

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät:

Firma:

Brutschränke

Memmert

Eismaschine

Scotsman

Entwicklermaschine

Agfa

Expositionskassetten

Amersham

Feinwaage

Satorius

Fotokamera

Polaroid

Gelelektrophorese-Horizontalsystem H5

Life Technologies

Geltrockner Drygel SR

Hofer Scientific Instruments

Hybridisierungsöfen

Bachofer

Inkubationsrotor

Applied Biosystems

Kühlschränke

Liebherr

Kühlzentrifuge 3K12

Sigma

LaminairR HB2448

Hereaus Instruments

Lyohille Alpha RVC, 1-4

Christ

Magnetrührer

IKA Labortechnik

Microplate Reader 3550

Biorad

Microtiter Plate Luminometer

Dynex Technologies

Mikroskope

Zeiss

Mikrowelle

Bosch

Monitor für Radioaktivitätsmessungen

Berthold

Neubauer Zählkammer

Neolab

pH-Meßgerät

Knick

PhosphorImager

Molecular Dynamics

Pipetten

Eppendorf, Gilson

Power Supply PS 500 XT	Hoefer Scientific Instruments
Proteinsequenzer ABI477	Applied Biosystems
Schüttelinkubator	Infors
Sequenzer ABI 373A	Applied Biosystems
Szintillationszähler	Packard
Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
Thermocycler 9600	Perkin Elmer
Thermomixer 5436	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Transilluminator UVT 2035	Herolab
Ultrazentrifuge L7-55	Beckmann
UV Stratalinker 1800	Stratagene
UV/VIS-Spektrophotometer Lambda2	Perkin Elmer
Varifuge 3.2 RS	Hereaus Instruments
Videodokumentationssystem	Appligene
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Waagen PM400, PM 3000	Mettler
Wasserbad (16°C)	LKB Bromma
Wasserbad	Julabo
Zentrifuge RC5C	Sorvall Instruments

3.1.2 Laborchemikalien

Chemikalien wurden in analytischem Reinheitsgrad von Merck (Darmstadt), Sigma (St.Louis,USA), Serva (Heidelberg), Boehringer (Mannheim) und Gibco BRL (Paisley, Schottland) bezogen. Radionukleotide wurden von Amersham-Buchler erworben. Chemikalien für die SDS-PAGE wurden von Biorad (Richmond, Ca., USA) verwendet. DNA Größen-Marker wurden von Boehringer und Protein-Molekulargewichtsstandards von Amersham Life Science geliefert.

3.1.3 Chemikalien in der Zellkultur

Ampicillin	Boehringer
fötale Kälberserum	Gibco
Bacto Agar	Difco Laboratories
Bacto Yeast	Difco Laboratories
Bacto Trypton	Difco Laboratories
Bacto Pepton	Difco Laboratories
Yeast Nitrogen Base	Difco Laboratories
Opti-MEM	Gibco BRL
Trypsin/EDTA	Gibco BRL
PBS-Dulbecco's	Gibco BRL
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL
L-Glutamin	Gibco BRL
Dulbecco's MEM-Medium (w/o Phenolrot)	Gibco BRL

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

3MM-Papier	Schleicher & Schuell
96-well Immunoplaten	Nunc
96-well Zellkulturplatten	Difco Laboratories
Amberlite Ionenaustauscher	Serva
Autoradiographiefilme	Kodak
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit	Applied Biosystems
CentrisepSpin Columns	Princeton Separations
Cryoröhrchen	Nunc
Einmalhandschuhe	Safe Skin
Einmalpipetten 1/5/10/50 ml	Becton Dickinson
Einweg-Inokulationsschlingen	Pharmacia LKB Biotechnology
Gel Extraction Kit	Qiagen
Hybond PVDF-Membran	Schleicher & Schuell
Luer-Injektionsspritzen (2-20 ml)	Becton Dickinson

Multiple Human Tissue Northern Blots	Clontech
NAP TM 5-Säulen	Pharmacia LKB Biotechnology
Objekträger Super Frost Plus	Menzel-Gläser
OPC-Säulen	Perkin Elmer Cetus
Pasteurpipetten	WU Mainz
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf
Pipettenspitzen	Falcon
Plasmid Maxi Präp Kit	Qiagen
Plasmid Mini Präp Kit	Qiagen
Plastikküvetten	Sarstedt
Reaktionsgefäße 0,6/1,5/2 ml	Eppendorf
sterile Kulturröhrchen (15 ml)	Becton Dickinson
sterile Plastikröhrchen (15 und 50 ml)	Becton Dickinson
Sterilfilteraufsätze	Nalgene
Sterilfilterflaschen	Nalgene
Sterilpipetten (1-25 ml)	Greiner
TSA-Kit	NEN Life Science
X-OMAT AR-Röntgenfilme	Eppendorf
Zellkulturplatten	Boehringer Mannheim
Zellschaber	Corning
ECL TM Detection Reagent	Amersham-Life Science
TNT-T7-Quick Kit	Promega

3.1.5 Enzyme

alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Perkin-Elmer
T4-DNA-Ligase	Stratagene
T4-Polynukleotid Kinase	Boehringer Mannheim

3.1.6 Zellen

Name	Genotyp	Referenz
XL-2-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZ^M15 Tn10(Tetr) Amy Camr]</i>	Bullock <i>et al.</i> (1987)
XPORT	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac (F'proAB lacI}^{\text{q}} \text{Z}\Delta\text{M15)}$	Alting-Mees <i>et al.</i> (1994)
XL0LR	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI}^{\text{q}} \text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}})]\text{Su}^-, \lambda^{\text{t}}$	Alting-Mees <i>et al.</i> (1994)
BL21	<i>E.coli B F' dcm ompT hsd(r_B⁻m_B⁻) gal</i>	Stratagene

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Name	Genotyp	Reporter/ Marker	Referenz
Y187	<i>MATa, ura2-52, his3-200, trp1-901, ade2-101, leu2-3, gal4-542, gal80-538, URA3::GAL1-lacZ</i>	<i>lacZ trp1, leu2</i>	Harper <i>et al.</i> (1993)

Tab. 2: Übersicht des verwendeten Hefestammes (*Saccharomyces cerevisiae*), Clontech

Name	Herkunft	Quelle	Referenz
BHK	Hamster, Niere	ATCC	Macpherson und Stoker (1962)
HeLa	humanes Adenocarcinom	ATCC	Puck <i>et al.</i> (1956)
CV-1	Afrikanische grüne Meerkatze, Niere	ATCC	Jensen <i>et al.</i> (1964)
P19	Maus, Teratocarcinom	ATCC	McBurney und Rogers (1982)

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Zelllinien

3.1.7 Oligonukleotide

Für die PCR oder Sequenzierungsreaktionen wurden folgende Oligonukleotide verwendet. Eingefügte Restriktionsschnittstellen sind fett hervorgehoben. Die Oligonukleotide #1-8 (siehe GCNF-Primer) sind degeneriert.

Name	Herkunft	Sequenz
M13Rev	Eurogentec	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
T3	Eurogentec	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
T7	Eurogentec	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
3168	MWG	5'-GGT ACC GCC ACC ATG AAG CTA CTG TC-3'
3169	MWG	5'-GGT ACC CGA TAC AGT CAA CTG TCT TT-3'

Tab. 4: Übersicht aller verwendeten allgemeinen Primer und ihrer Sequenz

NCoR-Primer

Name	Herkunft	Sequenz
3142	MWG	5'- GCT AGC TCA GTC ATC ACT ATC CGA CA-3'
3143	MWG	5'- GGA TCC AAG CAT GAA GCT GCC AGG TT-3'
3144	MWG	5'-GGA TCC CTA AGC ATG AAG CTG CCA GGT T-3'
3145	MWG	5'- GTC GAC TCA GTC ATC ACT ATC CGA CA-3'
3146	MWG	5'-GGA AAG ATA AAG GGC CTC-3'
3147	MWG	5'-CTC GGG TCC TTA GCT CTT-3'
3148	MWG	5'-TGA GGT GAT AAG TCC TGC-3'
3149	MWG	5'-AGT CAG AGG GAA TGG GGC-3'
3150	MWG	5'-CAT CAA ACC GTT ACA GCC-3'
3151	MWG	5'-GCA TGA GAA ACA GGA CAG-3'
3152	MWG	5'-AGC TGC TCA GCC AGG AAC-3'
3153	MWG	5'-CTC AGT TGT GAC CAG TGG-3'
3154	MWG	5'-GGA AGA CAG GCC CTC TTC-3'

3156	MWG	5'-TGA TAG GTC TGC AGT TTC-3'
3161	MWG	5'-GGA TCC ATG GTT AAA TCA AAG AAG CAG GAG-3'
3162	MWG	5'-GGA TCC CTA TGG TTA AAT CAA AGA AGC AGG AG-3'
3180	MWG	5'-CCT TAC AAC CCT TTG ACC AT-3'
3181	MWG	5'-GTC TCA TAC TGT GCT GAG AG-3'

