAM 180-Sequenz

f: Forward-Primer

b: Backward-Primer

**PCR und RT-PCR-Reagentien**

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

**2.1.7. Antikörper**Primäre Antikörper

Anti-NCAM 5B8 (monoklonal)	T. Jessel
Anti-NCAM H28 (monoklonal)	Cerdarlane
Anti-poly-NCAM (polyklonal)	AG Reutter
Anti-Xpress <sup>TM</sup> -Epitop Antikörper (monoklonal)	Invitrogen
Anti- $\alpha$ -Tubulin (monoklonal)	Sigma
Anti- $\beta$ -Tubulin (monoklonal)	Sigma
Anti-MAP 1A (monoklonal)	Chemicon
Anti- $\beta$ -Actin (monoklonal)	Sigma
Anti- $\alpha$ -Actinin (polyklonal)	Sigma
Anti-Tropomyosin (polyklonal)	Sigma
Anti-Hirn-Spectrin (polyklonal)	Chemicon

Anti-LANP (polyklonal)	AG Reutter
Anti-VCP (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories
Anti-Syndapin (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories
Anti-TOAD-64 (polyklonal)	BD PharMingen
Anti-Phospholipase C $\gamma$ (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories
Anti-fyn (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories
Anti-PYK2/CAK $\beta$ (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories
Anti-ROCK-II / ROK $\alpha$ (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories
Anti-PP1 (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories
Anti-PP2A catalytic $\alpha$ (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories
Anti-ERK1 (polyklonal)	Santa Cruz
Anti-ERK2 (polyklonal)	Santa Cruz
Anti-p130Cas (monoklonal)	BD Tranduction Laboratories

### Sekundäre Antikörper

Kaninchen-anti-Maus IgG (Peroxidase-Konjugat)	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-Konjugat)	Dianova
Kaninchen-anti-Ratte IgG (Peroxidase-Konjugat)	Sigma
Ziege-anti-Maus IgG (FITC-Konjugat)	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG (TRIC-Konjugat)	Dianova

### **2.1.8. Enzyme, Kits und Marker**

#### Enzyme:

Reverse Transkriptase (Superscript)	Gibco BRL, Detroit, USA
Pfu-Polymerase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	Perkin-Elmer, Überlingen
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
T4-DNA-Ligase	Gibco-BRL, Detroit, USA

#### Kits:

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid-Mini-Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid-Midi-Kit	Qiagen, Hilden
Original TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen,NL
QIAquick Gel-Extraktions-Kit	Qiagen, Hilden
Thermo Sequenase <sup>TM</sup> Primer Cycle Sequencing Kit	Amersham

Marker:Protein-Molekulargewichtsstandards:Dalton Marker VII

(66 kD, 45 kD, 34,7 kD, 24 kD, 18,4 kD, 14,3 kD)

Sigma

Prestained Molecular Weight Standard

A: (196, 118, 90, 70, 55, 36, 32 kD)

B: (185, 116, 84, 61,5, 55, 36, 31 kD)

Sigma

Protein-Leiter

(220, 160, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20,15,10 kD)

Gibco, Detroit,USA

DNA-Molekulargewichtsstandard:

1 kB-Basenpaar-Leiter

1 kB PLUS DNA-Leiter

Gene Ruler™ 1 kB DNA Leiter

Gibco-BRL, Detroit,USA

Invitrogen

MBI Fermentas

**2.1.9. Nährmedien****Medien für die Bakterienkultur:**SOB-Medium :

20	g	Peptone
5	g	Yeast-Extract
0.5	g	NaCl
186	mg	KCl, ad 1L aqua bidest.

LB-Medium :

10	g	Peptone
5	g	Yeast Extract
10	g	NaCl, ad 1L aqua bidest.

LB-Agar :

LB-Medium + 15 g Agar

SOC-Medium :

SOB-Medium + 0,5% Glucose

**Medien für die Kultivierung von eukaryontischen Zellen**Medium für PC12-Zellen

0,22	g	Glutamin
50	mL	Pferdeserum
1,0	mL	500 x PEN/STREP

mit RPMI 1640 ad 500 mL

500 x PEN/STREP

50 000	U/mL	Penicillin
50	mg/mL	Streptomycin

**2.1.10. Puffer und Lösungen****Lösungen zur Analyse und Reinigung von Nukleinsäuren**Lösung für Plasmidpräparation

<u>Lösung I:</u>	0,025	M	Tris / HCl, pH 8,0
	0,05	M	Glucose
	0,01	M	EDTA
	2	mg/mL	Lysozym
<u>Lösung II:</u>	0,2	N	NaOH
	1,0	%	SDS (w/v)
<u>Lösung III:</u>	3	M	Natriumacetat, pH 4,8

Lösungen für Plasmidpräparation : Quiagensäulen

<u>QBT:</u>	0,75	M	NaCl
	0,05	M	MOPS, pH 7
	15	%	Ethanol (v/v)
	0,15	%	Triton X-100
<u>QC:</u>	1	M	NaCl
	0,05	M	MOPS, pH 7
	15	%	Ethanol (v/v)
<u>QE:</u>	1,2	M	NaCl
	0,05	M	MOPS
	15	%	Ethanol (v/v)

**Lösung für die Transformation von *E. coli***

CaCl<sub>2</sub>-Lösung :                    50 mM CaCl<sub>2</sub>

**Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten**

<u>TAE-Puffer :</u>	0,04	M	Tris / HCl, pH 8,5
	0,1	%	Eisessig
	2	mM	EDTA
Agarosegele:	1% Agarose in TAE-Puffer		
<u>5x Probenpuffer :</u>	25	%	Glycerin
	50	mM	EDTA
	0,1	%	Bromphenolblau



**Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**Gellösungen:Lösung A

30 % Acrylamid (w/v)  
 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)

Lösung B

0,2 % SDS (w/v)  
 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Lösung C

0,2 % SDS (w/v)  
 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

15 %-ige Trenngellösung

4,5 mL Lösung A  
 2,25 mL Lösung B  
 2,25 mL aqua bidest.  
 45 µL APS (10%)  
 4,5 µL TEMED

10 %-ige Trenngellösung

3,75 mL Lösung A  
 2,25 mL Lösung B  
 3,0 mL aqua bidest.  
 45 µL APS (10%)  
 4,5 µL TEMED

7,5 %-ige Trenngellösung

2,25 mL Lösung A  
 2,25 mL Lösung B  
 4,5 mL aqua bidest.  
 45 µL APS (10%)  
 4,5 µL TEMED

6 %-ige Trenngellösung

1,8 mL Lösung A  
 2,25 mL Lösung B  
 4,95 mL aqua bidest.  
 45 µL APS (10%)  
 4,5 µL TEMED

4 %-ige Sammelgellösung

0,4 mL Lösung A  
 0,75 mL Lösung C  
 1,85 mL aqua bidest.  
 12 µL APS (10%)  
 3 µL TEMED

5x reduzierender Probenpuffer

14,5 % SDS (w/v)  
 0,3 M Tris/HCl, pH 6,8  
 50 % Glycerin (v/v)  
 25 % 2-Mercaptopropandiol  
 0,015 % Bromphenolblau (w/v)

5x nicht reduzierender Probenpuffer

wie 5x reduzierender Probenpuffer, aber ohne Mercaptopropandiol

10 x Laufpuffer

0,25 M Tris / HCl, pH 8,8  
 1,92 M Glycin  
 1 % SDS (w/v)

**Lösungen für Gelfärbungen**Coomassie-Blau-Färbelösung :

40 % Methanol (v/v)  
 10 % Essigsäure (v/v)  
 1 ‰ Serva Blue G-250 (w/v)

Coomassie-Blau-Entfärbelösung : wie Färbelösung, ohne Serva-Blue G-250

### **Lösungen für Silberfärbung:**

#### Fixierlösung

50 % Methanol  
12 % Essigsäure  
in aqua bidest.

#### Silbernitratlösung

0,08 g  $\text{AgNO}_3$   
0,02 % Formaldehyd ad 50 mL  
aqua bidest.

#### Thiosulfatlösung

0,02 % Natriumthiosulfat  
in aqua bidest.

#### Entwicklungslösung

3 % Natriumcarbonat  
0,05 % Formaldehyd  
0,0005 % Natriumthiosulfat  
in aqua bidest.

### **Lösungen für den Westernblot**

#### Transfer-Puffer (Towbin):

150 mM Glycin  
20 mM Tris/HCl, pH 8,3  
10 % Ethanol (v/v)

#### Ponceau-Färbelösung

2 % Ponceau-Rot (w/v)  
30 % TCA (v/v)  
30 % Sulfosalicylsäure (w/v)  
vor Gebrauch 1:4 mit aqua bidest. verdünnen

#### Waschpuffer:

##### PBS-Puffer :

150 mM NaCl  
3 mM KCl  
8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
1 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
pH 7,8

#### PBS-Tween :

PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20 (v/v)

### **Lösungen für den ECL-Nachweis**

#### Lösung A:

6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO

#### Lösung B:

1,25 mM Luminol in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5

#### Lösung C:

3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (v/v)

#### Entwicklerlösung :

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

#### Fixierlösung:

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

**Puffer für die Kopplung von Proteinen an CNBr-aktivierter Sepharose**Kopplungspuffer

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>  
 0,5 M NaCl  
 pH 8,3

Blockierungspuffer

100 mM Ethanolamin  
 mit 10N HCl auf pH 8,0 einstellen

**Puffer für die Immunaffinitätschromatographie mit mAk 5B8**Äquilibrierungspuffer / Waschpuffer 1

PBS / 1% Triton X

Waschpuffer 2

PBS / 1% Triton X-100 + 150 mM NaCl

Elutionspuffer 1 (EP1)

0,1 M Tris / HCl, pH 11,5

Elutionspuffer 2 (EP2)

3 M NaCl

Elutionspuffer 3 (EP3)

