

3. Methoden

3.1 Bakterienkultivierung

3.1.1 Herstellung chemokompetenter Zellen

3 ml LB-Medium wurden mit DH5a Bakterien angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,3 bei 37°C im Schüttelapparat inkubiert. Die Kultur mit Kompetenz-Medium auf 100 ml verdünnt und erneut bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,3 inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min. in Eiswasser abgekühlt und in vorgekühlte 50 ml Falconröhrchen überführt. Nach der ersten Zentrifugation (2500 g / 8' / 4°C) wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag in 15 ml Tfb I Lösung pro 50 ml Kultur-Medium aufgenommen. Die Bakterien-Suspension wurde 30 min. in Eiswasser inkubiert und erneut zentrifugiert (2500 g / 8' / 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 2 ml Tfb II Lösung suspendiert und in Aliquots á 200µl in N₂ (in flüssigem Stickstoff) schockgefroren. Gelagert wurden die kompetenten Bakterien bei -80°C.

LB-Medium: 10 g Trypton; 5 g NaCl; 5 g Hefe Extrakt ad 1 l H₂O.

Tfb I 30 mM K-Acetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 15% Glyzerin

Tfb II 10 mM Na-MOPS (pH 7.0), 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% Glyzerin

3.1.2 Vermehrung in Flüssigkulturen

5 ml steriles Antibiotikum-beinhaltenes LB-Medium wurden aus einer Glyzerinkultur oder von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 U/min geschüttelt.

Antibiotikakonzentrationen: Ampicillin: 100 µg/ml; Kanamycin: 25 µg/ml; Tetracyclin: 5 µg/ml; Chloramphenicol: 80 µg/ml; Stammkonzentration: 100 mg/ml, gelöst in 50% EtOH, Lagerung bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.3 Glyzerinkulturen

500 µl einer Übernachtskultur wurden mit 500 µl sterilem Glycerin (87 %) vermischt. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.1.4 Anzucht auf Agarplatten

Bakterien aus einer Glycerin- oder Flüssigkultur wurden mit einer sterilen Impföse oder mit einem Drygalski-Spatel auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass Einzelkolonien isoliert werden konnten.

LB-Platten: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; 15 g Agar ad 1 l H₂O autoklaviert. Bei Bedarf wurde nach Abkühlung auf 55 °C Antibiotikum zugegeben und die noch warme Lösung in Petrischalen gegossen. Durch die Verwendung von pBluescript- und pGEM-Plasmiden kann nach Zugabe von IPTG (10 µg/ml) und X-Gal (40 µg/ml) eine Blau-Weiß-Selektion auf β-Galaktosidase-Aktivität erfolgen. Die Agar-Platten wurden nach dem Erstarren bei 4 °C gelagert.

3.2 Generierung, Modifikation, Aufreinigung und Analyse von DNA

3.2.1 Generierung von DNA

4.5.8.1 *Generierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)*

Die Generierung der benötigten DNA-Fragmente wurde auf Grund der verhältnismäßig geringen Größenunterschiede und der geringen Abweichungen im GC-Gehalt mit dem im Folgenden verwendeten Standardprotokoll durchgeführt:

	[μ l] pro Probe	
DNA	1	⇒ Reaktion
MgCl ₂	3	
Primer 5'	1	
Primer 3'	1	
DMSO	10	
Polymerasepuffer	5	
dNTPs	1,25	
H ₂ O	27,25	
Kombi-Polymerase	0,5	
Σ	50	

5'/95°C	} x 25 Zyklen
1'/55°C	
1'30"/72°C	
2'/95°C	
2'/55°C	
10'/72°C	
Pause/4°C	

Auf eine Überschichtung mit Mineralöl zur Vermeidung von Verdunstungen konnte aufgrund einer vorhandenen Deckelheizung verzichtet werden.

3.2.1.1 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

100 ng Vektor und der fünffachen äquimolaren Menge DNA-Fragment sowie 2 μ l Ligasepuffer (5x) und 0,5 U T4-DNA-Ligase (Roche) wurden 4 h bei 15°C inkubiert. Zur Kontrolle auf Vollständigkeit der Vektor-Dephosphorylierung sowie als Negativkontrolle für die Ligationsreaktion wurde parallel hierzu ein Ansatz ohne Zugabe eines DNA-Fragments inkubiert. Klonierungen von DNA-Fragmenten mit überhängenden DNA-Enden oder Religierung von Vektor erfolgte vereinzelt auch bei Raumtemperatur (4 h).