Tab. 5: Übersicht aller verwendeten NCoR-Primer und ihrer Sequenz

GCNF-Primer

Name	Herkunft	Sequenz
1	Schering AG	5'-TG(T/C) CTC ATC TG(T/C) GG(G/T) GA(C/T) CG-3'
2	Schering AG	5'-TG(T/C) I(T/C)I ATC TG(T/C) GGI GA(C/T) CG-3'
3	Schering AG	5'-TG(C/T) GA(G/A) GGI TG(C/T) AA(G/A) GGI TT-3'
4	Schering AG	5'-GGI TG(C/T) AA(G/A) GGI TT(T/C) TT(C/T) AA-3'
5	Schering AG	5'-TGC AAG GGI TT(C/T) TT(C/T) AA(G/A) AG-3'
6	Schering AG	5'-CA(G/A) (A/C)GI AAI (A/C)GI TG(T/C) CAG TA-3'
7	Schering AG	5'-AA(C/T) (A/C)GI TG(T/C) CAG TAC TGC CG-3'
8	Schering AG	5'-CG GCA (G/A)TA (C/T)TG (A/G)CA IC(T/G) ITT -3'
2841	Schering AG	5'-TTCCTCTGCTTCCGAGAC-3'
2854	Schering AG	5'-TGCAGTCGTGACAAGAAC-3'
2855	Schering AG	5'-TAGTGCAAGCCTGTAGCG-3'
2868	Schering AG	5'-AACTGAATGGATTCATGG-3'
2869/3146	Schering AG	5'-CTGGTCTTGCAGGAATGC-3'
2872	Schering AG	5'-TCAACATGATGCACATGC-3'
2889	Schering AG	5'-TCATGGCGGAGCAACAAA-3'
2890	Schering AG	5'-AATTGGCAGAGCTTGACC-3'
2891	Schering AG	5'-TCCAGATATCGGAAGAAG-3'
2892	Schering AG	5'-GAGGACCTGGAACCATTG-3'
2893	Schering AG	5'-AACTACACAGATTTAGTG-3'
2894	Schering AG	5'-CCTGATCTCATGATGTGC-3'
2895	Schering AG	5'-TCCTGACAGAAACCGTTG-3'
2896	Schering AG	5'-TGAGGGCTGGTTGCTCTC-3'
2897	Schering AG	5'-AATCTGCCTAAAGAGCAG-3'
2898	Schering AG	5'-GCTTTCATGCAAGCATAAC-3'
2935	Schering AG	5'-GCTCCTGACAACCTCCTC-3'
2936	Schering AG	5'-TTTGTGCTCCGCCATGA-3'
2939	Schering AG	5'-GAG TCT GAA TTC GCC ACC ATG GAG CGG GAC GAA CCG CC-3'
2940	Schering AG	5'-GAG TCT AAG CTT TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTC CTT GCC CAC ACT GGT CTT-3'

2941	Schering AG	5'-GAG TCT GAA TTC GCC ACC ATG GGA GGT CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATG GAG CGG GAC GAA CCG CC-3'
2942	Schering AG	5'-GAG TCT GAA TTC GCC ACC ATG GGA GGT CAT CAC CAT CAC CAT CAC AAC GGT TTC TGT CAG GAT GAA-3'
2943	Schering AG	5'-GAG TCT AAG CTT TCA TTC CTT GCC CAC ACT GGT-3'
2944	Schering AG	5'-GAG TCT CC ATG GCC TTC AGG GAA CAG T-3'
2945	Schering AG	5'-GAG TCT CCA TGG GC ACG CCC ATG TTG ATT-3'
3054	Schering AG	5'-TAA AGA GCT CAT TCT ACC-3'
3055	Schering AG	5'-ATT TAC ACT GCT AAT TC-3'
3059	Schering AG	5'-ACA CTA TTC AGA CTA GAC-3'
3102	Schering AG	5'-GAG TCT GAG CTC TGA TCA GTG CCT CAC AGC- 3'
3103	Schering AG	5'-GAG TCT GGT ACC AGG TCA TTC CTT GCC CAC AC-3'
3104	Schering AG	5'-GAG TCT GAG CTC TAC GTG GCA GGA G-3'
3105	Schering AG	5'-GAG TCT GGT ACC CAA TTG TTC CAG CTG TGA GG-3'
3106	Schering AG	5'-GAG TCT GCA TGC C GGG GAA CTG GCT GAT GTC AC-3'
3107	Schering AG	5'-GAG TCT GGA TCC TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTC CTT GCC CAC ACT GGT CTT-3'
3108	Schering AG	5'-GAG TCT GTC GAG C GGG GAA CTG GCT GAT GTC AC-3'
3109	Schering AG	5'-GAG TCT CCA TGG GG GAA CTG GCT GAT GTC AC-3'
3110	Schering AG	5'-GAG TCT ACC GGT G ACA AAA GCC GAT GAA GAA CTA CAC AGA TT-3'
3111	Schering AG	5'-GAG TCT GCG GCC GCT GAT GTC ACT GCC AAG TA-3'
3112	Eurogentec	5'-GAG TCT GCA TGC C ATT GGG CCA GTC CAG ATA TCG-3'
3113	Eurogentec	5'-GAG TCT AAG CTT TCA TTC CTT GCC CAC ACT GGT CTT-3'
3115	Eurogentec	5'-GAG TCT TCT AGA TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TTC CTT GCC CAC ACT GGT CTT-3'
3116	Eurogentec	5'-GAG TCT TCT AGA TCA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TAG TTC TGC CTG TGT CAC AGC-3'
3117	MWG	5'-GAG TCT GAA TTC ATG AAC CGG AAG GCT ATC AG-3'
3118	MWG	5'-GAG TCT CTC GAG TCA TTC CTT GCC CAC ACT GG-3'
3119	MWG	5'-GAG TCT AAG CTT GCC ACC ATG GAG CGT GAT GAA CCT CC-3'
3125	MWG	5'-GAG TCT AAG CTT TG GAG CGT GAT GAA CTT CC-3'
3126	MWG	5'-GAG TCT GCT AGC GCC ACC ATG GAG CGT GAT GAA CCT CC-3'

3145	MWG	5'-GAG TCT GAG CTC TGA CCA GGT CCT CAC AGC-3'
3163	MWG	5'-CAT ATG ATG AAC CGG AAG GCT ATC AG-3'
3164	MWG	5'-CTGCAGTCATTCCTTGCCCACACTGG-3'
3165	MWG	5'-GAATTCATGGAGCGTGATGAACCTCC3'
3166	MWG	5'-CTG CAG GCT AGC TCA TTC CTT GCC CAC ACT GG3'
3167	MWG	5'-GAA TTC CTG CCC CAA CAA GCT CGC AG3'
3170	MWG	5'-CAT ATG GAA TTC ATC AAG GAT TAC ACG TGC CT-3'
3173	MWG	5'-GCTAGC TCA CAT CTT TCC TGC AAT ATA TC-3'
3174	MWG	5'-CTGCAG TCA CAT CTT TCC TGC AAT ATA TC-3'
3175	MWG	5'- GAA TTC TTT ACT GAT GAA GGG ATG GA- 3'
3176	MWG	5'- GCT AGC TCA TCT GTG TAG TTC TTC ATC GG-3'
3177	MWG	5'- GAA TTC CAG ATC TTT GGG GAA CTG GC-3'
3182	MWG	5'-GCT AGC TCA TTT CTT GAT CCA GGC AAT CT-3'
3183	MWG	5'- GCT AGC TCA GAA GTT AAT TGC TTT CAT GC-3'
3184	MWG	5'-GAA TTC TCA CAG CTG GAA CAA TTG AA-3'

Tab. 6: Übersicht aller verwendeten GCNF-Primer und ihrer Sequenz

3.1.8 Plasmide und Vektoren

Name	Referenz	Beschreibung	Herkunft
pGal-TK-Luc	Hollenberg & Evans (1988)	PHSV-TK(-105/+51), 3xGal(17mer)-RE, Firefly Luciferase, SV40 small t intron und polyA	U.Borgmeyer, (Universität Hamburg)
pDR0 ₂ -TK-Luc		PHSV-TK(-105/+51), 2xDR0-RE, Firefly Luciferase, SV40 small t intron und polyA	U.Borgmeyer, (Universität Hamburg)
pCI	Behr <i>et al.</i> (1989)	P _{CMV} , SV40 poly A, T7 Promotor, <i>amp</i> ^r	Promega
pSI	Behr <i>et al.</i> (1989)	P _{SV} , SV40 poly A, T7 Promotor, <i>amp</i> ^r	Promega
pCMX-Gal _{DBD}	K. Umesono (1993)	Gal _{DBD} , P _{CMV} , SV40 polyA, SV40 ori, <i>amp</i> ^r	H. Beekman (Schering AG)
pCMX-PL2-VP16	K. Umesono (1990)	VP16 _{AD} , P _{CMV} , SV40 polyA, SV40 ori, <i>amp</i> ^r	H. Beekman (Schering AG)
pREP4	Chittenden <i>et al.</i> (1989)	P _{RSV} , SV40 PolyA, <i>amp</i> ^r , <i>hyg</i> ^r	Invitrogen
pCEP4	Chittenden <i>et al.</i> (1989)	P _{CMV} , SV40 PolyA, <i>amp</i> ^r , <i>hyg</i> ^r	Invitrogen