0,1 M Glycin, pH 2,5

Neutralisationspuffer 1

1 M Tris / HCl, pH 6,5

Neutralisationspuffer 2

0,5 M Tris / HCl, pH 8,5

**Lösungen für die Aufarbeitung von Proteinen**Solubilisationspuffer für Zellen

10 mM Tris / HCl pH 7,4  
 150 mM NaCl  
 1 mM CaCl<sub>2</sub>  
 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM PMSF, Proteaseinhibitorcocktail  
 1 % Triton X-100

**Puffer für die Aufarbeitung von Membranproteinen aus Maus- oder Rattenhirn**Homogenisationspuffer

1 mM NaHCO<sub>3</sub>  
 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM PMSF, Proteaseinhibitorcocktail  
 pH 7,5

Solubilisationspuffer

10 mM Tris / HCl pH 8  
 150 mM NaCl  
 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM PMSF, Proteaseinhibitorcocktail  
 1 % Triton X-100

### **Puffer für die Aufarbeitung der Cytosol-, Membran- und Cytoskelettproteinfraktionen aus Rattenhirn (für Ligandenaffinitätschromatographie und Pull-down)**

#### Homogenisationspuffer

10	mM	Tris / HCl pH 7,4
2	mM	EGTA
2	mM	MgCl <sub>2</sub>
75	mM	KCl
0,2	mM	ATP
0,5	mM	PMSF, Proteaseinhibitorcocktail

#### Solubilisationspuffer

wie Homogenisationspuffer  
+ 0,5 % Triton X-100

#### Cytoskelettpuffer

10	mM	Tris / HCl pH 7,4
0,2	mM	ATP
0,2	mM	CaCl <sub>2</sub>
75	mM	KCl

### **Puffer für die Ligandenaffinitätschromatographie**

Waschpuffer: Als Waschpuffer wurde der gleiche Puffer verwendet, in welchem auch die jeweilige Proteinfraktion vorlag (Homogenisationspuffer, Solubilisationspuffer oder Cytoskelettpuffer).

Elutionspuffer 1: wie Waschpuffer + 175 mM KCl

Elutionspuffer 2: wie Waschpuffer + 425 mM KCl,

Elutionspuffer 3: wie Waschpuffer + 925 mM KCl,

Gesamt-KCl-Konzentrationen in den Eluaten: E1: 250 mM, E2: 500 mM, E3: 1 M

### **Puffer für die Aufarbeitung von His-Tag-Proteinen durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie**

#### Nativer Lysis- und Bindepuffer:

20	mM	Phosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
500	mM	NaCl
15	mM	Imidazol
pH 7,8		

#### Nativer Waschpuffer pH 6,3

20	mM	Phosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
500	mM	NaCl
15	mM	Imidazol
pH 6,3		

#### Nativer Waschpuffer pH 6,0

20	mM	Na-Phosphat
500	mM	NaCl
15	mM	Imidazol
pH 6,0		

#### Elutionspuffer

wie Nativer Waschpuffer pH 6,0  
+ 50 - 500 mM Imidazol Stufengradient

#### Imidazolkonzentrationen im Stufengradienten in mM:

50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 500

**Puffer für die Aufarbeitung von GST-LANP**Lysispuffer

50	mM	Tris / HCl pH 8,0
200	mM	NaCl
1	mM	EDTA
5	mM	DTT
1	mM	PMSF + Proteaseinhibitor

Waschpuffer 1

50	mM	Tris / HCl, pH 8,0
200	mM	NaCl
1	mM	EDTA

Waschpuffer 2

50	mM	Tris / HCl, pH 8,0
200	mM	NaCl
1	mM	EDTA
1	%	Triton X-100

**Puffer für die Aufarbeitung von GST-PLC $\gamma$** Lysispuffer

10	mM	Tris / HCl, pH 8,0
150	mM	NaCl
1	mM	DTT
1	mM	EDTA
1	mM	PMSF
0,1	%	Triton X-100

Waschpuffer 1

50	mM	Tris / HCl pH 8,0
----	----	-------------------

**Lösungen für die tryptischen Verdau von Proteinen im Polyacrylamidgel**Verdaupuffer

25	mM	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
----	----	----------------------------------

Reduktionslösung

100	mM	DTT
100	mM	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>

Carbamidomethylierungslösung

55	mM	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
----	----	----------------------------------

Trypsinlösung

12,5	$\mu$ g/mL	Trypsin in
25	mM	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>

Immunpräzitationspuffer (Inkubations- und Waschpuffer)

10	mM	Tris / HCl pH 7,4
150	mM	NaCl
1	mM	CaCl <sub>2</sub>
1	mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5	mM	PMSF, Proteaseinhibitorcocktail
0,2	%	Triton X-100

Zellkultur-PBS

wie PBS,  
pH 7,4, Osmolarität: 297 mOsm

**2.1.11. Geräte**

Brutschrank (Bakterien)	BK 6160, Heraeus
Brutschrank (Zellkultur)	6000 Heraeus
Cleanbench	Faster 1, Bio-Flow-Technik
Elisa-Reader	Spectra, SLT-Labinstruments
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

**2.1.12. Sonstiges:**

Röntgenfilme	Kodak X-OMAT AR
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel

## 2.2. Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle verwendeten Materialien und Lösungen wurden durch Autoklavieren (20 min bei 120 °C) oder Erhitzen bei 180°C sterilisiert.

#### 2.2.1.1. RNA-Präparationen aus eukaryontischen Zellen mit RNeasy

Die Gesamt-RNA von PC12-Zellen wurden mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kit der Firma Qiagen (Hilden) isoliert. Mit dieser Methode werden RNA-Moleküle, die länger als 200 Nukleotide lang sind, isoliert, so daß es zu einer Anreicherung der mRNA kommt.  $5 \times 10^6$  Zellen werden pelletiert und mit 350 µL RLT-Puffer (mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt) gemischt (kurz vortexen und pipettieren). Das Lysat wird in eine Quiashredder-Säule die auf einem 2 mL Eppendorfgefäß plaziert ist, überführt und durch Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm homogenisiert. Das von den unlöslichen Bestandteilen befreite Lysat wird mit 350 µL 70% Ethanol durch auf- und abpipettieren gemischt und in eine RNeasy-Säule überführt. Die RNA wird hier an eine selektiv-bindende Silicagel-Membran gebunden. Nach 15 s Zentrifugieren bei 13 000 rpm wird die Säule mit 700 µL RW1-Puffer durch 2minütiges Zentrifugieren bei 13 000 rpm gewaschen. Nach zweimaligen Waschen der Säule mit 500 µL RPE-Puffer wird die Säulenmembran für 2 min trocken zentrifugiert. Die Säule wird in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die Elution erfolgt mit 30 µL RNase-freien Wasser (z.B. DEPC-Wasser) durch Zentrifugation bei 13000 rpm.

#### 2.2.1.2. RNA-Präparation aus Rattenhirn mit RNeasy

Für die Isolierung von RNA aus Gewebe wird eine maximale Ausgangsmasse von 30 mg frischen Gewebe bei Verwendung einer Mini-RNeasy-Säule empfohlen. Bei dieser Menge läßt sich die RNA in optimaler Menge und Reinheit durch RNeasy reinigen. Pro 10 mg Hirngewebe wird eine Ausbeute von 10 µg RNA erwartet.

Ein frisch entnommenes Rattenhirn wird sofort in flüssigen Stickstoff überführt und mit einem sterilen Mörser in einer sterilen Schale zu feinem Pulver zermahlen. Eine Spatelspitze des in flüssigen Stickstoff vorliegenden Gewebepulvers wird in ein sauberes, gekühltes Eppendorfgefäß überführt. Ohne die Probe auftauen zu lassen, läßt man den flüssigen Stickstoff verdampfen und gibt danach sofort 600 µL RLT-Puffer dazu. Nach Mischen wird das Lysat in eine Quiashredder-Säule, die auf einem 1,5 mL Eppendorfgefäß plaziert ist, überführt und zentrifugiert für 2 min bei 13000 rpm. Das im Eppendorfgefäß aufgefangene Gewebelysat wird für 3 min bei 13000 zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und mit 600 µL 70% Ethanol gemischt. 700 µL der Probe wird in eine RNeasy-Säule, die auf einem 2 mL Eppendorfgefäß plaziert ist, überführt und für 15 s bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und der Rest der Probe wird in die Säule gegeben. Nach erneuter Zentrifugation wird die Säule nacheinander mit 700 µL RW1-Puffer und zweimal mit 500 µL RPE-Puffer durch Zentrifugation gewaschen, wobei der Durchlauf nach jedem Waschvorgang verworfen wird. Zum Entfernen jeglichen Puffers wird die Säule anschließend für 1 min trocken zentrifugiert. Nach Überführung auf ein frisches Eppendorfgefäß wird die RNA 2x mit 30 µL RNase-freien Wassers eluiert.

### 2.2.1.3. cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

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.

Reaktionsansatz für 20 µL:     3 µL RNA (10 µg)  
                                  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 5x 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.

### 2.2.1.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) [Saiki et al., 1985] [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 Verdopplung 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 12x höhere Genauigkeit als die Taq-Polymerase.

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



5	µL	dNTP-Mix (insgesamt 1 mM)
5	µL	10 x PCR-Puffer mit MgSO <sub>4</sub>
36,5	µL	H <sub>2</sub> O
1	µL	Primer 1 (0,2 µM)
1	µL	Primer 2 (0,2 µM)
1	µL	Template-cDNA (10 –100 ng)
0,5	µL	Pfu-Polymerase (1,25 u)

Die PCR-Reaktionen fanden im Hybaid-Thermocycler (Touch down, MWG-Biotech) statt. Die Proben wurden zunächst für 5 min bei 94°C denaturiert. Anschließend folgten 25-30 Zyklen mit folgenden drei Temperatursprüngen:

1 min	94°C	(Denaturierung)
1 min	55°C	(Primer-Annealing)
1,5 min	72°C	(Synthese)

Nach 25-30 Zyklen erfolgte eine Inkubation bei 72°C für 10 min und eine fünfminütige Abkühlphase bei 4°C.

### 2.2.1.5. 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 µg/mL doppelsträngiger DNA bzw. 20 µg/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.