3.2.1.2 Chemische Transformation des Ligationsansatzes (Hitzeschock-Methode)

5 μ l des Ligationsansatzes und 100 μ l kompetente Bakterien wurden für 30 min auf Eis inkubiert, der anschließende Hitzeschock erfolgte für 90 s in einem 42 °C Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen für fünf Minuten auf gekühlt. Zur Bakteriensuspension wurden 900 μ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) gegeben und für 1 h bei 220 U/min und 37 °C inkubiert. 50-200 μ l der Bakteriensuspension wurden auf Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und bei 37°C ü.N. inkubiert. Von vereinzelt liegenden Kolonien wurde eine Übernachtskultur angelegt und die DNA nach der Schnellaufschlussmethode isoliert (nach Hannaham), wobei 4 ml der Bakteriensuspension vor dem Aufschluss abgezweigt und auf Eis gelagert wurden, bis das Ergebnis aus den Schnellaufschlüssen und den sich anschließenden Kontrollverdauen vorlag. Von positiven Klonen (mit Insert) wurden Glycerinkulturen angefertigt.

3.2.2 Modifikation von DNA-Fragmenten und Plasmiden

3.2.2.1 *Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen*

1 µg Plasmid-DNA und 1-2 U Restriktionsendonuklease (Biolabs) wurden bei 37 °C für 1-2 h inkubiert. Die jeweiligen Restriktionsendonukleasen wurden verwendet, wenn sie bis zu fünf Schnittstellen des betreffenden Enzyms aufweisen. Genomische DNA (10-30 µg) wurde mit mindestens 3 U Enzym pro µg DNA, mit Öl überschichtet, über Nacht bei 37 °C im Thermoblock inkubiert (das Volumen an zugesetztem Enzym überstieg hierbei nicht mehr 10 % des Gesamtvolumens). Vereinzelt musste 1/10 Vol. RNaseA (10 mg/ml) hinzugegeben werden. Die Verdauansätze wurden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers der Restriktionsendonukleasen durchgeführt.

3.2.2.2 *5'-Dephosphorylierung von Vektoren durch alkal. Phosphatase*

Zur Verhinderung einer intramolekulare Religation des Vektors wurde der linearisierte Vektor am 5'-Ende dephosphoryliert. Hierzu wurden 3,5 µl linearisierter Vektor 5 min bei 65 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 5,5 µl alkalischer Phosphatase-Puffer und 10 U alkalischer Phosphatase (Roche) - ad 30 µl mit H₂O aufgefüllt - hinzugegeben und wie folgt inkubiert: 20 min/37 °C, 10 min /60 °C, 10 min/70 °C, 5 min/RT. Die etwas einfachere Verfahrensweise - direkt im Restriktionspuffer für 30 min mit 1 U alkalischer Phosphatase bei 37 °C inkubieren und nach einer Stunde die erneute Inkubation unter Zugabe von 1U des Enzyms für 30 min - erwies sich als ähnlich effizient Die alkalische Phosphatase wurde - wie oben - durch zehninütiges Erhitzen auf 70 °C inaktiviert und mit anschließender Phenolextraktion aus dem Reaktionsansatz entfernt.

3.2.2.3 *Herstellung von glatten Enden an DNA-Fragmenten durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase*

Zum Auffüllen überhängender DNA-Enden wurden 5 U des Enzyms Klenow-Polymerase (Roche) mit 0,1 - 4 µg DNA-Fragmente, 1x Klenow-Puffer und Desoxynukleotide (dNTPs; $C_{\text{final}} = \text{je } 30 - 200 \mu\text{M}$) in insgesamt 20 µl bei 30 °C für

20 min inkubiert. Überhängende 3'-Enden wurden entfernt, indem die Nukleotide erst nach einer kurzen Inkubationszeit (20 s – 2 min) zum Reaktionsansatz zugeben wurden (durch die Abwesenheit von Nukleotiden wird die Exonukleaseaktivität der Klenow-Polymerase aktiviert). Die Enzyminaktivierung erfolgte für 10 min bei 75 °C.

3.2.2.4 Herstellung von glatten Enden an DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Polymerase

Die ausgeprägte 3'→5' Exonukleaseaktivität der T4-Polymerase dient vor allem zum Entfernen von 3'-überhängenden Enden an DNA-Fragmenten. Hierzu wurden ad 20 µl 1x T4-Polymerase Puffer und dNTPs ($C_{\text{final}} = \text{je } 30 - 200 \mu\text{M}$) sowie 0,1 - 4 µg DNA gegeben und mit fünf Units Enzym (Roche) bei 37 °C für 20 min, die anschließende Inaktivierung erfolgte bei 75 °C in 10 min.

3.2.2.5 Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen an DNA-Fragmenten

Für eine erfolgreiche Ligation von Vektor und DNA-Fragment - d.h., die Enden der DNA-Fragmente in Substrate für die T4-DNA-Ligase zu überführen - ist es zudem notwendig, dass die freien 5'- Hydroxylgruppen der DNA-Fragmente kinasiert werden. Hierzu wurde die T4-Polynukleotidkinase (PNK; Roche) verwendet. Die Reaktion erfolgte in 1x PNK-Puffer mit 1 U PNK für mindestens eine Stunde bei 37 °C, anschließend wurde die PNK bei 70 °C für 5 min hitzeinaktiviert.