pQE31	Qiagen	P _{T5} , <i>ColE1 ori</i> , <i>amp^r</i> , <i>6xHistidin</i>	Qiagen
pUC19	Yanisch et al. (1985)	<i>PlacZ</i> , <i>amp^r</i>	Gibco BRL
pAS2	Harper et al. (1993)	<i>GAL4₍₁₋₁₄₇₎DNA-BD</i> , <i>TRP1</i> , <i>amp^r</i> , <i>CYH^{S2}</i>	Clontech
pEGFP-C1	Chalfie et al. (1994)	P _{CMV} , EGFP, SV40 PolyA, <i>amp^r</i> , <i>Kan^r</i> , <i>Neo^r</i>	Clontech
pGAD424	Bartel et al. (1993)	<i>GAL4₍₇₆₈₋₈₈₁₎ AD</i> , <i>Padh1</i> , <i>LEU2</i> , <i>amp^r</i>	Clontech
pGEX-2T	Smith and Johnson (1988)	Glutathion-S-transferase, <i>Ptac</i> , <i>amp^r</i> , <i>lac I^q</i>	Pharmacia
pCMV4-GCNFVP16	Cooney et al. (1998)	GCNF _{fl} -VP16 _{AD} , P _{CMV} , SV40 ori, <i>amp^r</i>	A. Cooney (Baylor College of Medicine, Houston)
pABgalrTR	Baniahmad et al. (1992)	Gal4 _{DBD} -rTRC-Term., P _{RSV} , SV40 ori, <i>amp^r</i>	A. Baniahmad (Justus Liebig Universität, Giessen)
pZL44	Artelt et al. (1989)	EGFP-hER in pBEH, SV40 ori, <i>amp^r</i>	L. Toschi (Schering AG)
pCR-Script SK(+)	Bauer et al. (1992)	P _{lac} , <i>amp^r</i> , <i>ColE1 ori</i> , <i>f1 (+) ori</i>	Stratagene
pBluescript II SK (+/-)	Short et al. (1988)	P _{lac} , <i>amp^r</i> , <i>ColE1 ori</i> , <i>f1 (+) ori</i> , <i>f1 (-) ori</i> ,	Stratagene
pYEP-hGCNF5(AT)	diese Arbeit	P _{CUP1} , <i>amp^r</i> , <i>TRP1</i> , hGCNF(AT), <i>AFIII/KpnI</i>	M. Husemann (Schering AG)
pZL(46)	diese Arbeit	hER-EGFP in pBEH, SV40 ori, <i>amp^r</i>	D. Zopf (Schering AG)
pGEX-2T-NCOR		pGEX-2T: GST-mNCOR(ID-I und -II), <i>BamHI/EcoRI</i>	H.Beekman (Schering AG)
pCMX-Gal-VP16-ERα	diese Arbeit	pCMX-Gal _{DBD} : Gal4 _{DBD} -VP16-ERα, <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
Klon#1	diese Arbeit	pBluescript:hGCNF _{fl} , <i>EcoRI/XhoI</i>	diese Arbeit
Klon4.1	diese Arbeit	pCR-Script SK(+): hGCNF ₃₃₅₋₅₀₄	diese Arbeit
Klon#5	diese Arbeit	pBluescript:hGCNF _{fl} , <i>EcoRI/XhoI</i>	diese Arbeit
Klon#7	diese Arbeit	pBluescript:hGCNF ₂₅₇₋₁₅₉₇ , <i>EcoRI/XhoI</i>	diese Arbeit
Klon#10	diese Arbeit	pBluescript:hGCNF ₃₀₀₋₅₃₇ , <i>EcoRI/XhoI</i>	diese Arbeit
Klon#12	diese Arbeit	pBluescript:hGCNF ₂₅₇₋₁₅₉₇ , <i>EcoRI/XhoI</i>	diese Arbeit
p1.5	diese Arbeit	pUC19: hGCNF ₍₁₁₈₁₋₁₅₉₇₎ -His ₆ , <i>SphI/BamHI</i>	diese Arbeit
p9.2	diese Arbeit	pQE31: His ₆ -hGCNF ₅₈₄₋₁₅₉₇ , <i>SphI/HindIII</i>	diese Arbeit
p11	diese Arbeit	pCMX-Gal _{DBD} : Gal4 _{DBD} -hGCNF _{DE} , <i>EcoRI/(XhoI/SalI)</i>	diese Arbeit
p12a	diese Arbeit	pCEP: hGCNF _{fl} (AT), <i>HindIII/XhoI</i>	diese Arbeit
p12b	diese Arbeit	pREP: hGCNF _{fl} (AT), <i>HindIII/XhoI</i>	diese Arbeit

p14	diese Arbeit	pEGFP-C1: EGFP-hGCNF, <i>HindIII/(XhoI/Sall)</i>	diese Arbeit
p15a	diese Arbeit	pSI: hGCNF _{fl} (AT), <i>NheI/XhoI</i>	diese Arbeit
p15b	diese Arbeit	pCI: hGCNF _{fl} (AT), <i>NheI/XhoI</i>	diese Arbeit
p20	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hNCoR C-Term. <i>BamHI/NheI</i>	diese Arbeit
p21	diese Arbeit	pCMX-Gal _{DBD} : Gal _{DBD} -hNCoR C- Term <i>BamHI/NheI</i>	diese Arbeit
p22	diese Arbeit	pGAD424: Gal _{AD} -hNCoR C-Term. <i>BamHI/Sall</i>	diese Arbeit
p25	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hNCoR (ID-I) 236 bp <i>BamHI/NheI</i>	diese Arbeit
p26	diese Arbeit	pCMX-Gal _{DBD} : Gal _{DBD} -hNCoR (ID- I) 236 bp <i>BamHI/NheI</i>	diese Arbeit
p27	diese Arbeit	pGAD424: Gal _{AD} -hNCoR ID-I 236 bp <i>BamHI/Sall</i>	diese Arbeit
p28	diese Arbeit	pAS2: Gal _{DBD} -hGCNF _{DE} <i>NdeI/PstI</i>	diese Arbeit
p30	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF _{DE} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p31	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF _{fl} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
pGal-31	diese Arbeit	p33: Gal-VP16-hGCNF _{fl} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p32	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF _E <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
pGal-32	diese Arbeit	p33: Gal-VP16-hGCNF _E <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p33	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: Gal _{DBD} -VP16 <i>KpnI</i>	diese Arbeit
p34	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16- hGCNF _{E 1-3} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
pGal-34	diese Arbeit	p33: Gal-VP16-hGCNF _{EΔ1-3} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p36	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF _{Δ12} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
pGal-36	diese Arbeit	p33: Gal-VP16-hGCNF _{Δ12} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p37	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16- hGCNF _{EΔ12} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
pGal-37	diese Arbeit	p33: Gal-VP16-hGCNF _{EΔ12} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p38	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16- hGCNF _{EΔ1-3Δ12} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
pGal-38	diese Arbeit	p33: Gal-VP16-hGCNF _{EΔ1-3Δ12} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p39	diese Arbeit	pAS2: Gal _{DBD} -hGCNF _{Δ12} <i>NdeI/PstI</i>	diese Arbeit
p41	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF _{7- 12} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit

pGal-41	diese Arbeit	p33: Gal-VP16-hGCNF ₇₋₁₂ <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p42	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF ₁₋₆ <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
pGal-42	diese Arbeit	p33: Gal-VP16-hGCNF ₁₋₆ <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p43	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16- hGCNF _{sheet-6} <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p44	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF ₇₋₁₀ <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p45	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF ₄₋₆ <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p46	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF ₁₋₃ <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p47	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF ₇₋₈ <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit
p48	diese Arbeit	pCMX-PL2-VP16: VP16-hGCNF ₉₋₁₀ <i>EcoRI/NheI</i>	diese Arbeit

Tab. 7: Übersicht aller bezogenen und selbst erstellten Plasmide und Vektoren

3.2 Methoden

3.2.1 Molekular- und mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Präparation von Plasmid DNA aus Bakterienzellen mittels alkalischer Lyse

Plasmid Minipräparation aus E.coli mit dem Qiaprep Plasmid-Mini Kit

Zur Präparation von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde ein Präparationskit der Firma Qiagen verwendet. 3 ml einer Bakterienübernachtskultur wurden 3 Minuten mit 1900 RPM bei RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2-Puffer wurde der Ansatz durch leichtes Schwenken durchgemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert, so daß die Zellen lysierten. Zur Ausfällung der unlöslichen Bestandteile der Probe wurden 350 µl N3-Neutralisationspuffer zugesetzt, der Ansatz durch Umdrehen gemischt und dann zur Sedimentation 10 Minuten bei RT mit 14000

RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Qiaprep-Säulchen dekantiert und 1 Minute bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Die Säulenmatrix, die die Plasmid-DNA spezifisch gebunden hatte, wurde zur Abtrennung von unspezifisch gebundenen Proteinen einmal mit 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zum vollständigen Entfernen des Waschpuffers wurde die Säule 1 Minute bei RT und 14000 RPM zentrifugiert und in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Die Elution der gereinigten Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl H₂O bzw. TE-Puffer und eine 1 minütige Zentrifugation bei RT und 14000 RPM. Die Plasmid-DNA hatte eine Konzentration von 100-200 ng/µl und wurde ohne weitere Reinigung/Fällung für die Sequenzierung, für Transformationen und Transfektionen sowie für Klonierungsreaktionen eingesetzt.

Lösungen:

Die Puffer P1, P2, N3, PB und PE wurden dem QIAprep Plasmid-Mini Kit entnommen. Ihre Zusammensetzung wurde vom Hersteller nicht angegeben.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
1 mM EDTA

Plasmid Maxipräparation aus *E.coli* mit dem QIAprep Plasmid-Maxi Kit

Die Präparation von Plasmid-DNA im Mengbereich von etwa 500 µg wurde mit Maxi-Säulen (Qiagen 500) der Firma Qiagen durchgeführt.

200 ml einer über Nacht angeschüttelten *E.coli*-Kultur (U=180 RPM, in LB Medium / Antibiotika) wurde bei 4°C 6 Minuten mit 6000 RPM zentrifugiert und das Pellet in 10 ml P1 resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension zur Zellyse mit 10 ml P2-Puffer vermischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml gekühltem P3-Puffer und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz in eine Qiagen-Kartusche dekantiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Suspension wurde dann mit einem Stempel durch die Kartusche gepresst, um die unlöslichen Bestandteile der Probe zu entfernen. Das Filtrat wurde direkt über eine mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte Qiagen 500-Säule gegeben und die DNA an die Säulenmatrix gebunden. Zur Abtrennung von unspezifisch gebundenen Proteinen wurde die Säule zwei mal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 15 ml QF-Puffer. Die eluierte DNA wurde mit 0,7 Elutionsvolumen Isopropanol bei RT gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 4°C und >15000 g wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge für 5-10 Minuten getrocknet und in 200-

500 μl H_2O bzw. TE-Puffer (s.o.) aufgenommen. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung erfolgte durch die Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration wurde nach der Formel $c = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/ml}$ berechnet und die Reinheit der DNA-Lösung über die Formel $Q = \text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$. Die übliche Ausbeute betrug 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$. Die gereinigte Plasmid-DNA konnte wie bei der Plasmid Minipräparation beschrieben eingesetzt werden.

Lösungen:

Die Puffer P1, P2, P3, QB, QC und QF wurden dem QIAprep Plasmid-Maxi Kit entnommen. Ihre Zusammensetzung wurde vom Hersteller nicht angegeben.

3.2.1.2 Spalten von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für analytische Zwecke wurden 200-600 ng DNA, für präparative Zwecke 1-3 μg DNA, in einem Volumen von 30 μl mit einem kommerziell erhältlichen Restriktionsendonuklease-Puffer und einer der DNA-Menge angepaßten Enzymmenge geschnitten. Die Spaltung wurde bei der jeweils optimalen enzyspezifischen Temperatur für 1-3 Stunden durchgeführt.