### 2.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle können größenabhängig in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit linearer Moleküle umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist (lineare Moleküle). Elektrophoresen wurden zur Größenbestimmung nach Restriktionsverdau, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Qualitätskontrolle von RNA benutzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in horizontalen 0,8 bis 1,5%-igen (w/v) Agarose-Gelen. Die Agarose (Pharmacia-LKB) wurde durch Kochen in TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf etwa 50°C in die entsprechenden Gelschlitten gegossen. In die noch flüssige Agarose wurde ein Kamm eingesetzt, der nach Erstarren der Agarose und Herausziehen die Taschen für die Proben bildet. Das Gel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen BPB-Probenpuffer versetzt und die Taschen hineinpipettiert. Bei analytischen Gelen betrug das Auftragsvolumen 5-20 µL, bei präparativen Gelen 100-200 µL. Als Größenstandard diente die 1 kb-Leiter (Gibco-BRL), von welcher 10 µL (250 ng) aufgetragen wurden. Die Elektrophorese wurde bei 70-80 V (5 V/cm) durchgeführt, bis der Farbmarker die gewünschte Laufstrecke zurückgelegt hatte. Zur Färbung der DNA-Banden wurde das Gel für 10-15 min in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/mL) gelegt unter UV-Licht fotografiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Bestrahlung rötlich.

### 2.2.1.7. Fällung von DNA

DNA lässt sich durch Ethanol oder Isopropanol fällen. Dazu werden 2 Volumina Isopropanol oder 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 4,8) und 2,5 Volumina kalter Ethanol (100%) zugegeben und die Ansätze durch Schwenken gemischt. Die Fällung erfolgt für 1 h bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Die gefällte DNA wird bei 12000 g für 20 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird 2x mit kaltem 70%-igem Ethanol und Zentrifugation für 10 min gewaschen und anschließend getrocknet. Die gefällte DNA wird in  $\text{H}_2\text{O}$  oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA) aufgenommen.

### 2.2.1.8. Isolierung von DNA-Fragmenten mittels Gelelution

DNA kann aus Agarose-Gelen durch ihre Verflüssigung in Spezialpuffer gelöst und durch QIAgen-Säulchen gereinigt werden. Verwandt wurde hierfür der „QIAquick-Gel-Extraction-Kit“ (Qiagen, Hilden). Der im Kit enthaltene Puffer QG enthält Salze, die die Struktur von Nukleinsäuren modifizieren. Der QG-Puffer ermöglicht das Schmelzen der Agarose bei relativ niedrigen Temperaturen und die optimale Bindung an die Silicagel-Membran in den Säulchen, die jeweils mittels kurzer Zentrifugation beladen, gewaschen und eluiert werden. Die DNA-Absorption ermöglicht die Reinigung von unerwünschten Primern und Verunreinigungen, wie Salze, Enzyme, nicht inkorporierte Nukleotide, Agarose, Ethidium-bromid, Ölen und Detergentien, da diese nicht binden. Salze werden durch den Ethanol-enthaltenden PE-Puffer quantitativ entfernt. Die Elution erfolgt unter basischen Bedingungen mit wenig Salz. Nach dem Ausschneiden der entsprechenden Banden aus einem Ethidium-bromid-gefärbten Gel unter UV-Licht (366 nm) wurde die DNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert.

### 2.2.1.9. Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen [Brooks, 1987]

Die Spaltung von DNA-Doppelsträngen mit Restriktionsendonukleasen wurde bei der Analyse, Klonierung und Fragmentisolierung von DNA eingesetzt. Ein Reaktionsansatz enthielt zwischen 1 und 50  $\mu\text{g}$  DNA. Restriktionsspaltungen wurden immer unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Pro Restriktionsansatz wurden etwa eine Einheit (U) Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA verwandt. Die erhaltenen Fragmente wurden mit Hilfe der TAE-Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Reinigung der Fragmente erfolgte durch Gelelution.

Beispiel eines Kontrollverdaus (15  $\mu\text{L}$ )

- 5  $\mu\text{L}$  DNA-Probe
- 1,5  $\mu\text{L}$  10x Reaktionspuffer (Typ-abhängig von verwendeten Enzym)
- 7,5  $\mu\text{L}$  aqua bidest.
- 1  $\mu\text{L}$  Restriktionsenzym

### 2.2.1.10. Ligation von DNA-Fragmenten [Weiss et al., 1968]

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mit Hilfe einer Ligase wird als Ligation bezeichnet. PCR-Produkten mit A-Überhang wurden in den pCR2.1-Vektor, der linearisiert, dephosphoryliert und mit Thymidin-Überhang geliefert wird, nach den Anweisungen des Herstellers (Invitrogen, Groningen, Niederlande) ligiert und

kloniert. Weiterhin wurden durch Restriktionsverdau erhaltene DNA-Fragmente mit linearisierten Vektoren ligiert. Dazu wurde die Vektor-DNA mit den gleichen Restriktionsenzymen linearisiert, mit denen auch das DNA-Fragment geschnitten wurde, um komplementäre Enden zu erhalten. Für die Ligation wurde die T4-DNA-Ligase von Gibco BRL (1U oder 10 U/ $\mu$ L) eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ L wurden ca. 0,5 pmol DNA-Insert (5  $\mu$ L), 0,1 pmol linearisierte Vektor-DNA, 4  $\mu$ L 5x Ligationspuffer und 1  $\mu$ L T4-DNA-Ligase zusammengegeben. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14 °C. Für die anschließende Transformation in den *E. coli*-Stamm INV $\alpha$ F' oder BL21(DE3)pLysS wurde meist der gesamte Ligationsansatz (20  $\mu$ L) verwendet.

#### **2.2.1.11. Plasmid-Schnell-Präparation [Birnboim & Doly, 1979]**

Mit der Plasmid-Schnell-Präparation nach Birnboim läßt sich Plasmid-DNA schnell gewinnen, allerdings besitzt die DNA-Präparation keinen hohen Reinheitsgrad und wird deshalb nur für die Charakterisierung von DNA durch Restriktionsverdau benutzt.

Von einer 3 mL *E. coli*-Übernachtskultur in selektivem LB-Medium wurden 1,5 mL in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 30 s bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100  $\mu$ L Minilysatlösung I resuspendiert, kurz mit Hilfe des Vortex gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Das in dieser Lösung enthaltene Lysozym verdaut die bakterielle Zellwand. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 200  $\mu$ L Minilysatlösung II und 5 minütiger Inkubation auf Eis. Diese stark alkalische Lösung lysiert die Zellen und setzt die DNA frei. Nach Zugabe von 150  $\mu$ L der Minilysatlösung III und kurzen Vortexen folgte eine 15-min Inkubation auf Eis. Die stark saure Lösung III neutralisiert die DNA-Lösung. Während die Plasmid-DNA schneller renaturiert und in Lösung bleibt, werden aufgrund der hohen Salzkonzentration der Lösung Proteine und die chromosomale DNA gefällt. Durch anschließende 10 minütige Zentrifugation bei 11000 rpm wurden die zellulären Proteine und die chromosomale DNA pelletiert. Der Plasmid-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 1 mL Isopropanol gefällt. Die ausgefallene DNA wurde mit 13000 rpm bei 4°C pelletiert und dreimal mit kaltem 70% Ethanol gewaschen. Die DNA konnte in Wasser aufgenommen, quantifiziert bzw. weiter analysiert werden.

#### **2.2.1.12. Chromatographische Isolierung von Plasmid-DNA – Midi- und Maxi-Plasmidpräparation**

Für die Isolierung größerer Mengen (100 oder 500  $\mu$ g) an Plasmid-DNA wurde die Midi- bzw. Maxi-Plasmidpräparation durchgeführt. Die Plasmidisolierung wurde nach den Anweisungen und mit den Materialien des Herstellers (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Diese Methode geht auf die alkalische Lyse nach Birnboim und Doly zurück, dem sich eine zusätzliche säulenchromatographische Aufreinigung der DNA anschließt. Bei dem Säulenmaterial handelt es sich um ein Anionen-Austauscher-Harz, an das DNA bei geringer Salzkonzentrationen und niedrigem pH bindet. Durch Erhöhung des pH Wertes und der Salzkonzentration kann die Plasmid-DNA eluiert werden.

30 bzw. 100 mL einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und das Pellet in 4 bzw. 10 mL Lösung P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 bzw. 10 mL Puffer P2 wurde die Lösung 4-6 x geschwenkt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 bzw. 10 mL Puffer P2 und 6x Schwenken wurde die gefällten Proteine und die genomische DNA durch Zentrifugation für 15 min bei 7000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde erneut für 15 min bei 11000 rpm zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Qiagen-Säulen mit 4 bzw. 10 mL QBT Puffer

äquiliibriert Der Plasmid-haltige Überstand wurde auf die Säulen gegeben. Nach Passieren der Säule per Schwerkraft wurde die Säule 2x mit 10 bzw. 30 mL QC-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 5 bzw. 15 mL QF-Puffer. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 0,7 V Isopropanol (RT) gefällt und für 30 min bei 15000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend 2x mit 70% Ethanol gewaschen und für 10 min bei 15000 g zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets durch Zentrifugieren in der speed vac wurde das Pellet in 100 bzw. 300 µL H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.2.1.13. DNA-Sequenzierung [Sanger et al., 1977]

Alle Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1992) durchgeführt. Bei der Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Sequenzierprimern (IRD 700 oder IRD 800) wurde in einem Gesamtvolumen von 17 µL 1,2 µg DNA-Template mit 2 pmol IRD-markiertem Sequenzierprimer (auch 2 Primer gleichzeitig möglich, wenn der eine IRD 700 und der andere IRD 800 markiert) in H<sub>2</sub>O gelöst. Jeweils 4 µL des Templateansatzes wurde auf vier verschiedenen dNTP-Mixe des „Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kits“, die jeweils eines der vier Didesoxynukleotide (ddNTPs) (entweder ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) für den Abbruch der Polymerasereaktion enthalten verteilt. Die 6 µL-Ansätze wurden für 2 min bei 94°C inkubiert und anschließend einem Cycle-Sequencing mit 18 bis 25 Zyklen unterzogen (10s 72°C/ 20 s 60°C/ 20 s 95°C). Die Proben wurden auf 4°C abgekühlt. 1 µL des zuvor mit 4 µL Gelladepuffer gestoppten Reaktionsmixes wurde auf ein 6%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (LI-COR 4200, MWG-Biotech, München) analysiert.