3.2.3 Aufreinigung von DNA

3.2.3.1 Plasmidisolierung über Jetstar-Säulen

Die präparative Plasmidisolierungen erfolgte über Ionenaustauscher-Säulen (Genomed) verwendet. Hierdurch wird - im Unterschied zur Ultrazentrifugation - ein Präzipitationsschritt erforderlich. Die hochreine, präparierte Plasmid-DNA wurde in der Regel für die Transfektion eukaryotischer Zellen verwendet. Für eine Plasmid-Maxi-Präparation wurden 400 ml einer Übernachtskultur zentrifugiert (2500 x g; 4 °C; 10 min) und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer E1 - mit frisch zugesetzter RNase (0,1 µg/µl final) - resuspendiert. 10 ml Puffer E2 wurde vorsichtig hinzugemischt und für die

alkalische Lyse 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 10 ml Puffer E3 (mehrmals intensiv geschwenkt). Der Bakteriendebris wurde bei 9000 x g und 4 °C in 30 min abzentrifugiert. 4 °C; 10 min). Der Überstand wurde auf die - zuvor mit 30 ml Puffer E4 - äquilibrierten Ionenaustauschersäule aufgetragen und mit 60 ml (2 x 30 ml) Puffer E5 gewaschen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer E6 eluiert und mit dem 0,7-fachen Volumen an 2-Propanol gefällt. Zur Vollständigkeit der Präzipitation wurde der Ansatz mehrfach geschwenkt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 30 min bei 9000 x g zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit kaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 500 µl H₂O (steril) gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im Photometer bei 260 nm.

Puffer E1: 50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA, pH 5,5; 100 µg/ml RNase A.

Puffer E2: 200 mM NaOH; 1 % SDS.

Puffer E3: 3 M KAc, pH 5,5.

Puffer E4: 100 mM NaAc/HAc, pH 5.0; 600 mM NaCl; 0,15 % Triton-X-100

Puffer E5: 100 mM NaAc/HAc, pH 5.0 , 800 mM NaCl

Puffer E6: 100 mM NaAc/HAc, pH 8.5; 1,25 M NaCl

3.2.3.2 Schnellaufschluss (Mini-Präparation) für die Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung nach der sogenannten Minipräparation diente zur schnellen Identifizierung von positiven Klonen durch einen Kontrollverdau wie auch für die Identifizierung nach einem Klonierungsschritt. Hierzu dienen die o.g. Puffer E1 – E3 unter Ausschluss von den o.g. Ionenaustauschersäulen. 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein Eppendorfgefäß übertragen und kurz abzentrifugiert (1 min/13000 x g; Heraeus; Tischzentrifuge Biofuge 13/15), der Überstand abdekantiert und das Bakterienpellet in 200 µl Puffer E1 resuspendiert. Mit 200 µl Puffer E2 (5 min; RT) wurden die Bakterien lysiert (hierbei mehrmals vorsichtig geschwenkt), mit 200 µl Puffer E3 wurde der Ansatz neutralisiert (15 min auf Eis, zwischenzeitlich öfter gevortext). Der Zelldebris wurde bei 15000 x g/ 15 min pelletiert. 400 µl des Überstandes wurden mit 800 µl absolutem Ethanol vermischt und sofort zentrifugiert (12000 x g/15 min/ RT). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und erneut mit 100 µl absolutem Ethanol gevortext und abzentrifugiert (5 min / 15000 x g). Der

Überstand wurde wieder vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und luftgetrocknet (15 min / RT). Die DNA wurde in 20 µl H₂O (steril) gelöst.

3.2.3.3 Gelelektion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Produkte wie auch Restriktionsansätze konnten durch eine Gelelektrophorese in einem Agarosegel analysiert wie auch aufgereinigt werden. Für die Aufreinigung aus Agarosegelen ($\leq 1,2\%$) wurden die relevanten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einem - mit einem am Boden versehenen Loch und mit Glaswolle gefüllten - 0,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Das gefüllte Eppendorfgefäß wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß platziert und bei 15000 x g/RT 15 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugalkräfte kollabiert das Agarosegel weitgehend, der wässrige Inhalt mit gelöstem DNA-Fragment gelangt hierdurch in das untere Eppendorfgefäß. Zur Entfernung von Ethidiumbromid wurde mit durch eine Phenolextraktion ausgeschüttelt und die DNA anschließend mit einer Ethanol-Präzipitation ausgereinigt.

3.2.3.4 Phenolextraktion von Proteinen

Falls erforderlich, können Proteine wie z.B. Restriktionsenzyme, aus einem Reaktionsansatz entfernt werden. Dazu wurde der Reaktionsansatz mit 1 Vol. TE-gesättigten Phenol versetzt und geschüttelt. Nach der Zentrifugation (5 min/15000 x g/RT) wurde die wässrige Phase erneut phenolvisiert. Die wässrige Phase wurde mit zur Entfernung des Phenols mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (25:1 v/v) extrahiert und der Ansatz mit Ethanol gefällt.