Allgemein ist die notwendige Enzymmenge für eine vollständige Verdauung aus der Aktivität des Enzyms zu berechnen, wobei eine Einheit (U) als diejenige Menge Enzym definiert ist, die 1 μg λ -DNA unter optimalen Bedingungen in 60 Minuten vollständig schneidet.

<u>Spaltung:</u>	10 x Inkubationspuffer	3 μl
	Plasmid DNA	1-5 μl
	Restriktionsenzym	0,5-1 μl
	Steriles „Millipore“ H_2O	ad 30 μl

3.2.1.3 Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Um inter- oder intramolekulare Reaktionen monoenzymatisch linearisierter Vektoren zu verhindern, wurden die überhängenden 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Der entsprechende Reaktionsansatz wurde vorher 5 Minuten bei 60°C inaktiviert. Die Reaktion wurde bei 37°C für 10 Minuten durchgeführt und anschließend durch Inkubation von 15 Minuten bei 60°C gestoppt.

<u>Dephosphorylierungsansatz:</u>	inaktivierter Spaltungsansatz	30 μ l
	10 x SP-Puffer	4 μ l
	alkalische Phosphatase (1U/ μ l)	1 μ l
	steriles „Millipore“ H ₂ O	ad 40 μ l

3.2.1.4 Reinigung von Oligonukleotiden

Kommerzielle Oligonukleotide der Firmen Eurogentec und Mwg konnten ohne Reinigung für die PCR verwendet werden. Die bei der Schering AG synthetisierten Oligonukleotide wurden an ihre Synthesäule gebunden geliefert. Vor der Reinigung wurden die Oligonukleotide mit 25%-iger Ammoniaklösung entweder für 1,5 Stunden bei 70°C oder über Nacht bei 55°C von der Matrix abgelöst.

Reinigung über Gelfiltration

Das in 25%-igem Ammoniak gelöste Oligonukleotid wurde unter Vakuum eingengt und der Niederschlag in 500 μ l H₂O aufgenommen, über eine mit 10 ml H₂O/TE-Puffer equilibrierte NAP5-Säule gelfiltriert und mit 1 ml Equilibrierungspuffer eluiert. Das Eluat wurde unter Vakuum eingengt, so daß eine konzentrierte Oligonukleotid-Lösung resultierte. Die Konzentration und die Reinheit des Oligos konnte mit einer Messung im Spektrophotometer ermittelt werden. Dazu wurde die Extinktion bei 260 nm sowie bei 280 nm bestimmt. Über die Formel $c = OD_{260nm} \times 20 \mu\text{g/ml}$ konnte die Konzentration und über den Quotienten aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm konnte die Reinheitsgrad der Probe bestimmt werden, der optimal rund 1.8 betrug.

Reinigung über Affinitätschromatographie

Zur Aufarbeitung von Oligonukleotiden mit mehr als 35 Basen wurden OPC-Säulen verwendet. Die Säule wurde mit 5 ml Acetonitril und 5 ml 2 M Triethylammoniumacetat equilibriert, das in 25%-igem Ammoniak gelöste Oligo wurde in 3 Volumen H₂O verdünnt und 2x über die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen und bei -20°C gelagert. Für Oligos, die aus mehr als 40 Basen bestanden, wurden die Waschschrte wiederholt. Zur Abspaltung der Tritylgruppe wurden 5 ml 2%-ige Trifluoacetat-Lösung in drei Schritten zu 2

x 1 ml und 1 x 3 ml mit jeweils 5 Minuten Inkubationszeit durch die Säule gedrückt. Nach einem Waschschrift mit 5 ml H₂O wurde das Oligo mit 1 ml 20%-iger Acetonitrillösung eluiert. Das Eluat wurde unter Vakuum eingengt und der Niederschlag in 100-500 µl TE-Puffer oder H₂O aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades der gereinigten Oligonukleotide erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.1.5 DNA-Amplifikation durch PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten, die nachfolgend kloniert werden sollten, wurden Oligonukleotide verwendet, die zusätzlich zu ihrer (dem zu amplifizierenden DNA-Bereich komplementären) Sequenz Restriktionsschnittstellensequenzen enthielten. Das machte es möglich, bestimmte Schnittstellen in DNA-Abschnitte einzuführen und die DNA-Fragmente nach Behandlung mit den entsprechenden Restriktionsenzymen zu klonieren.

<u>PCR-Ansatz (präparativ):</u>	Plasmid-DNA (100 ng/µl)	1 µl
	forward primer	1 µl
	reverse primer	1 µl
	10 x PCR Puffer	2,5 µl
	Taq Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
	Steriles „Millipore“ H ₂ O	ad 25 µl

Die Amplifikation erfolgte über 13-15 Zyklen, die 30 s bei 94°C zum Aufschmelzen der ds-DNA, 45 s 50-60 °C zur Anlagerung der Oligonukleotide an die komplementäre DNA-Sequenz und 1 Minute bei 72°C zur Synthese des neuen Stranges durch die Taq-Polymerase umfaßten.

Die PCR diente unter Anderem auch dem Nachweis vom bestimmten DNA-Inserten nach einer Klonierung. Dazu wurden die Transformanten einer sogenannten analytischen Kolonie-PCR unterzogen. Die Primer wurden dabei so gewählt, daß das amplifizierte Fragment im Agarosegel eine eindeutige Größe hatte und, daß die PCR auch Aufschluß über die Orientierung des Inserts gab (wenn dies erforderlich war).

<u>PCR-Ansatz (analytisch):</u>	Template	Einzelkolonie
	forward primer	1 µl
	reverse primer	1 µl
	10 x PCR Puffer	2,5 µl
	Taq Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl
	Steriles „Millipore“ H ₂ O	ad 25 µl

Die Amplifikation erfolgte über 20-25 Zyklen, die 30 s zum Lysieren der Zellen und Aufschmelzen der ds-DNA, 45 s 50-60 °C zur Anlagerung der Oligonukleotide an die komplementäre DNA-Sequenz und 1 Minute bei 72°C zur Synthese des neuen Stranges durch die Taq-Polymerase umfaßten.

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der DNA wurde diese in Agarose-Gelen (1-1,5 %) in TAE-Puffer durch Elektrophorese getrennt. Die DNA-Lösung wurde vor dem Beladen des Gels mit 1/6 Volumen Ladungspuffer gemischt. Das Gel wurde auf Trägerplatten gegossen und erkaltet. Nach Auftragen der Proben wurde der entsprechende Träger in die Elektrophoresekammer gesetzt, das Gel vollständig mit Puffer überflutet, die Proben in die Geltaschen pipettiert und der Lauf bei 100-130 V durchgeführt. Der Gellauf dauerte je nach erwünschter Auflösung ca. 45-60 Minuten. Nach Abschluß der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel 5 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) gefärbt, kurz in H₂O gespült und fotografiert.

Lösungen:

Agarosegel (1-1,5%):	1-1,5 g	Agarose
	2 ml	50 x TAE
	ad 100 ml	H ₂ O
50 x TAE-Puffer:	242 g	Tris
	57.1 ml	Eisessig
	100 ml	0,5 M EDTA (pH 8)
6 x Ladungspuffer:	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol
	40 % (w/v)	Saccharose in H ₂ O

3.2.1.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten von weniger als 200 bp Länge, wurden Polyacrylamidgele verwendet. Diese wurden durch Kopolymerisation von Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung in der Gegenwart von TEMED und Ammoniumpersulfat (APS) hergestellt. Die Konzentration des Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamids lag bei 6 %. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladungspuffer vermischt und oben auf die senkrecht stehenden Gele aufgetragen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung wurden die Oligonukleotide elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Banden durch Färbung des Gels für 5 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) und Entfärbung in H₂O sichtbar gemacht und fotografiert.

Gel und Lösungen:

Acrylamidgel (6 %):	5 ml	10x TBE
	10 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1)
	ad 50 ml	H ₂ O
Polymerisation:	0,1 % (v/v)	TEMED
	0,1 % (w/v)	APS

3.2.1.8 Fragmentisolation aus dem Agarose-Gel mit dem Qiagen QIAquick-Gel-Extraction Kit®

Zur Isolation von DNA-Fragmenten wurde der Restriktionsansatz auf einem der Fragmentgröße angepaßten Agarosegel (1-1,5 %) aufgetrennt. Dazu wurde in eine präparative Tasche ca. 90 % des Ansatzes und in die direkt benachbarten Taschen die restlichen 10 % sowie der Längen-Standard pipettiert. Nach Beendigung der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde der Gelbereich, der die 10 % des Ansatzes und den Marker enthielt, abgetrennt und separat in Ethidiumbromid gefärbt. Unter UV-Licht wurde anschließend die Lage der zu präparierenden Bande im Gel markiert. Durch Anlegen des Gelstreifens an die präparative Tasche wurde ohne Anfärbung die entsprechende Bande aus dem Gel geschnitten. Der Agaroseblock wurde durch Zugabe des dreifachen Volumens an QX1-Puffer und Inkubation für 10 Minuten bei 50°C aufgelöst, mit dem einfachen Volumen an Isopropanol versetzt und der Ansatz auf eine QIAquick- Säule gegeben. Nach Zentrifugation mit 13000

rpm für 1 Minuten wurde die Säule unter gleichen Bedingungen mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend trocken zentrifugiert. Durch Zugabe von 30 µl H₂O auf die Säule und erneuter Zentrifugation wurde die DNA eluiert und 5 µl des Eluats zur Konzentrationsabschätzung auf ein Agarose Gel aufgetragen.

Lösungen:

Die Puffer QX1 und PE wurden dem QIAquick Kit entnommen. Ihre Zusammensetzung wurde vom Hersteller nicht angegeben.

3.2.1.9 Ligation isolierter DNA-Fragmente

Die durch Restriktionsspaltung entstandenen kohäsiven DNA-Enden der Vektoren und Fragmente wurden durch die Ligation mit T4-DNA-Ligase verbunden. Vor der Reaktion war eine Reinigung durch Fragmentisolation zur Beseitigung noch vorhandener Restriktaseaktivität und nicht gewünschter DNA-Fragmente erforderlich. Für die Ligation wurden Vektor und Fragment in äquimolaren Mengen oder im molaren Verhältnis 1:3 eingesetzt, wobei die Vektormenge zwischen 20 und 50 ng variierte.