Bei der Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden konnten unmarkierte Sequenzierprimer verwendet werden. 1 µg DNA wurde mit 10 pmol Sequenzierprimer und 4 µL „BigDye-Lösung“ des BigDye-™ Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Applied Biosystems, UK) in einem Gesamtvolumen von 10 µL gelöst. Nach der Sequenzier-PCR (30 s 96°C, 25 Zyklen: 30 s 96°C / 15 s 60 °C / 4 min 60 °C) wurden die Proben über Centriflex™ Gel-Filtration-Cartridges (Edge BioSystems, UK) gereinigt, wobei die Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, nicht inkorporierte Primer und Nukleotide an die Säulenmatrix binden. Die eluierten DNA-Fragmente wurden in der speed vac getrocknet und in 20 µL Template-Suppression-Reagent (Applied BioSystems, UK) resuspendiert. Die Proben wurden in einer automatischen Sequenzierereinrichtung (ABI Prism 310 Genetic Analyzer; Applied BioSystems, UK) analysiert.

## 2.2.2. Mikrobiologische Methoden

### 2.2.2.1. Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte in LB-, oder SOB-Medium, dem nach Bedarf Ampicillin und /oder Chloramphenicol zugesetzt wurde. Die Wahl des Antibiotikums richtete sich nach dem integrierten Resistenzgen. Die Kulturen wurden bei 37°C auf Festmedium (1,5% Agar in LB) oder in Schüttelkulturen bei 220 rpm und 37°C inkubiert. Ausgangsmaterial zum sterilen Beimpfen von Kulturen waren Einzelkolonien von einer Kulturplatte. Die Langzeitlagerung von *E.coli* erfolgte nach Zusatz von Glycerin (Endkonzentration von 20% (v/v)) bei -80°C.

### 2.2.2.2. Herstellung kompetenter Bakterien [Dagert & Ehrlich, 1979]

Nach der Methode von Dagert und Ehrlich werden Bakterien mit  $\text{CaCl}_2$  behandelt, wodurch ihre Zellmembranen vorübergehend für DNA-Moleküle permeabel werden.

100 mL LB-Medium wurden mit 1 mL einer Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln (220 rpm) bei  $37^\circ\text{C}$  bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,2 herangezogen. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 6000 rpm für 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment in 20 mL eiskaltem 100 mM  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde erneut zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet erneut in 500  $\mu\text{L}$  kaltem  $\text{CaCl}_2$  resuspendiert. Nun konnten die Zellen sofort zur Transformation eingesetzt werden oder mit 20% (v/v) Glycerin versetzt bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

### 2.2.2.3. Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien durch Hitzeschock [Sambrook et al., 1989]

Als Transformation wird die Aufnahme von Fremd-DNA und somit die genetische Veränderung von Bakterien bezeichnet.

Zu 100  $\mu\text{L}$  kompetenten Zellen wurde 10-50 ng Plasmid-DNA oder 20  $\mu\text{L}$  eines Ligationsansatzes pipettiert und die Proben 30 min auf Eis gehalten. Es folgte eine 2 minütige Inkubation bei  $42^\circ\text{C}$  im Wasserbad, um die Aufnahme der DNA zu erleichtern. Die Zellen wurden 2 min auf Eis und danach in 450  $\mu\text{L}$  LB-Medium oder alternativ in SOC-Medium für 1 h schüttelnd bei  $37^\circ\text{C}$  zur Regeneration inkubiert. Aliquots von 50 und 200  $\mu\text{L}$  dieser Zellsuspension wurden auf vorgewärmten LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (Ampicillin und/oder Chloramphenicol) ausplattiert.

### 2.2.2.4. Expression von rekombinanten Fusionsproteinen und Zellaufschluß

Die Überexpression der His-getaggten Fusionsproteine erfolgte nach dem Benutzerhandbuch des Herstellers des Expressionsvektors pRSET (Invitrogen, Niederlande). Die Überexpression der cytNCAM-Fusionsproteine und des vom leeren pRSET C-Vektor kodierenden Kontrollproteins erfolgte in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS. Dieser Stamm enthält ein Gen für die T7-RNA-Polymerase, welches unter Kontrolle des lacUV5-Promotors steht. Das Plasmid pLys enthält zusätzlich ein konstitutiv schwach exprimiertes Gen für das T7-Lysozym, was die Hintergrundexpression durch Inhibition der T7-RNA-Polymerase verringert. Durch Zugabe von IPTG zum Medium wird die Expression der T7-RNA-Polymerase durch den lacUV5-Promotor induziert, die anschließend die Inserts in pRSET C bzw. das Kontrollprotein in Abhängigkeit des T7-Promotors transkribiert.

Die Überexpression von rekombinanten GST-LANP, GST-PLC $\gamma$  und GST erfolgte ebenfalls im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS.

### 2.2.2.5. Pilotexpression von His<sub>6</sub>-Tag Fusionsprotein

Zur Ermittlung der optimalen Ausbeute des rekombinanten Proteins muß zunächst der zeitliche Verlauf der Expression untersucht werden. Mit Hilfe der Pilotexpression kann die optimale Expressionszeit bestimmt, und es können zusätzliche Informationen über die weitere Aufarbeitung erhalten werden. Befindet sich das überexprimierte Protein in der löslichen

Fraktion, kann unter nativen Bedingungen weiter gearbeitet werden, verbleibt es in der unlöslichen Fraktion, muß denaturierend aufgearbeitet werden.

Für die Pilotexpression wurde eine 2 mL-Übernacht-Kultur in SOB-Medium mit Ampicillin (50 µg/mL) und Chloramphenicol (35 µg/mL) angeimpft. Am nächsten Tag wurde die Vor-kultur mit SOB-Medium und Antibiotika auf eine 25 mL-Kultur erweitert und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 inkubiert. Als Nullkontrolle wurde ein 1 mL Aliquot abgenommen. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) wurde induziert und die Bakterien 5h wachsen gelassen. Stündlich wurden 1 mL Aliquots abgenommen. Alle Aliquots wurden pelletiert und die Pellets in 100 µL PBS-Puffer aufgenommen. Durch 6 Frieren/Tauen-Zyklen wurden die Zellen aufgeschlossen. Durch die anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min wurden lösliche von unlöslichen Bestandteilen getrennt. Die Pellets wurden in 50 µL PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 5x Probenpuffer und 5 min Kochen wurden die Proben im 7,5%-igem (cytNCAM 180), 10%-igem (cytNCAM 140) oder 15%-igem (Kontrollprotein) SDS-PAGE aufgetrennt. Um ähnliche Proteinmengen pro Spur aufzuladen, wurden die aufgetragenen Volumina den OD<sub>600</sub>-Werten der jeweiligen Zeitpunkte angeglichen.

#### **2.2.2.6. Expression von rekombinanten His<sub>6</sub>-Tag Fusions-Protein**

Für die Proteinexpression im großem Maßstab wurden die in der Pilotexpression bestimmten optimalen Bedingungen und Zeiten verwendet. Für die Expression wurden meistens 3-5 L Ansätze gewählt. Dazu wurden 200-400 mL Kulturen ü.N. in SOB-Medium mit Ampicillin (50 µg/mL) und Chloramphenicol (35 µg/mL)ü.N. angezogen und am nächsten Tag mit SOB-Medium auf 3-5 L erweitert. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 wurden die Kulturen mit IPTG (Endkonzentration 1mM) induziert und 3-4 h wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien bei 5000 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 12 mL PBS/1% Triton X-100, (cytNCAM) pro L Kultur bzw. nativem Bindepuffer (Kontrollprotein), resuspendiert und bei - 80 °C eingefroren.

#### **2.2.2.7. Zellaufschluß**

Die resuspendierten Zellpellets wurden in 15 mL Falcons überführt mit PMSF (Endkonzentration 1mM) und Proteaseinhibitor (1:250) versetzt und 6 mal in flüssigen Stickstoff gefroren und im Wasserbad (RT) aufgetaut. Durch die Ausdehnung des Wassers beim Frieren werden die Zellmembranen aufgebrochen und es erfolgt eine Freisetzung der cytosolischen, löslichen Bestandteile. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten nun auf Eis oder bei 4°C. Um die Zähigkeit des Lysats zu verringern, wurde DNase und RNase (je 10µg/mL) zugegeben. Nach 2-3 h Inkubation auf Eis wurde das Lysat bei 27 000 g, 30 min, 4°C zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die löslichen Bestandteile.

#### **2.2.2.8. Expression der GST-Fusionsproteine und Zellaufschluß**

Die Expression der GST-Fusionsproteine erfolgte im Prinzip wie die Expression der His-Tag-Fusionsproteine, nur daß für die Großexpression aufgrund der höheren Ausbeute nur 100 mL-*E.coli* Kulturen eingesetzt wurden.

Bis zur Induktion mit IPTG wurden die Kulturen bei 37°C kultiviert. Nach Induktion mit 0,1 mM IPTG erfolgte die Inkubation bei 30°C . Die GST-LANP-BL21-Transfektanten wurden 3-16 h, die GST-PLCγ-Transfektanten 3 h wachsen gelassen. Nach Abzentrifugation der Bakterien bei 3000 rpm für 10 min wurde das Pellet in 10 mL Lysispuffer aufgenommen.

Die Lysis der Zellen erfolgte durch 5x Frieren-Tauen-Zyklen. Anschließend wurde das Lysat 5x durch eine Insulinspritzenkanüle gezogen und bei 18 000 g für 30 min zentrifugiert.

### **2.2.3. Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1. Kultivierung und Passagieren von eukaryontischen Zellen**

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>-Begasung. PC12-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10% Pferdeserum als Suspensionskultur gehalten. Je nach Zelldichte werden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert und verdünnt. Hierzu wurde die Zellsuspension aus der Kulturflasche in Falconröhrchen überführt und für 3 min bei 900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, die Zellen mit einer Kanüle vereinzelt und anschließend wieder in ein mit frischem Medium versetztes Kulturgefäß überführt. PC12-Zellen, die auf Matrixprotein-beschichteten Kulturschalen wuchsen, wurden mit 0,05% EDTA in PBS von der Schale gelöst.