3.2.3.5 Ethanol-Präzipitation von DNA und RNA

Gelöste DNA oder RNA wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumina Ethanol (abs.) gemischt und in N₂ (flüssig) für 1 min gefällt. Das Präzipitat wurde bei 15000 x g (30 min / 4 °C) pelletiert, das Pellet einmal mit 200 µl kaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (15000 x g/5 min). Die DNA wurde 15 min bei 37 °C getrocknet.

3.2.4 Analyse von DNA

3.2.4.1 DNA-Auftrennung über Agarosegele

Die Produkte aus Restriktions- und von PCR-Ansätzen wurden über horizontale Agarosegele (0,8 - 2,0 %) analysiert. Hierzu wurden die DNA-Proben vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Stoppuffer vermischt. Die Elektrophorese wurde, je nach Größe der Gelkammer und Verwendung des Laufpuffers, bei 70 - 120 V durchgeführt (Spannungstransformator: BIORAD Modell 200/2.0; Gelkammern: Firma MWG Biotec).

3.2.4.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach dem enzymatischen Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) sequenziert. Für die Sequenzierungsreaktion wurde der *Thermo Sequenase cycle sequencing kit* nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham) angewandt. Dieser Kit verwendet anstelle von ddGTP das Derivat 7-Desaza-dGTP, um Bandenkompressionen zu vermeiden. Je Sequenzreaktion wurden 1-2 µg Plasmid verwendet. Die in 10 µl H₂O gelöste DNA wurde mit 50 µl 0,2 M NaOH, 2 mM EDTA für 10 min bei Raumtemperatur denaturiert. Nach Zugabe von 8 µl Ammoniumacetat (pH 4,5) und zwei Volumina Ethanol wurde die DNA gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet gelöst und zur "Annealing"-Reaktion eingesetzt. Im weiteren Vorgehen wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Ansätze wurden mit 30 µl Mineralöl überschichtet und die Sequenzierungsreaktion nach unten aufgeführtem Programm gestartet. Die Proben wurden zur Auftrennung der Reaktionsprodukte auf ein denaturierendes PAA-Gel aufgetragen (3.2.4.3).

Sequenzierungsreaktion

⇒ Reaktion:

2 min/95 °C	}	x 30 Zyklen
15 s/95 °C		
15 s/50 °C		
30 s/70 °C		
2 min/55 °C		
15 s/95 °C		
Pause/4 °C		

3.2.4.3 DNA-Sequenzierung mit dem LICOR-System

Nach der PCR wurden zu jedem Ansatz 3 µl Probenpuffer gegeben und anschließend die Gelelektrophorese über ein denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoffgel gestartet. Die Primer sind bei dem verwendeten Sequenziersystem 5'-fluoreszenzmarkiert und können durch Laseranregung auf dem Sequenzgel detektiert werden. Es wurden Harnstoffgele mit einer Länge von 30 cm und einer Dicke von 0,25 mm verwendet. Das Sequenzgel wurde bei 1000 V 5 h oder über Nacht gefahren. Die Auswertung der Gele erfolgte durch das Programm Image Analysis Version 4.00 (LICOR).

Probenpuffer:	95 % Formamid; 10 mM EDTA; 0,1 % Fuchsin (basisch); 0,01 % Bromphenolblau; pH 9,0
10x Long Run:	TBE: 1340 mM Tris, 45 mM Borsäure; 25 mM EDTA;
Polyacrylamid- Lösung:	Long Ranger (Fa. FMC)
Zusammensetzung des Sequenziergels:	Acrylamid-Lösung (5 %); 42 g Harnstoff; 4,75 g Acrylamid; 0,25 g Bisacrylamid; 10 ml 10 x TBE; ad 100 ml H ₂ O; sterilfiltrieren (0,45 µm).

3.3 Proteine

3.3.1 Induktion von GST- und His-Fusionsproteinen

Eine am Vortag angesetzte ü.N.-Kultur (3.1.2) wurde mit frischem LB-Medium (mit Ampicillin) 20-fach verdünnt. Die Bakterien wurden für ungefähr 90 min im Inkubator bei 220 U/min inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0.6 erfolgte die Induktion der Proteinsynthese mit 1,0 mM IPTG. Nach einer weiteren Inkubation von 4 h wurden die Bakterien bei 4 °C für 10 min mit 3500 x g abzentrifugiert. Die Bakterien wurden in 4 ml GST-Lysispuffer resuspendiert und Lysozym zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml hinzugegeben. Während der Inkubation auf Eis für 20 min wurde die Suspension mehrmals vermischt. Die folgende Puls-Sonifikation (6 x 10 min) wurde am Sonoplus HD7 (Bachhofer), durchgeführt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 12000 x g (4 °C/30 min) von dem Überstand abgetrennt. Als Oxidationsschutz wurden DTT (1 mM) und Glycerin (10 %) hinzugegeben. Die Proteingemische wurden durch die im Nachfolgenden beschriebenen Methoden nach 3.3.3 und 3.3.2 aufgereinigt.