<u>Ligationsansatz:</u>	DNA (Vektor, Fragment)	1-7 µl
	10 x Ligase-Puffer	1 µl
	T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	1 µl
	steriles „Millipore“-H ₂ O	ad 10 µl

Die Reaktion fand über Nacht im 16°C Wasserbad statt. Als Kontrollansätze zur Untersuchung der Dephosphorylierungs- und Ligationseffizienz wurden Ansätze ohne Fragment mitgeführt, die anschließend parallel zum Ligationsansatz in *E.coli*-Zellen transformiert wurden.

3.2.1.10 Transformation von E.coli-Zellen

Herstellung kompetenter Bakterienzellen:

Von einer Antibiotika-freien Übernachtskultur E.coli Zellen in LB-Medium wurden 100 ml Antibiotika-freies LB-Medium zu 0,1 OD_{600nm} angeimpft und bei 37°C 2-3 Stunden geschüttelt, bis die Kultur 0,5-0,7 OD_{600nm} erreicht hatte. Die Kultur wurde anschließend in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C und 1500 rpm pelletiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 1 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 1500 rpm für 10 Minuten pelletiert und in 2 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Die so vorbereitete Zellsuspension wurde zur Transformation verwendet.

Transformation kompetenter Bakterienzellen:

Von den kompetenten Zellen wurden 100 µl für die Transformation eingesetzt. In einem 15 ml Falcon-Röhrchen wurden die Zellen mit 2 µl des Ligationsansatzes oder mit 1 ng Plasmid-DNA vermischt. Nach einer 30 Minuten Inkubation auf Eis, die der Anlagerung der DNA an die Zelloberfläche diente, folgten 30-45 Sekunden Hitzeschock im 42°C warmen Wasserbad und 2 Minuten Inkubation auf Eis, wobei die Aufnahme der DNA in die Zelle stattfand. Abschließend wurde der Ansatz mit vorgewärmten LB-Medium auf 900 µl aufgefüllt und für 30 Minuten bei 37°C geschüttelt, um das Wachstum der Zellen und die Expression der plasmidkodierte Antibiotika-Resistenzgene zu induzieren. Der Ansatz wurde anschließend 3 Minuten mit 1500 RPM zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl LB-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf Antibiotika-haltigen Platten ausplattiert und bei 37°C 12 bis 16 Stunden bebrütet.

Medien und Lösungen:

LB-Medium: 1,0 % Bactotryptone
 0,5 % Bactoyeast
 0,5 % NaCl
 (100 µg/ml Ampicillin)

LB-Agar: LB-Medium
 2,0 % Bactoagar
 (100 µg/ml Ampicillin)

3.2.1.11 Automatische DNA-Sequenzierung mit dem ABI 373 A

Bei der automatischen Sequenzierung erfolgt der Einbau von fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden über PCR. Dies führt zu einem Kettenabbruch nach dem Sanger-Verfahren (Sanger *et al.*, 1977) und zu einer spezifischen Markierung des Abbruchs durch den nukleotidabhängigen Fluoreszenzfarbstoff. Der dem automatischen Sequenzer angeschlossenen Computer kann die Abfolge der Nukleotide in der Sequenz innerhalb einer Gelspur analysieren und die Daten in eine Sequenz umwandeln, was eine effiziente Analyse von DNA-Sequenzen ermöglicht.

PCR-vermittelter Einbau von ddNTPs

600-800 ng Plasmid-DNA wurde in einem Ansatz mit 0,5 μM Primer und 9,5 μl Taqdyedeoxy Reaktionsmix, der dNTPs, Reaktionspuffer, Enzym und die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide enthielt, zu 20 μl pipettiert. Die PCR wurde in Perkin Elmer Cetus (Modell 9600) durchgeführt. Das Programm setzte sich aus einem 1 Minuten Denaturierungsschritt bei 96°C und 25 Zyklen, die 1 Minute bei 96°C zum Aufschmelzen der dsDNA, 15 Sekunden bei 50°C zur Anlagerung der Oligonukleotide an die komplementäre DNA-Sequenz und 4 Minuten 60 °C zur Synthese des neuen Stranges durch die DNA-Polymerase umfaßten, zusammen.

Nach Abschluß der PCR wurden die Proben zur Entfernung nicht eingebauter fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide über Centri-Sep Säulen gereinigt. Dazu wurden die Säulen mit 800 μl H₂O über 30 Minuten bis 1 Stunde bei RT equilibriert, überschüssiges H₂O entfernt und die Säulen 2 Minuten bei 3000 RPM in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Dyedesoxy-PCR Ansatz wurde auf die präparierten Säulen pipettiert und für 2 Minuten bei 3000 RPM in ein neues Eppendorfgefäß zentrifugiert. Das Filtrat wurde unter Vakuum 30 Minuten eingengt, der verbleibende Niederschlag in 5 μl Probenpuffer aufgenommen und nach einer 5 Minuten Inkubation bei 95°C auf das Sequenzgel aufgetragen.

Gelelektrophoretische Auftrennung der Sequenzierungsreaktion:

Die Auftrennung der Sequenzierungsreaktionen erfolgte in einem 6 % Polyacrylamid/ 8 M Harnstoff-Gel. Vor dem Gießen des Gels mußte durch sorgfältige Reinigung der Gelplatten verhindert werden, daß es zu einer Eigenfluoreszenz der Platten durch Verschmutzungen kam. Nach 1 Stunde Polymerisation bei RT wurden die Platten gründlich gereinigt, der einstündige Vorlauf durchgeführt, und nach dem Spülen der Geltaschen die Proben aufgetragen. Der Sequenzierunslauf wurde bei konstanter Leistung von 40 W, Temperatur von 40°C und 1100-1300 V durchgeführt und die Daten mit einem Computer erfaßt. Der Lauf dauerte durchschnittlich 14 Stunden.

Auswertung der Sequenzdaten:

Mit Hilfe des Programms „Data Analysis“ wurden die vom ABI 373A (Applied Biosystems) gesendeten Daten analysiert. Gelerlauf und Qualität der Sequenzierung konnten durch die aufgezeichneten Elektropherogramme beurteilt werden. Nach der Bearbeitung der Rohdaten mit dem Programm „Factura“ wurden überlappende Teilsequenzen mit dem Programm „Autoassembler“ zu einer zusammenhängenden Sequenz verknüpft und anschließend mit dem Programm „Mac Vector“ weiter bearbeitet.

Puffer und Gel:

10 x TBE-Puffer:	216 g	Tris
	110 g	Borsäure
	100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	ad 2 l	H ₂ O
Probenpuffer:	5 ml	Formamid
	1 ml	50 mM EDTA (pH 8,0)
Sequenziergellösung:	50 g	Harnstoff
	15 ml	40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
	10 ml	10 x TBE-Puffer
	ad 50 ml	H ₂ O
	500 µl	10 % APS (w/v)
	45 µl	TEMED

3.2.1.12 Northern Blot

Die Northern Blots wurden von der Firma Clontech bezogen (Multiple Tissue Northern Blots) und mit [³²P]-markierten Sonden hybridisiert.

PCR-vermittelte Markierung von DNA mit α [³²P]-dCTP

Die Herstellung der Sonde erfolgte über den Einbau von α [³²P]-dCTP mittels PCR. Dazu wurde der folgende PCR-Ansatz pipettiert.

<u>PCR-Ansatz:</u>	DNA-Template	20 – 70 ng
	forward primer	1 μ M
	reverse primer	1 μ M
	dNTP-Mix	2 μ M(A, G, T) / 1,3 μ M (C)
	α [³² P]-dCTP	100 μ Ci
	Taq-Polymerase	2,5 U
	steriles „Millipore“ H ₂ O	ad 50 μ l

Die Amplifikation erfolgte für 15-20 Zyklen mit je 30 s bei 96°C zur Denaturierung der DNA, 1 min bei 55 °C zur Anlagerung der Primer und 1 min bei 72 °C zur Synthese des neuen DNA-Stranges. Nach der Amplifikation wurde die Probe über eine QIAquick-Säule gereinigt und abschließend mit 50 μ l H₂O eluiert. Der radioaktive Einbau wurde durch Messung der Cerenkov-Strahlung (cpm) von 1 μ l Eluat, das in einer 1:10 Verdünnung auf GF/C-Filterpapier gebracht wurde, bestimmt und die Gesamtcounts der Probe ermittelt. Die Sonde hatte durchschnittlich eine Spezifität von 10⁷ cpm/ μ g.

Northern-Hybridisierung:

Der Northern Blot wurde zunächst kurz in sterilem H₂O angefeuchtet und direkt in die vorgewärmte (68°C) Prähybridisierungslösung (QuickHyb®) gelegt. Es folgte eine Prähybridisierung für 20 min–2 h bei 42°C im Hybridisierungssofen. Dabei betrug das Volumen der Lösung mindestens 33 μ l/cm². Für die Hybridisierung wurde der Lösung dann die markierte Sonde, die zuvor mit 100 μ l einer 10 mg/ml konzentrierten Heringssperma-DNA vermischt und 5 min erhitzt wurde, zugesetzt. Die Aktivität der markierten Sonde betrug dabei

ca. 10^6 cpm/ml. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für mindestens 1 h oder maximal über Nacht. Nach der Hybridisierung wurde der Northern Blot 2 x in 200 ml 2 x SSC/0,1% SDS-Puffer bei RT und 2 x in 200 ml 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 60°C gewaschen. Anschließend wurde die Testaktivität des Blots abgeschätzt (Zählrohr-Messung). War diese noch auffällig hoch, wurde der letzte Waschschrift gegebenenfalls bei einer höheren Temperatur wiederholt. Der feuchte Blot wurde in Folie eingeschweißt und auf einem Film zwischen 1-2 Verstärkerfolien bei -80°C exponiert. Die Expositionszeit richtete sich nach der Stärke des Signals.