#### **2.2.3.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen**

Eukaryontische Zellen können in flüssigen Stickstoff für längere Zeiträume gelagert werden. Dazu wurden frisch gewaschene und pelletierte PC12-Zellen in RPMI-Medium mit 20% Pferdeserum und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen, langsam auf -80°C abgekühlt und in flüssigen Stickstoff überführt. Eingefrorene Zellen können wieder in Kultur genommen werden, indem sie schnell aufgetaut, in frischem Medium gewaschen und anschließend in Medium im Brutschrank inkubiert werden.

#### **2.2.3.3. Transfektion von eukaryontischen Zellen mittels Lipofektion**

Mit der Methode der Lipofektion können in Plasmid-klonierte Gene in eine Vielzahl von eukaryontischen Zelltypen transfiziert werden und sowohl transient als auch stabil exprimiert werden. Für die transiente Transfektion wurde das Lipofectamin TM 2000 Reagenz und das OPTI-MEM I-Medium von Gibco BRL verwendet.

Am Tag vor oder 7 h vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^7$  PC12-Zellen auf eine Kollagen IV-beschichtete (20 µg/mL) 10 cm-Kulturschale ausgesät und bei 37°C in RPMI/10% Pferdeserum ohne Antibiotika kultiviert. Für die Transfektion wurden 11 µg DNA in 1,5 mL OPTI-MEM I-Medium verdünnt. Ebenso wurde 20 µL Lipofectaminreagenz in 1,5 mL OPTI-MEM I-Medium gelöst und für 5 min bei RT inkubiert. Die DNA/OPTI-MEM-Lösung wurde anschließend in die Lipofectamin/OPTI-MEM-Lösung überführt. Während der folgenden 20 minütigen Inkubation bei RT kommt es zu Formierung von DNA-Lipofectamin-Komplexen. In der Zwischenzeit wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen abgesaugt und durch 10 mL frisches Medium (ohne Antibiotika) ersetzt. Die DNA-Lipofectamin-OPTI-MEM-Lösung wurde nun langsam unter leichtem Schwenken der Kulturschale zu den PC12-Zellen geträpelt. Die Zellen wurden danach wieder bei 37°C kultiviert. Nach 16-24 h Inkubation wurde das Medium gewechselt und die Zellen verdünnt.

#### **2.2.3.4. Quantifizierung der cytNCAM-transient transfizierten PC12-Zellen**

Die Ermittlung der Transfektionseffizienz erfolgte durch Indirekte Immunfluoreszenz. Ein Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für zwei Tage auf Kollagen IV-beschichtete Objektträger kultiviert. Die Immunfluoreszenz wurde wie in 2.2.3.5. beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem NCAM-spezifischen Antikörper 5B8 und dem entsprechenden fluoreszenzgekoppelten zweiten Antikörper inkubiert.

In den Immunfluoreszenzbildern waren deutlich stark gefärbte von schwach gefärbten Zellen zu unterscheiden. Unter der Annahme, daß es sich bei den stark gefärbten Zellen um cytNCAM-transfizierte Zellen handelt, wurde der Anteil der stark gefärbten Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl für drei Immunfluoreszenzbilder (160-fache Vergrößerung) ermittelt. Für die Berechnung der Transfektionseffizienz wurde die Färbung von etwa 300 Zellen untersucht.

#### **2.2.3.5. Differenzierung von NGF- und NCAM-stimulierten PC12-Zellen**

Kulturschalen wurden ü.N. mit 20 µg/mL Kollagen IV (human, C5533, Sigma, Deisenhofen) beschichtet und am nächsten Tag 1x mit PBS gewaschen.

PC12-Zellen wurden in einer Dichte von 150 Zellen / mm<sup>2</sup> in die Kulturschalen gegeben und in Ab- oder Anwesenheit von 3 ng/mL (bzw. 10 ng/mL) NGF (Roche Biochemicals) mit und ohne 2,5 µg/mL löslichen NCAM (Chemicon) für 2 Tage kultiviert. Die Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert, 1x gewaschen und für 30 min mit gefilterten 0,1% Kristallviolett gefärbt. Anschließend wurden die Zellen 3x mit aqua bidest. gewaschen.

Bei den Untersuchungen des Neuritenwachstums in Gegenwart des ROK $\alpha$ -Inhibitors Y27632 (Calbiochem.) wurde der Inhibitor 5 h nach Ausplattieren der Zellen in einer Konzentration von 100 µM zugegeben (im Vorversuch: Inhibitorkonzentrationen: 10 µM–1mM). Transient transfizierte PC12-Zellen wurden 16 h nach Transfektion für die Differenzierungsassays verwendet.

#### **2.2.3.6. Quantifizierung der Neuritenlängen von PC12-Zellen**

Pro Kulturbedingung wurden 15-20 Bilder bei einer 160-fachen Vergrößerung am Durchlichtmikroskop angefertigt. Die Bilder wurden in DIN A4-Größe ausgedruckt und die Anzahl der Zellen pro Bild manuell gezählt. Von jedem Bild wurden alle Neuriten auf eine Folie mit einem Stift nachgezeichnet. Mit Hilfe von Adobe Photoshop Software wurden die Längen der nachgezeichneten Neuriten als Pixel quantifiziert. Für jedes Bild wurde der Quotient Anzahl der Pixel/Anzahl der Zellen gebildet, so daß man die relative Neuritenlänge pro Zelle für jedes Bild erhält. Nach Mittelwertbildung der 15-20 Werte und Berechnung des Standardfehlers oder der Standardabweichung wurde bei Bedarf mittels SPSS-Software die Signifikanz der Stichproben mit ANOVA oder mit dem 2-Stichproben-T-Test zum Signifikanzniveau  $\alpha = 0,01$  getestet.



### 2.2.3.7. Indirekte Immunfluoreszenz

Proteine und ihre zelluläre Lokalisation können durch Fluoreszenz-Markierung und indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen werden.

Objektträger wurden ü.N. mit 20 µg/mL Matrixprotein in PBS beschichtet und am nächsten Tag mit PBS gewaschen. PC12-Zellen wurden in einer Dichte von 150 Zellen/mm<sup>2</sup> mit oder ohne entsprechender Zusätze ausplattiert (200 µL Medium pro 8er-Well-Vertiefung). Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 10 min mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Sollten intrazelluläre Proteine lokalisiert werden, so wurde nach Entfernen der Fixierlösung und zweimaligen Waschen mit PBS die Zellen durch 10 minütige Inkubation mit 0,025% Saponin in PBS permeabilisiert. Nach 2x Waschen mit PBS wurden die Objektträger mit 1% BSA/PBS (sterilfiltriert) für 20 min abgesättigt. Die Markierung der Proteine mit spezifischen erstem Antikörper erfolgt durch ü.N.-Inkubation bei 4°C. Nach 2x Waschen mit PBS erfolgt die Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern (FITC oder TRIC-Rhodamin). Die Objektträger werden 3x gewaschen und nach Trocknen werden die Zellen mit Elvanol unter Objektgläschen einge-deckt. Die Auswertung der Fluoreszenz erfolgte entweder am Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) oder am Laser-Scan-Mikroskop.

Antikörperverdünnungen für die Immunfluoreszenz:

Antikörper	Verdünnung in PBS
5B8 Anti-NCAM	1 : 50 (9 µg/mL)
Anti-poly-NCAM	1 : 25
Anti-TOAD-64	1 : 800
Anti-LANP	1 : 50
Anti-Syndapin	1 : 25
Anti-ROK $\alpha$	1 : 50
Anti-PYK2	1 : 100
Anti-PLC $\gamma$	1 : 50
Ziege-anti-Maus IgG (FITC-Konjugat)	1 : 250
Ziege-anti-Kaninchen IgG (TRIC-Konjugat)	1 : 250

### 2.2.4. Biochemische Methoden

#### 2.2.4.1. Proteinbestimmung

BCA-Methode [Smith et al., 1985]

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurde der BCA-Test-Kit der Firma Pierce, Rockford, USA, verwendet. Der Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B (4% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O). Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup>. Die Bichinolin-4-carbonsäure reagiert mit Cu<sup>+</sup>, wobei zwei Bichinolinsäure-Moleküle einen intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu<sup>+</sup>-Ion eingehen. Die vorliegenden Proben wurden in 96er-Well-Mikrotiterplatten mit je 200 µL der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wurde, versetzt. Nach 30 min-Inkubation bei 37°C wurde die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Eichreihe aus Rinder-Serum-Albumin (BSA) bekannter Konzentrationen konnte die unbekannte Proteinkonzentration der zu testenden Probe bestimmt werden.

### Bradford-Methode [Bradford, 1976]

Bei der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration in der Lösung.

10 µL Proteinlösung wurden mit 200 µL Bradfordreagenz in Mikrotiterplatten 2 min inkubiert und die Absorption bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Anhand einer Eichreihe mit BSA können die Konzentration bestimmt werden.

### **2.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970]**

In SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Porengröße der Gele kann über den Acrylamidanteil je nach Größe der aufzutrennenden Moleküle variiert werden. Für die vertikale Elektrophorese wurde die Minigelapparatur der Firma Biorad verwendet. Als Trenngele wurden 6%-, 7,5%-, 10%- und 15%-ige Acrylamid-Minigele verwendet. Die Lösungen für das Trenngel wurden gemischt, bis ca. 3 cm unterhalb der oberen Glasplattenkante gegossen und mit aqua bidest. überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel gegossen. Die Proben wurden mit einem Fünftel Volumenanteil 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgte bei der konstanten Spannung von 150 V. Als Größenstandard diente der Prestained-Molecular-Weight-Standard und der Dalton Marker VII der Firma Sigma sowie die Protein-Leiter der Firma Gibco.

Es wurden sowohl reduzierende als auch nichtreduzierende SDS-PAGE durchgeführt. Bei den nichtreduzierenden Gelelektrophoresen wurden die Proben mit nicht-reduzierenden Probenpuffer (ohne DTT) versetzt.