GST-Lysispuffer: NETN (100 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,1 % NP-40), 1 µg/µl Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin, 100 µg/ml PMSF, 9,15 µg/µl RNase, 8,7 µg/µl DNase.

3.3.2 Aufreinigung von His-Fusionsproteinen

Als His-Fusionsproteine wurden folgende Proteine generiert: E2F1-wt, die in der Marked box mutierten Proteine E2F1-ML und E2F1-GB, sowie die Deletionsmutanten E2F1- Δ 277-350 (MB20), E2F1- Δ 277-302, Δ 413-437 (VP Δ X), E2F1- Δ 277-313 (d940). 0,4 l Bakteriensuspensionen wurden nach der Inkubation von 4h abzentrifugiert (15 min/ 2500 x g/ 4°C) und mit 10 ml His-Lysispuffer auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde 6 x 10 s lang sonifiziert und zentrifugiert (35 min/12000 x g). Der Überstand wurde mit 2,5 ml Ni-NTA-Agarose versetzt. Hierfür wurde die Ni-NTA-Agarose nach gutem Suspendieren zentrifugiert (5 min/750 x g), einmal mit einem Volumen

Lysispuffer gewaschen und mit einem Vol. Lysispuffer aufgenommen. Die Proteine wurden nach einem Chargen- oder „Batch“-Verfahren aufgereinigt. Es wurde für 4 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken in kleinen Falconröhrchen (unter Luftabschluss) inkubiert und anschließend viermal mit je 12,5 ml Waschpuffer gewaschen, die ersten beiden Waschschrte unter Zugabe von 0,05 % NP40 (Zentrifugationen bei 750 x g/ 4 °C/5 min). Das gebundene Material wurde mit zweimal je 1ml Elutionspuffer unter schwenken (5 min/4 °C) von der Agarose getrennt und mittels einer PD-10-Säule (Pharmacia) in HBS-EP umgepuffert.

Lysispuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 130 mM NaCl; 1 % Triton-X-100; 10 mM NaF; 20 mM Imidazol; 10 µg/µl DNase; 5 µg/µl RNase, 1 mg/ml Lysozym, 5 mM PMSF

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 50 mM NaP_i, pH 6,0; 300 mM NaCl; 10 % Glycerin; 0,5 M Imidazol

3.3.3 Aufreinigung von GST- Fusionsproteinen

10 ml des aus 3.3.1 hervorgegangenen Proteingemisches wurden mit 2 ml GST-Sepharose ü.N. (4 °C) in einem kleinen Falconröhrchen langsam vertikutiert. Der Überstand wurde bei 750 x g in 10 min abzentrifugiert. Die GST-Sepharose wurde in 5 ml Resuspensionspuffer in eine Glassäule mit Fritte gegeben, das vollständige Absetzen der Sepharose benötigte 2 h. Die Säule wurde unter Gravitationsfluss zweimal mit je 40 ml Resuspensionspuffer gespült, anschließend unter Gravitationsfluss mit 40 ml Tris-HCl (pH 8,0) umgepuffert und anschließend mit insgesamt 10 ml Elutionspuffer eluiert. Der Fluss wurde durch eine Schlauchklemme verlangsamt, um eine möglichst spontane Elution auf wenige ml zu erreichen. Die Proteinkonzentrationen der GST-Eluate wurden photometrisch bestimmt.

Resuspensionspuffer: 150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, 1 % Triton X100; pH 7,3.

Elutionspuffer: Tris-HCl (pH 8,0), 75 mM reduziertes Glutathion.

3.3.4 Aufreinigung von Ku70-Gst durch Immunoaffinitätschromatographie

Das aus Abschnitt 3.3.3 erhaltene Ku70-GST enthält - vermutlich aufgrund der ungünstigen räumlichen Lage des GST-Ankers - noch einen erheblichen Anteil an weiteren Proteinen. Die hohen Reinheitsansprüche des Biacore-Systems -in dem das Ku70-GST als Ligand verwendet werden soll- erfordern somit eine weitere Aufreinigungsstufe. Dies erfolgte durch eine Immunoaffinitätschromatographie. Hierfür wurden die Eluate mit den drei höchsten Proteinkonzentrationen in einer PD10-Säule in Kopplungspuffer umgepuffert und mit Hilfe von Konzentratoren (Ausschlussgröße: 30 kD) auf bei 0,5 ml aufkonzentriert.