Stripping des Northern Blot:

Nach der Hybridisierung mit einer radioaktiv-markierten Sonde war es möglich, den Northern Blot wieder zu verwenden, wenn die Sonde vollständig entfernt wurde. Dazu wurde der radioaktive Blot für 10 min in sterilem $\text{H}_2\text{O}/0,5\%$ SDS abgekocht. Nachdem die Waschlösung 10 min abgekühlt war, wurde der Blot herausgenommen und konnte danach für eine weitere Hybridisierung eingesetzt oder für 1 h bei RT getrocknet und bei -20°C gelagert werden.

3.2.1.13 Durchmusterung einer humanen Testis cDNA-Bank

Um eine volle Länge cDNA von *hGCNF* zu erhalten, wurde eine humane Testis Lambda-Phagenbank durchmustert. Dazu wurde eine Übernachtskultur von XL-1 MRF' Zellen in LB/MgSO₄/Maltose mit 10 mM MgSO₄ gewaschen und 25 ml der Bakteriensuspension auf 0,5 OD_{600nm} mit 10 mM MgSO₄ eingestellt. 2,5 ml dieser XL-1 MRF' Zellen wurden mit 1.000.000 Phagen gemischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 32 ml NZY-Top Agar zugegeben, vorsichtig vermischt, die Suspension auf NZY-bottom agar Platten ausgegossen und für 5-6 h bei 37°C inkubiert, so daß sich Plaques bilden konnten. Anschließend wurde jeweils ein Nitrozellulosefilter (PAL) für 1 Minute auf die Platten gelegt (die Position markiert), damit sich die Phagen anheften konnten und danach für 5 Minuten in High-Salt-Denaturation Buffer inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation für 5 Minuten in Neutralising Buffer wurde die nun auf dem Filter freiliegende DNA im Crosslinker durch UV-

Licht an die Membran gebunden. Schließlich wurden die Filter in 1x SSC für 2 Minuten gewaschen und dann auf 3M Papier getrocknet.

Lösungen:

High-Salt Denaturation Buffer:	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralising Solution:	0,5 M Tris-HCl pH 7,4 1,5 M NaCl
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Na-Citrat
NZY:	210g NZY-Broth Ad 10 l H ₂ O
Bottom-agar:	12 g Agar Ad 800 ml NZY
Top-agar:	7 g Agarose Ad 1 l NZY

Markierung von DNA mit [α -³²P] dCTP:

Die Herstellung der Sonde erfolgte über den Einbau von α [³²P]-dCTP mittels PCR. Dazu wurde der folgende PCR-Ansatz pipettiert.

<u>PCR-Ansatz:</u>	DNA-Template	20 – 70 ng
	Primer	1 μ M
	10 x PCR-Puffer	10 μ l
	dNTP-Mix	2 μ M (A, G, T)
	α [³² P]-dCTP	150 μ Ci
	Taq-Polymerase	2,5 U
	steriles „Millipore“ H ₂ O	ad 100 μ l

Die Amplifikation erfolgte für 8 Zyklen mit je 1 min 30 s bei 94°C zur Denaturierung der DNA, 1 min 30 s bei 43 °C zur Anlagerung des Primers und 6 min bei 72 °C zur Synthese des neuen DNA-Stranges. Nach der Amplifikation wurde die Probe über eine QIAquick-Säule gereinigt und abschließend mit 500 μ l TE-Puffer eluiert. Der radioaktive Einbau wurde durch

Messung der Cerenkov-Strahlung (cpm) von 1 µl Eluat, das in einer 1:10 Verdünnung auf GF/C-Filterpapier gebracht wurde, bestimmt und die Gesamtcounts der Probe ermittelt. Die Sonde hatte durchschnittlich eine Spezifität von 10^7 cpm/µg.

Hybridisierung:

Jeweils zwei Filter wurden kurz in 2x SSC eingeweicht, in ein Hybridisierungsröhrchen geschoben, mit 20 ml Prähybridisierungslösung versetzt und 3 h bei 52°C inkubiert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und die Filter mit 20 ml Hybridisierungspuffer, dem vorher 65 µl der radioaktiv markierten Sonde zugesetzt worden war, über Nacht bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filter zunächst zwei mal mit 6 x SSC 1% SDS, dann der Reihe nach in Schalen mit 54°C warmen 6 x SSC 1% SDS, 2 x SSC 1% SDS und schließlich mit kaltem 2 x SSC gewaschen. Schließlich wurden die Filter auf einem Kodak X-OMAT AR Film exponiert. Die Plaques bei denen sich ein radioaktives Signal zeigte, wurden ausgestochen und die Phagen mit SM-Puffer durch Schwenken über Nacht eluiert. Mittels PCR wurde die Insertlänge der Phagen bestimmt. Positive Phagenklone wurden einem Sekundärscreening unterzogen und erneut ausplattiert. Dazu wurden ca. 1,5 µl (1:1000 Verdünnung) des Eluats mit 200 µl XL1-MRF' Zellen inkubiert und ausplattiert (siehe oben). Mit den Phagen, die sowohl beim Primärscreening als auch beim Sekundärscreening und der anschließenden Kontroll-PCR positiv waren, wurde weiter gearbeitet.

Lösungen:

Prähybridisierungspuffer

Hybridisierungspuffer: 6 x SSC
 1 x Denhardt
 1% SDS
 100 µg/ml salmon-DNA

SM-Puffer: 5,8 g NaCl
 2 g MgSO₄ x 7 H₂O
 50 ml 1 M Tris/Cl (pH 7,5)
 5 ml (2 % Gelatine-Lösung)
 ad 1 l H₂O

2 x SSC, TE

benötigte Puffer: 6 x SSC 1% SDS, 2 x SSC 1% SDS, 2 x SSC

Exzision

Nach der Durchmusterung der humanen Testis cDNA-Bank wurden die Phagenklone durch *in vivo* Excision in Plasmidvektoren (pBlueskript®) konvertiert (Stratagene Rapid Excision Kit). Während der Koreplikation von λ -Phage und 704 Helfer-Phage in XPORT-Zellen wird durch das Helfer-Phagen kodierte pII-Protein ein Phagemid aus der λ -DNA excisiert, das dann als filamentöses Phagenpartikel verpackt wird und seinerseits XLOLR-Zellen infiziert. Aus diesen infizierten Zellen kann dann durch Plasmid-Präparation das Insert tragende pBluescript-Plasmid präpariert werden.

Dazu wurden die ausgestochenen Phagenklone mit 500 μ l SM-Puffer und 20 μ l Chloroform durch Agitation eluiert. 1 μ l der Phagenlösung wurde dann mit 50 μ l frischer XPORT-Zellen, 10 μ l 704 Helfer-Phagen und 5 μ l XLOLR-Zellen in 5 ml NZY vermischt und auf NZY-Agar Platten plattiert. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden mit einzeln sichtbaren Plaques 3 ml Übernachtskulturen inokuliert und tags darauf die DNA präpariert. Diese wurde nachfolgend durch Restriktionsanalyse untersucht.

3.2.1.14 Kultivierung von Hefe-Zellen

Die Methoden zum Umgang mit Hefekulturen wurden in abgeänderter Form Rose *et al.* (1990) entnommen. Die Kultivierung von Hefe-Zellen erfolgte auf Agarplatten im 30°C Inkubator bzw. im Flüssigmedium im Schüttler bei 160 RPM und 30°C. Nicht transformierte Zellen wurden in Vollmedium (YPD) kultiviert, das die zum Wachstum nötigen Nährstoffe komplett enthielt. Transformierte Hefen wurden unter Selektionsdruck, d.h. in Minimalmedium (SC), kultiviert. Hefeplosmide tragen zur Selektion sogenannte Auxotrophiemarker (siehe Tab. 8), die es den mutagenisierten Hefezellen ermöglichen auf bzw. in Medien zu wachsen, denen eine essentielle Aminosäure (His, Leu, Trp) bzw. Base (Ura) fehlt (positive Selektion).

Gen	Enzym	Selektion
His3	Imidazolglycerinphosphatdehydratase	Histidin
Leu2	β -Isopropylmalatdehydrogenase	Leucin
TRP1	N-(5'-Phosphoribosyl)-anthranilatisomerase	Tryptophan
URA3	Orotidine-5'-phosphatdecarboxylase	Uracil

Tab. 8: Übersicht der Selektionsmarker bei Hefen

Medien:

YPD-Medium: 1,0 % Bactoyeast
 2,0 % Bactopeptone
 2,0 % Glukose autoklaviert

YPD-Agar: YPD-Medium
 2,0 % Bactoagar
 autoklavieren

SC-Medium: 2,0 % Bactoyeast nitrogene base
 2,0 % Glukose autoklavieren
 1 x BAS
 (30 mg/l Uracil-HCl)
 (80 mg/l Tryptophan)
 (60 mg/l Histidin-HCl)
 (80 mg/l Leucin)

10 x BAS: 0,06 % Adeninsulfat
 0,02 % Arginin-HCl
 0,02 % Methionin
 0,03 % Tyrosin
 0,03 % Isoleucin
 0,03 % Lysin-HCl
 0,05 % Phenylalanin
 0,10 % Glutaminsäure
 0,10 % Asparaginsäure
 0,15 % Valin
 0,20 % Threonin
 0,40 % Serin

3.2.1.15 Transformation von Hefe-Zellen

Gewinnung kompetenter Hefe-Zellen:

Eine Einzelkolonie Hefe-Zellen wurde über Nacht in 20 ml Medium (Vollmedium bei noch nicht transfizierten Zellen, Minimalmedium bei bereits transformierten Zellen) bei 30°C und 220 RPM angezogen. Am nächsten Morgen wurde die Zelldichte durch photometrische Messung bei 600 nm bestimmt und die Zellen zu 0,2 OD in 300 ml Medium verdünnt. Nach einer 3 Stunden Inkubation bei 30°C und 220 RPM wurden die Zellen bei RT und 2200 RPM geerntet. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Zellpellet in 25-50 ml sterilem H₂O gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt unter den oben genannten Bedingungen und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 1,5 ml steriler TE/LiAc-Lösung resuspendiert. Die so präparierten kompetenten Zellen wurden anschließend mit aufgereinigter Plasmid-DNA transformiert.