### **2.2.4.3. Westernblotting**

Mit der Methode des Westernblottings werden in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll, 0,45 µm) transferriert. Die übertragenen Proteine können immunologisch mit spezifischen Antikörpern und mit an diesen bindenden Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern detektiert werden.

Das Blotting wird nach dem Tank-Blot-Verfahren unter Verwendung der Blotapparatur von Biorad durchgeführt. Nach Äquilibrieren von Whatmanpapier und Nitrocellulosemembran in Transferpuffer wird der Sandwichblot luftblasenfrei zusammengebaut, wobei die Nitrocellulosemembran der Anode zugewandt ist. Der Transfer erfolgte bei 4°C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 60 min in Towbin-Puffer.

Anschließend können die transferrierten Proteine auf der Membran mit Ponceau-Rot reversibel angefärbt werden. Dazu wird die Membran ca. 1 min in Ponceau-Lösung geschwenkt und anschließend in aqua bidest. solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Vor der Inkubation mit Antikörpern wird die Membran entfärbt und für 1 h mit 10% Magermilchpulver in PBS-Tween für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen der Membran erfolgt die Inkubation mit dem im PBS verdünnten ersten Antikörper über Nacht bei 4°C. Nach Entfernen des Antikörpers wird die Membran 6x 10 min mit PBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper, z.B. einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (1:5000), für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wird gründlich mindestens 6x 10 min gewaschen, wobei beim letzten Waschen PBS ohne Tween verwendet wird. 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 µl Luminol-Lösung A, 1 mL Luminol-Lösung B und 3 µL Luminol-Lösung C für 1 min inkubiert. Nach Trocknen mit Whatman-Papier wird die Membran in eine Folie gelegt und für 5 s 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.

#### Verwendete Erst- und Zweitantikörper

Erstantikörper	Verdünnung in PBS-Tween	Zweitantikörper (Peroxidase-gekoppelt)	Verdünnung in PBS-Tween
Anti-NCAM 5B8	1: 1000	RAM	1 : 5000
Anti-NCAM H28	1: 1000	Kaninchen-anti-Ratte	1 :10000
Poly-NCAM-AK	1: 500	GAR	1 : 5000
AntiXpress™-Epitop Antikörper	1 : 5000	RAM	1 : 5000
Anti-α-Tubulin	1 : 5000	RAM	1 : 5000
Anti-β-Tubulin	1 : 5000	RAM	1 : 5000
Anti-MAP 1A	1 : 2000	RAM	1 : 5000
Anti-Actin	1 : 5000	RAM	1 : 5000
Anti-α-Actinin	1 : 2000	GAR	1 : 5000
Anti-Tropomyosin	1 : 2000	GAR	1 : 5000
Anti-Hirn-Spectrin	1 : 500	GAR	1 : 5000
Anti-LANP	1 : 500	GAR	1 : 5000
Anti-TOAD-64	1 : 15000	GAR	1 : 5000
Anti-Syndapin	1 : 500	RAM	1 : 5000
Anti-VCP	1 : 500	RAM	1 : 5000
Anti-PLCγ	1 : 1000	RAM	1 : 5000
Anti-PYK2	1 : 2000	RAM	1 : 5000
Anti-ROKα	1 : 1000	RAM	1 : 5000
Anti PP1	1 : 1000	RAM	1 : 5000
Anti PP2A	1 : 1000	RAM	1 : 5000
Anti-ERK2	1 : 1000	GAR	1 : 5000
Anti-ERK1	1 : 1000	GAR	1 : 5000
Anti-p130Cas	1 : 1000	RAM	1 : 5000

#### **2.2.4.4. Färben der Gele**

##### Coomassie-Blau-Färbung

Proteine im Gel lassen sich mit Coomassie-Blau G-250 färben. Die Färbung verläuft quantitativ, wobei die Empfindlichkeit mäßig ist, die untere Detektionsgröße liegt bei 200-400 ng pro Bande. Nach der Elektrophorese wird das Gel für 30 min in der Färbelösung und anschließend in der Entfärbelösung für 2-3 h geschwenkt.

##### Silberfärbung

In der Silberfärbung bilden Ag-Ionen Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Die Ag<sup>+</sup>-Komplexe werden durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert. Die Silber-

färbung 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 3x 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 zweimaligen 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.

#### **2.2.4.5. Solubilisation von Zellen**

PC12-Zellen wurden nach Abzentrifugieren mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit Solubilisationspuffer versetzt und bei 4°C für 1 h unter Rütteln solubilisiert. Die anschließende 30 minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm liefert im Überstand das lösliche Solubilisat.

#### **2.2.4.6. Aufarbeitung von Cytosol sowie Membran- und Cytoskelettproteinangereicherten Fraktionen aus Rattenhirn**

Zwei frisch entnommene Hirne von adulten Wildtyp-Wistarratten wurden in einem Potter mit einem Pistill nach Zugabe von 20 mL Homogenisationspuffer (Volumenverhältnis Puffer/Hirne 5:1) homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 3000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das erhaltene Pellet erneut mit 20 mL Puffer homogenisiert und zentrifugiert. Die gesammelten Überstände wurden anschließend in der Ultrazentrifuge bei 100 000 g für 1 h zentrifugiert. Der resultierende Überstand stellt die Cytosolfraktion dar. Das UZ-Pellet 1 wurde in 50 mL Solubilisationspuffer (0,5% Triton X-100) aufgenommen und durch einstündiges Rühren auf Eis solubliert. Das Solubilisat wurde für 1 h bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand präsentiert die Membranprotein-angereicherte Fraktion. Das UZ-Pellet 2 wurde in 20-40 mL Cytoskelettpuffer aufgenommen und wieder für 1 h unter Rühren auf Eis inkubiert. Die erneute Ultrazentrifugation (1h, 100 000 g) liefert die im Überstand vorliegende Cytoskelettprotein-angereicherte Fraktion. Für die Ligandenaffinitätschromatographie wurden die Proteinkonzentrationen der drei Fraktionen auf 1-3 mg/mL eingestellt.

#### **2.2.4.7. Herstellung von Maushirnhomogenisat für die Immunpräzipitation**

Drei Hirne von 14 Tage alten Mäusen wurden in 4 mL Solubilisationspuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl, 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Triton X-100) im Potter mit einem Teflonpistill homogenisiert. Das Homogenisat wurde für 1 h rührend auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Homogenisat mit Puffer ohne Detergenz auf 10 mL aufgefüllt und für 1 h bei 100 000 g zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand wurde dieser so mit Puffer verdünnt, daß die Triton X-100-Endkonzentration bei 0,2% und die Proteinkonzentration bei 2 mg/mL lag.

### 2.2.4.8. Chromatographische Methoden

#### 2.2.4.8.1. Kopplung des mAk 5B8 an Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B

Die 5B8 IgGs wurden aus Zellkulturüberstand über Protein-G-Affinitätschromatographie gewonnen und nach Einengen und Dialyse gegen Kopplungspuffer für die Kopplung an CNBr-aktivierter Sepharose der Firma Pharmacia Biotech verwendet. Proteine und Peptide binden über ihre primären Aminogruppen an die CNBr-aktivierte Sepharose. Nach Angaben des Herstellers sollen 3-5 mg Protein pro mL Sepharose zur Kopplung eingesetzt werden. 0,5 g Sepharose (ergibt etwa 1,5 ml Gel) wurde für 5 min in 1 mM HCl (pH 2-3) bei RT quellen gelassen und anschließend mit 100 mL 1mM HCl für 15 min langsam auf einer Fritte gewaschen. Nach Zugabe der Kopplungslösung, die 5 mg 5B8-Antikörper in einer Konzentration von 1 mg/mL enthielt, fand die Kopplung für 1 h bei RT unter Drehen inkubiert. Zur Blockierung noch freier reaktiver Gruppen wurde das Gel mit 100  $\mu$ M Ethanolaminlösung, pH 8,0, ü.N. bei 4°C rüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Säule abwechselnd mit hohem und niedrigem pH-Wert und hoher und niedriger Salzkonzentration gewaschen, um nicht gebundene Liganden zu entfernen:

1. Waschen mit 10 mL 0,1 M Tris / HCl, pH 11,5
2. Waschen mit 10 mL 3 M NaCl/H<sub>2</sub>O
3. Waschen mit 10 mL 0,1 M Glycin, pH 2,5

Der letzte Waschschritt erfolgte mit 30 mL PBS/0,01% NaN<sub>3</sub>. Die Säule wurde in PBS/0,02% NaN<sub>3</sub> gelagert.

#### 2.2.4.8.2. Kopplung der Liganden (cytNCAM, Kontrollprotein) an Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B

Als Matrix für die Ligandenaffinitätschromatographie wurde ebenfalls Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B verwendet. Für die Kopplung wurde immunaffinitätschromatographisch-gereinigtes cytNCAM-Fusionsprotein oder über Ni-NTA-gereinigtes Kontrollprotein verwendet. Es wurden jeweils 5-7 mg Protein für die Kopplung eingesetzt. Die Durchführung der Kopplung erfolgte wie in 2.2.4.8.1. beschrieben.

#### 2.2.4.8.3. Isolierung und Reinigung von überexprimierten cytNCAM durch Immunaaffinitätschromatographie

Die Immunaaffinitätschromatographie ermöglicht eine schnelle selektive Isolierung von Antigen, wobei die Ausbeute bei 50% liegen kann. Die Elution des Antigens erfolgt unspezifisch, entweder mit hohem oder niedrigen pH-Werten oder hohen Salzkonzentrationen.

Da bei der Elution mit pH-Sprüngen die Proteine häufig ihre biologische Aktivität verlieren können und denaturieren, sollte das Eluat sofort neutralisiert und dialysiert werden.

Der monoklonale Antikörper 5B8 erkennt eine Peptidsequenz innerhalb der cytoplasmatischen Domäne von NCAM 140 und NCAM 180 und kann somit für die Aufreinigung der überexprimierten cytoplasmatischen Domänen in der Immunaaffinitätschromatographie verwendet werden.