3.3.4.1 Präparation der CNBr-Sepharose

Für dessen Aktivierung wurden 0,1 g CNBr-Sepharose ü.N. bei 4 °C in 1,5 ml HCl (1 mM) langsam über Kopf geschwenkt. Anschließend wurde die Sepharose fünf mal mit 4 °C-kalter HCl (1 mM) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation (5 min/500 x g) wurde die aktivierte CNBr-Sepharose (30 µl) in 1,5 ml Kopplungspuffer suspendiert und mit 60 µl α -Ku70 (Maus, Sigma) ü.N. bei 4 °C über Kopf langsam gekoppelt. Die nun mit α -Ku70 beladene Sepharose wurde drei mal mit Kopplungspuffer gewaschen und anschließend mit zweimal mit Blockpuffer gewaschen, der letzte Blockierschritt wurde auf ü.N. (unter Schwenken bei 4 °C) ausgedehnt. Anschließend wurde dreimal mit je fünf Volumina Waschpuffer gewaschen. Die mit mAb beladene, aktivierte Sepharose konnte dann in Kopplungspuffer (+ 0,02 % NaN₃) gelagert werden.

Quellpuffer: 1 mM HCl

Waschpuffer: 1 mM HCl

Kopplungspuffer: 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl; pH: 8,5

Blockpuffer: 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, 1,0 M Glycin; pH: 8,0

3.3.4.2 Beladung der α -Ku70-CNBr-Sepharose

110 µl des zuvor durch eine GST-Affinitätschromatographie aufgereinigte Ku70-GST wurden nach Umpufferung in Kopplungspuffer mit α Ku70-Sepharose suspendiert und mit Kopplungspuffer soweit aufgefüllt, dass das Eppendorfgefäß nach dessen Schließen weitgehend luftblasenfrei war. Die Bindung erfolgt bei 4 °C unter langsamer

Rotation in 8 h. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation (3 min/500 x g) verworfen und die Sepharose mit Kopplungspuffer einmal gewaschen. Die Elution erfolgte durch die Inkubation mit 2 x je 65 µl NaCl (2M) in 20 min bei 4 °C.

Die Eluate wurden gepoolt und in 10 mM Natriumacetat (pH 5,0) über Nacht in einem Slide-A-Lyzer (Ausschlussvolumen: 10 kD) bei 4 °C dialysiert. Die Proteinlösung wurde anschließend erneut mit Konzentratoren (Fa. Filtron, Cut-off: 10 kD) auf ein Volumen von 0,5 ml aufkonzentriert. Das aufgereinigt Ku70-GST wies nunmehr keine – im Silbergel erkennbaren – Verunreinigungen auf und konnte für die Immobilisierung auf den Biacore-Chip CM5 verwendet werden (s. 3.3.12.1).

Elutionspuffer: 2 M NaCl, 50 mM Na₂HPO₄; pH 4,0

3.3.5 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen nach Laemmli

Die durchgeführten Elektrophoresen erfolgten in enger Anlehnung an Laemmli (1970). Die Kombination von Sammel- und Trenngel erlaubt eine wesentlich höhere Auflösung als die alleinige Verwendung eines Trenngels. Für die hier beschriebenen Versuche wurden 10 %-ige Trenngele benutzt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf ein Minigel einer Biorad Mini-Gelkammer. Die Polymerisierung wurde durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat und TEMED gestartet. Das Trenngel wurde nach dem Einfüllen in die Gelkammer mit Isopropanol überschichtet, um eine scharfe Trenngrenze zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten. Das Isopropanol wurde mittels eines Filterpapiers und mehrmaligem Spülen mit H₂O, bidest. nach der vollständigen Polymerisation des Trenngels entfernt. Das Sammelgel hat in den verwendeten Mini-Gelkammern eine Länge von ca. 1,5 cm. In das Sammelgel wurde ein Taschenkamm platziert. Nach dem Entfernen des Kamms wurden Gelreste durch Spülen mit einer Hamilton-Spritze entfernt. Die fertigen Gele wurden in das Gelkammer-System (Biorad) eingesetzt und beide Elektrodenkammern mit 1 x Laemmli-Puffer gefüllt. Proteinproben wurden im Verhältnis 4:1 Probenpuffer (4x) versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Der Lauf erfolgte für ca. 1 h bei konstant 40 mA.

Acrylamidlösung: 30 % Acrylamid; 0,8 % Bis-Acrylamid

Sammelgel: 0,9 ml 1 M Tris, pH 6,8; 0,6 ml Acrylamidlösung; 2,5 ml Aqua dest.; 50 µl APS, 10 % (w/v); 10 µl TEMED

Trenngel: 1,5 ml 1,5 M, Tris pH 8,8; 2,0 ml Acrylamidlösung; 2,5 ml Aqua dest.; 50 µl APS, 10 % (w/v); 10 µl TEMED

5x Laemmli-Puffer: 15,1 g Tris; 72 g Glycin; 5 g SDS ad 1 l

4x Probenpuffer: 40 ml Glycerin; 4 g SDS; 4 ml 2-Mercaptoethanol; 2 mg Bromphenolblau; 2,5 g Tris, pH 6,8 ad 100 ml

3.3.6 Färben von Proteingelen

3.3.6.1 Coomassie-Färbung

Der Farbstoff Coomassie-Blue R₂₅₀ bindet über hydrophobe Wechselwirkungen unspezifisch an Proteine. Die Nachweisgrenze liegt bei einigen 100 ng. Nach der Gelelektrophorese (siehe 3.3.1) wurde das Proteingel 1 h in der Färbelösung geschwenkt, wobei die Proteine gleichzeitig fixiert wurden. Im Anschluss wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung der Gelmatrix in Entfärbelösung geschwenkt.