Transformation kompetenter Hefe-Zellen:

Für die Transformation von Hefe-Zellen (modifiziert nach Gietz *et al.* 1992) wurde ca. 0,1 µg Plasmid-DNA (Miniprep-DNA bzw. Maxiprep-DNA) und 50 µg hitzedenaturierte Heringssperma-DNA in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Anschließend wurde die DNA-Mischung mit 100 µl kompetenten Zellen gemischt. Nach der Zugabe von 600 µl steriler PEG/LiAc-Lösung und kräftigem Mischen wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 30°C und 220 RPM inkubiert. Nach Zusatz von 70 µl DMSO (100 %) und einem Hitzeschock für 15 Minuten bei 42°C wurden die Zellen auf Selektionplatten, die zusätzlich noch 1 M Sorbitol (zur Verringerung des osmotischen Streßes durch die Transformation) enthielten, zu 10 % und 90 % ausplattiert und die Platten für 3-4 Tage bei 30°C inkubiert.

Lösungen:

TE/LiAc-Puffer:	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
	100 mM	Lithiumacetat
	(pH 7,5 mit Essigsäure einstellen)	

PEG/LiAC-Lösung:	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	EDTA
	100 mM	Lithiumacetat
	(pH 7,5 mit Essigsäure einstellen)	
	40 %	PEG 4000

3.2.1.16 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Kultivierung der *Baby Hamster Kidney*-Zellen (BHK-Zellen) und der P19 Zellen erfolgte in einer kontrollierten Umgebung mit einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in Brutschränken. Die zur Zellkultur verwendeten Plastikgefäße besaßen eine chemisch vorbehandelte Oberfläche, die den Zellen das Anhaften und die Bildung von Monoschichten erleichterte. Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die Zellen vereinzelt. Dazu wurde die Zellschicht mit PBS gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % (w/v) 3-5 Minuten inkubiert. Durch das so erreichte Anverdauen von Zelloberflächenproteinen lösten sich die Zellen von der Plastikoberfläche ab. Die zur Inaktivierung des Trypsins mit FKS-haltigem Medium resuspendierten Zellen wurden 1:100 verdünnt auf einer neuen Kulturschale subkultiviert.

3.2.1.17 Transfektion eukaryontischer Zellen

Als Transfektion wird das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen bezeichnet. Bei der Transfektion werden negativ geladene Nukleinsäuren mit Hilfe positiv bzw. nicht geladener Liposomen in die Zelle transferiert (Felgner & Holm, 1989; Felgner *et al.*, 1987). Die Transfektion mittels Liposomen ist für eine Reihe von Zelltypen geeignet und erlaubt das Einschleusen von DNA-Molekülen bis zu einer Größe von 130 kb.

Die transiente Transfektion der BHK-Zellen erfolgte in 96-Loch- bzw. sechs-Loch-Platten bei einer Konfluenz von 70-80 % mit Fugene®. In Polystyrol-Röhrchen wurde jeweils die DNA-Lösung vorgelegt bzw. die dreifache Menge der DNA (in µg) an Fugene (in µl) in serumfreies-Opti-MEM-Medium zur Micellen-Bildung für 5 Minuten vorinkubiert. Beide Ansätze wurden anschließend vereinigt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde das DNA/Fugene

Gemisch direkt in das Medium der Zellen pipettiert. Die Transfektion erfolgte unter den oben genannten Kultivierungsbedingungen für 14-16 Stunden.

3.2.2 Biochemische und immunologische Methoden

3.2.2.1 β -Galaktosidase-Flüssigassay

Der Flüssigassay wurde in 96-Loch Mikrotiterplatten durchgeführt. Von jeder Kolonie wurden Dreifachwerte gemessen. Eine Einzelkolonie frisch transformierter Hefe-Zellen wurde über Nacht in 200 μ l Minimalmedium bei 30°C und 300 RPM angeschüttelt. Am nächsten Tag wurden 3 x 25 μ l dieser Übernachtskultur in je 200 μ l frisches Minimalmedium überführt und bei 30°C und 300 RPM über Nacht geschüttelt. Die Kulturen hatten am nächsten Morgen die exponentielle Wachstumsphase erreicht und konnten für den Assay direkt verwendet werden. Dazu wurden 100 μ l Zellsuspension in eine frische 96-Lochplatte überführt und die OD_{595 nm} im ELISA-Reader (BIORAD) gemessen. Anschließend wurden 25 μ l oNPG-Assaymix zu den Zellen pipettiert und die Platte zur Durchmischung vorsichtig geschwenkt und für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l 1 M NaCO₃ abgestoppt. Die Platte wurde danach zur Pelletierung von unlöslichen Zellbestandteilen 10 Minuten bei RT und 2000 RPM zentrifugiert. Im ELISA-Reader wurden 100 μ l Überstand, die zuvor in eine frische 96-Lochplatte überführt wurden, bei 415 nm gemessen. Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde über die folgende Formel berechnet: β -Gal (U) = (OD_{415 nm} x 1000)/(t x V x OD_{595 nm}), wobei t für die Inkubationszeit in Stunden und V für das eingesetzte Kulturvolumen in ml steht.

Puffer:

oNPG-Assaymix:	1,2 ml 5 % Triton X-100 in Z-Puffer
	7,5 ml 0,1 M Na-Phosphat-Puffer (ph 7,0)
	75 mg oNPG
	225 μ l β -Mercaptoethanol
	750 μ l 1 M Tris-Cl (pH 7,5)

3.2.2.2 Aufschluß von Bakterien-Zellen

Zur Herstellung von Lysaten aus Bakterienzellen, die nachfolgend in der SDS-PAGE bzw. im Western-Blot analysiert werden sollten, wurden eine definierte OD von Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet zu 0,2-0,5 OD in Probenpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

Puffer:

Lysepuffer:	100 mM	Tris-HCl (pH6,8)
(Probenpuffer)	2 %	SDS
	10 %	Glycerin
	5 %	β-Mercaptoethanol
	0,1 %	Bromphenolblau
	ad 10 ml	H ₂ O

3.2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteinmengen wurden nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wurde ein Proteinstandard (Lysozym) bekannter Konzentration in verschiedenen Verdünnungen zur Aufnahme einer Eichkurve eingesetzt. Kommerziell erworbenes Bradford-Reagenz (BIORAD) wurde in einer 1:5-Verdünnung mit H₂O eingesetzt. Maximal 10 µl der Probe oder des Standards wurden mit 1 ml des verdünnten Reagenz vermischt und bei RT für 5 Minuten bis 1 Stunde inkubiert. Danach wurde die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert (Reagenz allein oder mit Verdünnungspuffer des Standards) gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Proben wurde anhand der Eichkurve berechnet.

3.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Polyacrylamidgele wurden durch Kopolymerisation von Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid-Lösung in der Gegenwart von TEMED und Ammoniumpersulfat (APS) hergestellt. Dabei war der Gehalt von von Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid vom berechneten Molekulargewicht der zu trennenden Proteine abhängig und variierte zwischen 10-

15 %. Die in Probenpuffer aufgenommenen Proben wurden nach Abschluß der Polymerisation auf den oberen Teil des Gels (Sammelgel), das dem Aufkonzentrieren der Proteine im Gel diente (Lämmli, 1970), aufgetragen. Als Referenz zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proteine wurde außerdem ein sogenannter Marker aufgetragen, der aus einer Mischung von Proteinen definierter Größe bestand. Nach dem Auftragen der Proben wurde der Lauf bei konstantem Strom (40 mA für Minigele) gestartet. Die Dauer eines Laufes betrug in Abhängigkeit von dem Gehalt an Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid 1-2 Stunden. Zum Nachweis der Proteinbanden wurde das Gel anschließend 30-60 Minuten in einer Coomassie Blue-Färbelösung inkubiert und anschließend entfärbt.

Puffer und Gele:

10 x PAGE-Puffer:	31 g	Tris
	144 g	Glycin
	10 g	SDS
	ad 1 l	H ₂ O
Sammelgel (5 %):	5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)
	7,5 ml	0,5 M Tris (pH 6,8)
	300 µl	10 % SDS
	ad 30 ml	H ₂ O
Trenngel (10 %):	10 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)
	7,5 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
	300 µl	10 % SDS
	ad 30 ml	H ₂ O
Trenngel (12,5 %):	10 ml	Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)
	7,5 ml	1,5 M Tris (pH 8,8)
	300 µl	10 % SDS
	ad 30 ml	H ₂ O
Polymerisation:	0,1 % (v/v)	TEMED
	0,1 % (w/v)	APS
Färbelösung:	275 ml	Methanol
	50 ml	Eisessig
	0,5 g	Coomassie Blue G 250
Entfärber-Lösung:	30 %	Methanol
	7 %	Eisessig

1 x PBS:	8 g NaCl 0,2 g KCl 0,24 g KH ₂ PO ₄ 1,44 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l H ₂ O (pH 7,4 mit HCl einstellen)
1 x PBST:	PBS 0,1 % Tween 20
Transferpuffer 30 %:	PAGE-Puffer 20 % Methanol

3.2.2.6 Herstellung und Reinigung von polyklonalen Antikörperseren

Herstellung und Reinigung des Protein-Antigens

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen hGCNF wurden zwei unterschiedlich lange C-terminale Fragmente (138 und 338 Aminosäuren) von hGCNF als Fusionsproteine mit sechs C- bzw. N-terminalen Histidinen in E.coli exprimiert. Eine 200 ml BL20-Übernachtskultur (mit hGCNF-Expressionsplasmid transfiziert) wurde durch Zentrifugation für 20 Minuten mit 2000 rpm geerntet und das Bakterienpellet in 5 ml Puffer A pro mg Bakterienpellet resuspendiert und 1 h gerührt. Das Lysat wurde für 15 Minuten bei 4°C mit 8000 RPM zentrifugiert und der Überstand mit 8 ml einer 50% Suspension Ni-NTA versetzt, die vorher in Puffer A äquilibriert wurde. Nach Inkubation von 45 Minuten bei RT wurde mit der Suspension eine Säule gepackt. Diese wurde dann mit 10 Säulenvolumen Puffer A und mindestens 5 Volumen Puffer B gewaschen, bis die OD_{600nm} des Durchflusses <0.01 war. Danach wurde ebenso mit Puffer C gewaschen. Schließlich wurde das rekombinante Protein mit 20 ml Puffer E eluiert und in 3 ml Fraktionen gesammelt, die durch SDS-PAGE analysiert wurde.