Die 5B8-Säule wurde zunächst mit 30 mL PBS/1% Triton X-100 voräquilibriert. Das cytNCAM-haltige in PBS/ 1% Triton X-100 vorliegende Bakterienlysate (1-3 mg/mL Protein) wird ü.N. bei 4°C rezirkulierend langsam (0,3 mL/min) über die Säule gepumpt. Die Säule wurde sehr langsam (0,1 mL/min) ü.N. mit 100-150 mL 2xPBS gewaschen. Die letzten 10

mL wurden mit 1xPBS ohne Triton X-100 gewaschen. Die Elution erfolgte jeweils mit 7 mL (7 Gelvolumina)

a) 0,1 M Tris / HCl, pH 11,5, neutralisiert mit 2 mL 1M Tris / HCl, pH 6,8

b) 3 M NaCl

c) 0,1 M Glycin, pH 2,5, neutralisiert mit 0,7 mL 0,5 M Tris / HCl, pH 8,5)

Die Flußrate betrug beim Eluieren 0,5 mL/min. Nach der Elution wurde die Säule mit PBS gewaschen.

#### **2.2.4.8.4. Reinigung von überexprimierten poly-Histidin-markierten Fusionsproteinen durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie**

Fusionsproteine mit poly-Histidin-Resten lassen sich leicht und schnell mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie reinigen. Die Histidinreste können zweiwertige Kationen wie  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  komplexieren. In der Ni-NTA-Chromatographie sind zweiwertige Ni-Ionen über vier ihrer sechs Bindungsstellen an NTA (Nitrilotriessigsäureacid), einem vierzähligen Liganden, der an der Agarose-Matrix gekoppelt ist, gebunden. Histidinreste der rekombinanten Proteine können an die beiden verbleibenden Bindungsstellen des Ni-Ions über ihre Imidazolringe binden, wodurch die Proteine an der Ni-NTA immobilisiert werden. Imidazol allein, eine Teilstruktur von Histidin, bindet ebenfalls an Ni-Ionen und kann zur Elution gebundener Proteine verwendet werden. Bei einer Imidazolkonzentration von 100-250 mM dissoziieren die 6xHis-Proteine, da sie nicht länger mit Imidazol kompetieren können. Auch eine Reduktion des pH-Wertes läßt gebundene His-Tag-Proteine eluieren. Der N des Imidazolringes von Histidin wird bei pH 4,5-5,3 protoniert, so daß ein positives Ammoniumion entsteht, das vom positiv geladenen Ni-ion abgestoßen wird. Zur Verminderung der Bindung nicht getaggt, Histidin-haltiger Backgroundproteine sind geringe Imidazolkonzentrationen (10-20 mM) bereits für die Kopplung und Waschprozeduren empfehlenswert. Ebenso kann bei den Waschschrinen der pH-Wert bis auf pH 6,0 reduziert werden.

Mit Hilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde das in der Ligandenaffinitätschromatographie verwendete 6xHis-getaggte Kontrollprotein gereinigt.

3 mL Ni-NTA-Agarose wurde 2x mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und 2x mit nativen Bindepuffer äquilibriert. 40 mL Kontrollprotein-haltiges Bakterienlysate (inclusive 20 mM Imidazol) wurde für 2 h bei 4°C mit der äquilibrierten Ni-NTA-Agarose an einem Überkopfdrehspieß inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde die Ni-NTA-Agarose im Batch-Verfahren 2x mit nativem Bindepuffer pH 7,8, 3x mit nativem Waschpuffer pH 6,3 und 8x mit nativem Waschpuffer pH 6,0 gewaschen. Die Matrix wurde nun in eine Säule überführt. Mit einem steigenden Imidazolgradienten wurden Verunreinigungen entfernt und das His-Tag-Protein eluiert. Dabei wurde mit einem Stufengradienten von jeweils 2x 1mL 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, und 500 mM Imidazol eluiert. Aliquots der Fraktionen wurden im SDS-PAGE auf Proteingehalt und Verunreinigungen untersucht. Die Fusionsprotein-haltigen Fraktionen wurden gepoolt .

#### **2.2.4.8.5. Umpuffern und Konzentrieren der cytNCAM-Fusionsproteine und des Kontrollproteins**

Für die Kopplung an CNBr-aktivierte Sepharose muß das gereinigte Protein in einem geeigneten Kopplungspuffer vorliegen. Das Umpuffern der Fusionsprotein-haltigen Eluate erfolgte durch Dialyse ü.N. bei 4°C, wobei Dialyseschläuche der Firma Roth mit einem Größenausschluß von 4000-6000 D verwendet wurden. Anschließend wurden die Proteine

entweder mit Vakuumschläuchen der Firma Schleicher und Schuell mit einem Größenausschluß von 25 kD (cytNCAM 180) oder mit Ultrafree-Zentrifugalfilter der Firma Millipore mit einem Größenausschluß von 5 kD auf ca. 5 mL (cytNCAM 140, Kontrollprotein) eingengt.

#### **2.2.4.8.6. Ligandenaffinitätschromatographie**

Zur Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner von NCAM 140 und NCAM 180 wurde die Ligandenaffinitätschromatographie angewandt. Cytosol-, Membran- und Cytoskelettangereicherte Proteinfractionen von Rattenhirn dienten als Ausgangsmaterial für die Ligandensuche. Die Säulen wurden mit 30 mL Waschpuffer äquilibriert. Die jeweilige Hirnfraction (1-3 mg Protein / mL) wurde rezirkulierend langsam (0,3 mL/min) ü.N. über eine Ethanolamin-blockierte Vorsäule und anschließend über die cytNCAM 180-Säule bzw. über die cytNCAM 140-Säule gepumpt. Parallel dazu erfolgte die Rezirkulation über die Kontrollprotein-Säule mit vorgeschalteter Vorsäule. Alle vier Säulen wurden getrennt voneinander langsam (0,15 mL/min) ü.N. mit 120 mL Waschpuffer (75 mM KCl) gewaschen und anschließend mit steigenden KCl-Konzentrationen (250 mM; 500 mM; 1M) eluiert, (Elutionsvolumen jeweils 8 mL). Nach 26-facher Konzentrierung der Eluate (von 8 mL auf 0,3 mL) mit Ultrafree-Zentrifugalfilter der Firma Millipore mit einem Größenausschluß von 5 kD wurden die Proben mit 5x reduzierenden Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Aliquots wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

#### **2.2.4.9. Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation ähnelt der Immunaaffinitätschromatographie im Mikromaßstab. In der Immunpräzipitation wird die Fähigkeit von Protein A (isoliertes Protein aus *Staphylococcus aureus*) oder Protein G (Zelloberflächenprotein von Gruppe G-Streptococci) genutzt, an den Fc-Teil von Antikörpern zu binden. Die an Protein G-/Protein A-Sepharose adsorbierten spezifischen Antikörper können das entsprechende Antigen aus einer Lösung binden. Nach Elution/Abkochen von der Sepharose lassen sich gebundenen Proteine im SDS-PAGE und Westernblot analysieren.

In dieser Arbeit wurde bereits gequollene Protein-G-Sepharose (Fast Flow, Pharmacia) verwendet. Die Protein-G-Sepharose (PGS) wurde 4x mit PBS gewaschen, wobei beim letzten Waschschrift die Sepharose bei 4°C für 20 min unter Schwenken mit 0,1% Ovalbumin abgesättigt wurde. Anschließend wurde die Protein-G-Sepharose (100 µL) mit 50 µg spezifischen Antikörper (H28 oder MAR) vorliegend in PBS für 1 h bei 4°C schwenkend inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die Sepharose 2x mit Immunpräzipitationspuffer gewaschen.

##### Vorpräzipitation:

100 µL Protein G-Sepharose wurde mit Hirnsolubilisat (2 mg/mL Protein, 5 mL) für 30 min bei 4°C schwenkend inkubiert und anschließend bei 2000 rpm abzentrifugiert.

##### Präzipitation:

Jeweils 5 mL des Überstandes der Vorpräzipitation (2mg/mL) wurde mit 100 µL-Antikörpergekoppelte Protein-G-Sepharose drehend für 2 h bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurde die Sepharose abzentrifugiert (2000 rpm) und 5-6x mit Präzipitationspuffer (0,2% Triton X-100) gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit 80 µL nicht reduzierenden Probepuffer abgekocht. 15 µL-Aliquots wurden im SDS-PAGE und Westernblot auf Anwesenheit bestimmter Proteine (NCAM, potentieller Bindungspartner) analysiert. Für die Detektion von Proteinen mit Molekulargewichten >100000 wurde das Präzipitat unter reduzierenden Bedingungen gekocht, um eine Verwechslung mit den

ebenfalls eluierten Antikörpern zu vermeiden (laufen im nicht reduzierten Zustand bei 150 kD, im reduzierten bei 25 und 50 kD).

#### **2.2.4.10. Reinigung von GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen**

GST-Fusionsproteine lassen sich mit Hilfe der Glutathion-Sepharose 4B (Amersham Pharmacia) aus Bakterienlysat isolieren. GST hat ein Molekulargewicht von 26000 und zeigt nach Expression in *E.coli* weiterhin volle enzymatische Aktivität. Die Struktur von Glutathion, welches an Sepharose immobilisiert vorliegt, ist komplementär zur Bindungsstelle der Glutathion-S-Transferase, so daß die GST-Fusionsproteine an Glutathion gekoppelt werden. Sie lassen sich mit einem Glutathion-haltigen Puffer von der Säule eluieren. In dieser Arbeit wurden die Proteine nicht eluiert, sondern nach Kopplung direkt für die Pull-Down-Versuche eingesetzt.

Die mit Waschpuffer 1 äquilibrierte Glutathion-Sepharose wird mit dem GST-Fusionsprotein-haltigen Lysat (1 mL auf 100 µL Sepharose) für 1 h am Drehspieß bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugation (1000 rpm, 4min) wird die Sepharose 3x mit Waschpuffer gewaschen.

Dem GST-LANP-haltigen Lysat wurde vor Inkubation mit der Sepharose 2-4% Triton X-100 beigefügt, für 5 min bei 37% inkubiert und 5 s gevortext, da die Anwesenheit von Triton die Kopplung von GST-LANP an die Sepharose erhöhte. Nach Inkubation wurde die Sepharose mit Triton X-haltigen Waschpuffer (Waschpuffer 2) gewaschen.