Coomassie-Färbelösung: 50 % Methanol; 10 % Essigsäure; 0,05 % Coomassie-Blue R250

Entfärbelösung: 10 % Essigsäure

3.3.6.2 Silberfärbung

Die hier verwendete Silberfärbung wurde von Heukeshoven und Dernick (1985) entwickelt. Sie ist bis zu hundertmal empfindlicher als die zuvor beschriebene Coomassie-Färbung. Jedoch hängt die Empfindlichkeit stärker als bei anderen Methoden von der Natur des Proteins ab. Hierzu wurde ein Polyacrylamidgel 30 min in Fixier- und weitere 30 min in Sensitivierungslösung geschwenkt. Nach drei Waschschritten mit H₂O (bidest.) wurde mit Silbernitratlösung für 20 min gefärbt. Die Färbung wurde nach zwei einminütigen Waschschritten mit bidest. Wasser mit Entwicklerlösung so lange entwickelt, bis die gewünschten Banden ausreichend stark zu erkennen waren bzw. der Hintergrund keine zu starke Färbung zeigte. Zum Beenden der Entwicklung wurde das Gel in Stopplösung überführt.

Fixierlösung:	40 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Eisessig
Sensitivierungslösung:	30 % (v/v) Isopropanol; 0,125 % (v/v) Glutardialdehyd; 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat; 6,8 % (w/v) Natriumacetat
Silbernitratlösung:	0,25 % (w/v) Silbernitrat; 0,015 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklerlösung:	2,5 % (w/v) Natriumcarbonat; 0,0075 % (v/v) Formaldehyd;
Stopplösung:	40 mM EDTA, pH 8,0

3.3.7 Transfer und Nachweis von Protein auf Nylon-Membran (Western-Blot)

3.3.7.1 Transfer

Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nylon-Membran wurde mit der Mini-Blot-Apparatur (Biorad) in sogenannten Tankblotverfahren durchgeführt. Dazu wurde ein Stapel bestehend aus einem Schwamm, zwei Lagen Whatmanpapier, dem Proteingel, der Nylon-Membran, zwei weiteren Lagen Whatmanpapier und einem weiteren Schwamm nach Herstellerangaben in die Apparatur eingelegt. Alle Bestandteile des Stapels wurden zuvor in Blotpuffer getränkt und luftblasenfrei aufeinandergelegt.

Blotpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin

3.3.7.2 Immundetektion von Proteinen

Nach dem Proteintransfer (3.3.7.1) wurde die Membran zunächst für 1 h bei mäßiger Geschwindigkeit mit TBS-T (mit 2 % Magermilchpulver) für 1 h geblockt. Danach erfolgten drei Wasch-Schritte (1 x 15 min; 2 x 5 min) in TBS-T. Der primäre Antikörper wurde in den u.a. Verdünnungen (in TBS-T; mit 0,04 % Magermilchpulver) für 60 min (oder ü.N. bei 4 °C) präadsorbiert. Nach drei weiteren Wasch-Schritten mit TBS-T (1 x 15 min; 2 x 5 min) erfolgte die Bindung des sekundären AP-konjugierten Anti-Spezies-IgG-Antikörper für 60 min (in TBS-T; mit 0,2 % Magermilchpulver) inkubiert. Es wurde erneut mit TBS-T gewaschen (3 x 10 min), dann mit TBS (2 x 7 min) und schließlich in Phosphatase Puffer (1 x 5 min) umgepuffert.

Verdünnungen der primären Antikörper: α -E2F1 (mouse): 1:1000
 α -E2F3 (mouse): 1:5000
 α -Ku70 (mouse): 1:5000
 α -Ku80 (mouse): 1:2500

Verdünnung des sekundären Antikörpers: α -mouse-AP(goat): 1:10000

Blockierlösung: 4 % Magermilchpulver in TBST

TBST: 150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,05 % Tween-20

3.3.7.3 NBT/bCIP-Nachweis

Bei dieser Nachweismethode wird durch die Alkalische Phosphatase die Oxidation von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (bCIP) bei gleichzeitiger Reduktion von Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) katalysiert, was in beiden Fällen zur Bildung eines blauen Präzipitats führt. Zu 10 ml Phosphatasepuffer wurden 66 μ l NBT und 33 μ l bCIP pipettiert, kurz gemischt und auf die Membran gegeben. Die Farbreaktion dauert 30 s bis maximal 10 min.