Lösungen:

Puffer A:	6 M	Guanidiniumhydrochlorid
	0,1 M	Natriumphosphat
	0,01 M	Tris/HCl pH 8,0

Puffer B:	8 M	Harnstoff
	0,1 M	Natriumphosphat
	0,01 M	Tris/HCl pH 8,0
Puffer C:	8 M	Harnstoff
	0,1 M	Natriumphosphat
	0,01 M	Tris/HCl pH 6,3
Puffer E:	8 M	Harnstoff
	0,1 M	Natriumphosphat
	0,01 M	Tris/HCl pH 4,5

Generierung des polyklonalen Serums:

Von der Firma Eurogentec (Liegé, Belgien) wurden zwei Kaninchen mit dem gereinigtem hGCNF-Antigen P9.2 und zwei Kaninchen mit dem Antigen P1.5 immunisiert. Dazu wurden zunächst die Präimmunsereen gewonnen. Zur Immunisierung wurden die gereinigten hGCNF-Fragmente in einem SDS-PAGE aufgetrennt, ausgeschnitten, mit Freundschem Adjuvants suspendiert und schließlich *subcutan* injiziert. Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen von zwei Wochen insgesamt 6 mal erneut immunisiert und 10 Tage nach jeder Immunisierung geblutet. Die Titer der Seren wurden im ELISA getestet.

Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper

Die Antiseren wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurden die aufgereinigten His₆-hGCNF Fragmente an NiNTA-Sepharose gekoppelt und mit Puffer C gewaschen. Die Antikörper wurden über Nacht durch permanentes im Kreis Pumpen an die Säulen gebunden und am nächsten Tag durch drei Waschschrte mit Puffer C gewaschen. Anschließend wurden die Antikörper mit 4 M MgCl₂ eluiert und sofort gegen PBS über Nacht dialysiert.

3.2.2.7 „GST-pull down“

Der „GST-pull down“ diente dem Nachweis von *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen.

Bakterienextrakt-Präparation:

Zur Herstellung von GST-NcoR und GST-Protein wurden *E.coli*-Zellen (BL21) mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Eine Übernachtskultur mit ampicillinhaltigem LB Medium wurde dann am nächsten Tag 1:10 verdünnt und bei 37°C bis zu 0.7-1.0 OD_{600nm} geschüttelt. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 M) wurde die Proteinexpression von GST-NCoR induziert und für 5 Stunden weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation mit 4000 RPM bei 4°C für 10 Minuten pelletiert und in 10 ml Lysispuffer resuspendiert. Durch Inkubation bei 37°C für 5 Minuten und anschließendes dreimaliges Einfrieren/Auftauen in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen lysiert. Nach Zentrifugation mit 40000 rpm für 30 Minuten wurde der Überstand auf 10 % Glycerin eingestellt und in 1.0 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

In vitro Transkription/Translation mit ³⁵S-Methionin

Die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation wurde mit dem TNT-T7-Quick Kit (Promega) durchgeführt.

Ansatz:

20 µl	TNT-T7-Quick Master Mix
1 µg	Plasmid-DNA
1 µl	³⁵ S-Methionin (1000 Ci/mmol) 10 mCi/ml
ad 25 µl	nukleasefreies H ₂ O

Die *in vitro* Transkription/Translation erfolgte bei 30°C für 90 Minuten.

GST-Kopplung und „pull down“:

Zur Bindung von GST bzw. GST-NCoR an Glutathione-Sepharose 4B wurde diese zunächst mit NETN-Puffer 3x gewaschen, dann je 2 µl GST- bzw. 200 µl GST-NCoR Extrakt mit 25 µl der gewaschenen Sepharose versetzt und auf 500 µl mit NETN-Puffer aufgefüllt. Die Bindung

erfolgte bei 4°C für 1 h unter ständigem Schwenken. Anschließend wurde die Sepharose erneut 3x gewaschen und in 300 µl Endvolumen mit NETN-Puffer und mit 10 µl *in vitro* translatiertem Protein unter obigen Bedingungen für 2 h inkubiert. Danach wurde wieder 3x mit NETN-Puffer gewaschen und die Sepharose in 20 µl SDS-PAGE Probenpuffer resuspendiert, 5 Minuten bei 95°C inkubiert und auf ein SDS-Polyacrylamid Gel aufgetragen. Zur Kontrolle der erfolgten *in vitro* Transkription/Translation wurde 1 µl des radioaktiv markierten Proteins aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 20 Minuten mit Coomassie gefärbt, 30 Minuten entfärbt und schließlich zur Signalverstärkung 30 Minuten in Amplify® inkubiert. Das Gel wurde dann 1,5 h mit dem Gelrockner getrocknet und über Nacht auf einem Kodak BIOMAX MR Film exponiert.

Lösungen:

NETN:	20 mM	Tris/HCl pH8.0
	1 mM	EDTA
	100 mM	NaCl
	0.5%	Nonidet P40
Lysispuffer:	20 mM	HEPES pH 7.9
	60 mM	KCl
	2 mM	DTT
	1 mM	EDTA

3.2.2.8 Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Kontrolle, ob erfolgreich Antikörper gegen hGCNF generiert wurden, wurden die Seren der immunisierten Kaninchen in einem ELISA untersucht. hGCNF-His Protein wurde in 50 mM NaHCO₃ pH 9.2 über Nacht bei 4°C an Maxi Sorb 96-Loch Platten gebunden. Die Platten wurden danach 3 mal mit PBS/0,1% Tween gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei 37°C mit 100 µl Blockierungslösung pro Loch inkubiert. Anschließend wurde noch einmal gewaschen und dann pro Loch 50 µl der verdünnten Seren zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Es folgten 3 weitere Waschschrte und Zugabe von 50 µl Ziege anti-Kaninchen Peroxidase-konjugierter Antikörper (1:800 verdünnt). Nach Inkubation für 1 h bei 37°C wurde 4 x gewaschen und weitere 2 x nur mit PBS. Durch Zugabe von 50 µl Färbelösung pro Loch wurde die Farbentwicklung gestartet, die schließlich mit 25 µl

4,5 M Schwefelsäure gestoppt wurde. Durch Messung der Extinktion bei 595 nm wurde die Farbentwicklung quantifiziert.

Lösungen:

Blockierungslösung:	PBS/2% Milchpulver
Waschpuffer:	PBS/0,1% Tween 20
Bindungspuffer:	50 mM NaHCO ₃ pH 9,2
Färbelösung:	50 mM Zitronensäure pH 4,5 50 mM Trisodiumzitat 1 Tablette Phenylendiamin (SIGMA) 0,1% (v/v) H ₂ O ₂

3.2.2.9 Immunhistochemie

Auf Gewebeschnitten

Zur Lokalisation von GCNF innerhalb bestimmter Gewebe wurden 2-4 µm dicke Paraffinschnitte mit Hilfe von aufgereinigten polyklonalen anti-GCNF Antikörpern und unter Verwendung des TSA-Kits (NEN Life Science) gefärbt. Dazu wurden die Gewebeschnitte zunächst durch Erwärmung auf 50°C für 10 Minuten und anschließender Inkubation in Xylol für 10 Minuten entparaffiniert. Dann wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe mit 96%, 90%, 80%, 70%, 50% Ethanol und H₂O gespült. Endogene Peroxidasen wurden durch 20 minütige Behandlung mit 0,5 % H₂O₂ in PBS blockiert. Nachfolgend wurde mit H₂O gespült und die Schnitte in PBS eingestellt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde mit verdünntem Ziegenerum für 20 Minuten inkubiert und erneut mit PBS gespült. Dann erfolgte die Inkubation mit den gereinigten anti-GCNF Antikörpern (ca. 1 µg/ml in PBS) bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht. Die Färbung der Schnitte erfolgte nach Herstellerangaben. Die Schnitte wurden unter fließendem H₂O gespült und optional für 30 s mit Hämalaun-Lösung nach Mayer gegengefärbt, um die Zellmorphologie besser sichtbar zu machen. Schließlich wurden die Schnitte erneut in H₂O gespült und durch eine aufsteigende Alkoholreihe mit 50%, 70%, 80%, 90%, 96% Ethanol entwässert und in Xylol eingestellt. Mit

Entellan wurden die Schnitte letztlich eingedeckt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch an Zeiss Mikroskopen.

Auf fixierten Zellen:

Um die intrazelluläre Lokalisation von GCNF zu untersuchen, wurden mit wildtyp GCNF transfizierte Zellen immunhistochemisch gefärbt.

BHK Zellen wurden auf Deckgläschen gezüchtet und transfiziert. 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Paraformaldehyd für 5 Minuten bei RT fixiert und mit PBS gewaschen. Durch Inkubation mit 3 % BSA in PBS über Nacht bei RT wurden dann unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurden die Zellen mit anti-GCNF Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert, mit PBS gewaschen und für 1 h mit dem sekundären Antikörper Cy3 (anti-Kaninchen, fluoreszenzmarkiert) bei RT inkubiert. Nach erneuter Waschung wurden die Deckgläschen mit Glycerin auf einem Objektträger eingedeckt. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop.

3.2.2.10 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung der EGFP- bzw. Cy3-Fluoreszenzverteilung in transfizierten Zellen wurde ein Zeiss Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die Anregungswellenlängen für EGFP lagen bei 450-490 nm. Als Emissionsfilter diente ein Langpaßfilter (Langpaß: $\lambda \geq 520$ nm). Das Cy3 Fluorophor wurde durch Licht der Wellenlängen von 540-550 nm angeregt und das emittierte Licht durch einen Langpaßfilter (Langpaß: $\lambda \geq 580$ nm) gefiltert. Die Zellen wurden unter Verwendung von Kodak Diapositiv-Filmen fotografiert.