#### **2.2.4.11. Pull-down mit GST-LANP oder GST-PLC $\gamma$**

##### unter Verwendung überexprimierter, gereinigter His-Tag-Fusionsproteine

Die mit GST-LANP, GST-PLC $\gamma$  oder GST-gekoppelte Glutathion-Sepharose wird mit PBS/0,5% Triton X-100 äquilibriert. Zu 75 µL Sepharose wird anschließend 10 µg gereinigtes His-Tag-Fusionsprotein (cytNCAM, Kontrollprotein) in 400 µL PBS/0,5% Triton X-100 gegeben und für 1h bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach Abzentrifugieren (1000 rpm, 2-5 min) wird die Sepharose 5x mit PBS/0,5% Triton X-100 gewaschen. Das GST-Fusionsprotein und gebundenes Protein wird durch Zusatz von 45 µL 2x reduzierenden Probenpuffer und 5 minütigen Kochen von der Sepharose gelöst. Die Anwesenheit der Proteine wird im SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. (Probe reicht für 2 Spuren im Gel).

##### unter Verwendung von Proteinfractionen des Rattenhirns

Die mit GST-LANP, GST-PLC $\gamma$  oder GST-gekoppelte Glutathion-Sepharose wird mit dem entsprechenden Puffer, in welchem die Proteinfraction vorliegt (Solubilisations- oder Cytoskelettpuffer) äquilibriert. Zu 75 µL Sepharose wird 1 mg der Proteinfraction (1-2 mg/mL) dazugegeben und es erfolgt eine einstündige Inkubation bei 4°C am Drehspieß. Anschließend wird die Sepharose abzentrifugiert (1000 rpm, 2-5 min), der Überstand abgenommen und das Pellet mindestens 5 x mit dem entsprechenden Puffer + 0,1% Triton X-100 gewaschen. Das GST-Fusionsprotein und gebundenes Protein wird durch Zusatz von 45 µL 2x reduzierenden Probenpuffer und 5 minütigen Kochen von der Sepharose gelöst. Jeweils 22 µL der Probe werden für die Westernblot-Analyse eingesetzt.



## 2.2.4.12. Identifizierung von Proteinen

### 2.2.4.12.1. Tryptischer Verdau von Proteinen im Polyacrylamidgel

Das Coomassie-Blau gefärbte Gel wurde in aqua bidest. ü.N. gewässert. Die zu analysierenden Proteinbanden wurden aus dem Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und in kleine Würfel (1mm<sup>2</sup>) zerteilt, die in ein 0,5 mL-Eppendorfgefäß überführt wurden. Die Gelstückchen wurden 2x nacheinander mit H<sub>2</sub>O versetzt, was anschließend wieder entfernt wurde.

Entfernung von Coomassie-Blau und SDS: Zu den Gelstücken wird Verdaupuffer zugegeben, so daß sie gerade bedeckt sind (ca. 20 µL für eine Bande aus einem Minigel) und für 15 min schüttelnd bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Verdaupuffer durch Acetonitril / H<sub>2</sub>O (1:2) ersetzt und es folgt eine weitere Inkubation für 15 min unter Schütteln. Bei diesem Schritt schrumpfen die Gelstücke und Coomassie-Blau tritt aus. Der Überstand wurde abgenommen und durch 100% Acetonitril ersetzt. Nach 15-minütiger Inkubation wurde der gleiche Vorgang mehrere Male wiederholt, bis die Gelstücke ihre blaue Farbe verloren hatten und milchig trüb erschienen. Nach dem letzten Durchgang wurde die Flüssigkeit durch Zentrifugation in der speed vac vollständig entfernt.

Reduktion und Carbamidomethylierung: Die lyophilisierten Gelstücken wurden mit Reduktionslösung versetzt und bei 56°C für 30 min inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Gelstückchen wieder durch Zugabe von Acetonitril für 15 min geschrumpft. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke mit Iodacetaminlösung für 30 min im Dunklen bei RT inkubiert. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wird Verdaupuffer dazugegeben und für 15 min schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Schrumpfung mit 100% Acetonitril. Der Überstand wurde abgenommen und übrig gebliebene Flüssigkeit durch Zentrifugation in der speed vac entfernt.

Tryptische Spaltung: Die Gelstückchen wurden zunächst nach Zugabe von Trypsinlösung für 30 min auf Eis rehydratisiert. Überstehende Flüssigkeit wurde entfernt und die Gelstückchen so mit Verdaupuffer benetzt, daß sie gerade bedeckt sind. Nach dichten Schließen der Eppendorfgefäße erfolgte der Trypsinverdau ü.N. bei 37°C unter milden Schütteln. Für die MALDI-TOF-MS-Messung wurde entweder 1 µL des Verdau-Überstandes direkt eingesetzt oder aber der Überstand wurde zunächst mit Zip-Tip entsalzt.

### 2.2.4.12.2. Entsalzen der Proben mit Zip-Tip

Geringe Flüssigkeitsmengen können mit Zip-Tips entsalzt werden. Zip-Tips sind Pipettenspitzen, die eine C18-Matrix zur Entsalzung enthalten, die hydrophobe Bestandteile aus einer Lösung bindet, während hydrophile Bestandteile in der Flüssigkeit verbleiben. Gebundene Moleküle können mit einem stark hydrophoben Lösungsmittel wie z.B. Acetonitril eluiert werden. Der Verdau-Überstand wurde mit 1/4 des Probenvolumens an 2,5% TFA (Trifluoressigsäure) angesäuert. Die Zip-Tips wurden 3x mit je 10 µL 50% Acetonitril/H<sub>2</sub>O äquilibriert und anschließend 2x mit 10 µL 0,1% TFA gespült. Nun wurde die angesäuerte Probe 10x mit den Zip-Tip-Spitzen auf- und abpipettiert, dabei binden die Peptide an die Matrix. Nach 5x Waschen der Spitzen mit je 10 µL 0,1% TFA wurden die Peptide mit gesättigter Matrixüberstandslösung ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure, „ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid“ (CCA)), 50% Acetonitril, 0,1% TFA (v/v) eluiert.

### 2.2.4.12.3. Herstellung des Matrixüberstandes

Eine Spatelspitze Matrixpulver ( $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxycimtsäure) wurde mit 250  $\mu$ L 50% Acetonitril/0,1% TFA in ein Eppendorfgefäß gegeben, gevortext und abzentrifugiert. Der gesättigte Matrixüberstand wurde für die Elution der Peptide aus der Zip-Tip-Matrix verwendet.

### 2.2.4.12.4. Peptide-Mass-Fingerprinting [Pappin, 2003], [Beavis & Chait, 1996]

Mit Hilfe der MALDI-TOF-MS können die Massen von Peptiden und Proteinen mit einer Genauigkeit von 0,001- 0,1 Promille bestimmt werden.

Ein unbekanntes Protein, das zuvor mit einer spezifischen Protease (z.B. Trypsin) verdaut wurde, läßt sich durch Bestimmung der Peptidmassen mittels MALDI-TOF-MS und anschließender Datenbankrecherche eindeutig identifizieren. Bei der MALDI wird die Peptidprobe in eine sogenannte Matrix, die aus sauren, UV-adsorbierenden organischen Molekülen besteht, eingebettet. Im Hochvakuum des Massenspektrometers wird das Protein-Matrix-Gemisch, das zuvor auf einen Metallträger aufgetragen wurde, mit gepulsten UV-Lasern bestrahlt, der die UV-adsorbierenden Matrixmoleküle und die im Kristall eingebauten Peptide in die Gasphase freisetzt. Gleichzeitig übertragen die Matrixmoleküle Protonen auf die Peptide, so daß diese als positiv geladene Peptidionen vorliegen. Die Peptidionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und gelangen anschließend in eine feldfreie Flugröhre an dessen Ende sich ein Detektor befindet. Durch die Beschleunigung im elektrischen Feld erhalten die Peptide eine konstante Geschwindigkeit  $v$ , die antiproportional ist zur Wurzel aus der Masse ( $m$ ) durch Ladungszahl ( $z$ ) der Peptide ( $v \sim 1/\sqrt{(m/z)}$ ); [ $v = \sqrt{(2z/m * eU)}$ ; wobei  $e$ : Elementarladung;  $U$ : Beschleunigungsspannung im E-Feld);  $v = s/t$ ,  $s$ : Flugstrecke im feldfreien Raum,  $t$ : Flugzeit)]. Anhand der Flugzeiten im feldfreien Raum können die Massen der Peptide bestimmt werden. Die Peptide liegen meistens als einwertige positive Ionen vor, können aber auch zweifach oder dreifach durch die Matrix mit Protonen beladen werden (mehrere Peaks im Diagramm).

Als Matrix wurde  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxycimtsäure verwendet. Nach Herstellung der gesättigten Matrixlösung wird 1  $\mu$ L der Peptidprobe mit 1  $\mu$ L des Matrixüberstandes gemischt oder aber die Peptide werden mit 10  $\mu$ L Matrixüberstand aus der Zip-Tip-Spitze eluiert. 1  $\mu$ L des Gemischs wird direkt auf den Probenträger pipettiert und im Dunklen trockenen gelassen. Die Messung am Spektrometer wurde von C. Kannicht von Octapharm durchgeführt. Das Massenspektrometer (Bruker Biflex Instrument) wurde mit den Massen des Adrenocorticotropin-Hormon-Fragmentes 18-39 (Sigma) und Angiotensin II (Sigma) (externe Standards) kalibriert. Von einem Nitrogenlaser werden UV-Strahlen mit einer Wellenlänge von 337 nm erzeugt. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit dem Programm Mascot [Perkins et al., 1999] von Matrix-Science der NCBI-Datenbank oder mit PeptIdent Peptide-Mass-Fingerprinting der Swiss-Prot-Datenbank, wobei für die Suche zwei übersehene Trypsinschnittstellen und eine Peptidmassentoleranz von  $\pm 0,3$  D zugelassen wurde.