Phosphatasepuffer: 5 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9,5

3.3.8 GST-Pulldown-Assay

Für die Verwendung in einem GST-Pulldown-Assay wurde die zu verwendende Glutathion-Sepharose mit 0.5 % Magermilch in NETN-Puffer durch ständige Rotation über Kopf bei 4 °C für 1 h vorbehandelt. Anschließend wurde die Sepharose einmal mit NETN gewaschen und daran 250 μ l der nach 3.3.3 aufgearbeiteten GST-Fusionsproteine unter Rotation für 1 h bei 4 °C gebunden. In einem Vorversuch konnte nun die Reinheit und Größe der Fusionsproteine gemäß 3.3.5 und 3.3.6.1 bestimmt werden. Beim eigentlichen Präzipitationsexperiment erfolgte nach der Bindung der Proteine an die GST-Sepharose die Zugabe des Kernextraktes (3.4.2) in Bindepuffer bei einem Gesamtvolumen von 250 μ l. Nach der Inkubation (4 h/4 °C) bei ständiger Rotation wurden die Ansätze mehrmals gewaschen, zentrifugiert wurde bei

1200 x g für 1 min. Die spezifische Visualisierung erfolgte über ein Western-Blot (3.3.7).

NETN-Puffer: 0.5 % NP-40, 1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF

Bindepuffer: 0.03 % NP-40, 1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM ZnSO₄

3.3.9 In vitro-Translation

Die *in vitro*-Translation wurde in einem Kaninchen-Retikulozyten-System durchgeführt, das von der Firma Promega, Heidelberg, bezogen wurde. Zur radioaktiven Markierung wurde ³⁵S-Methionin der Firma Amersham, Braunschweig, eingesetzt. Ein Aliquot wurde aus dem -80 °C-Schrank genommen und auf Eis aufgetaut. Mit einer Pipettenspitze wurde vorsichtig homogenisiert, bevor 35 µl entnommen wurden. Der Translationsansatz enthielt: 8 µl DNA, 1 µl RNasin (50 U), 1 µl Aminosäuremix ohne Methionin, 5 µl ³⁵S-Methionin (50 mCi) und 35 µl Retikulozytenlysat. Es wurde für 1,5 h bei 30 °C inkubiert. Das Proteinprodukt (10 µl des Ansatzes) wurde auf einem SDS-PAGE, 3.9.1, analysiert. Das *in vitro* translatierte Protein wurde dann zum Nachweis von spezifischen Protein-Protein- Interaktionen verwendet.

3.3.10 Kinase-Assay

Zum Nachweis einer Phosphorylierung von Proteinen durch die DNA-abhängige Protein-Kinase wurde ein Test der Firma Promega verwendet. Die Experimente wurden nach Vorschrift durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass das verwendete ATP-[γ -³²P] nicht älter als drei Tage (nach Anlieferung) ist. Das im Versuchsansatz enthaltene Polypeptid-Fragment von p53 (15 AA, 1,7 kD) diente als Positiv-Kontrolle. Direkt nach Anlieferung des Kits wurde das Peptid als Schutz vor schneller Degradation portioniert und bei -80 °C gelagert, in Anlehnung an die aufgereinigten E2F1-Fusionsproteine. Pro Experiment wurde ein Aliquot kurz vor Versuchsbeginn aufgetaut. Die für die katalytische Aktivität der DNA-PK wichtige DNA bestand aus doppelsträngiger Plasmid-DNA des Vektors pCI-AB. In Abänderung zum Protokoll des Herstellers wurde kein nicht-radioaktives ATP dem Versuchsansatz beigefügt. Vor

Zugabe der DNA-PK wurden die Versuchsansätze für 3 min bei 30 °C vorgewärmt, die Reaktionsdauer betrug 30 min bei 30 °C. Die Reaktion wurde mit 1 Vol. des Reaktionsansatzes CH₃COOH (30 %) gestoppt. 10 µl wurden auf ein 2 x 2 cm großes Whatmanpapier (P81) geträufelt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Papierstücke wurden 4 x 10 min mit jeweils 30 ml 15 % CH₃COOH gewaschen und erneut luftgetrocknet. Die Messung erfolgte anhand eines Szintillationszählers (10 s pro Messung), deren Resultate in Abb. 19 dargestellt werden.

3.3.11 Quantifizierung von gelöstem Protein

3.3.11.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die von Bradford beschriebene Methode (Bradford et al. 1976) verwendet den Farbstoff Coomassie-Blue, der bei Bindung an Protein sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Es wurde ein Bradford-Reagenz der Fa. Biorad verwendet. Für die Proteinbestimmung im Mikrotiterplattenverfahren wurde 20 µl Bradford-Reagenz und 80 µl Probe verwendet. Parallel zur Probe wurde eine Kalibrierreihe mit bekannter Konzentration an BSA im Bereich von 0,5 – 20 µg mitgeführt. Die Absorption wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers bestimmt und die Konzentration anhand der mitgeführten Kalibrierreihe ermittelt.

3.3.11.2 Proteinbestimmung mit dem BIORAD-Assay-Kit

Der BIORAD Protein-Test beruht auf der Beobachtung, dass das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blau G-250 nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Dabei besteht bei geeigneter Wahl der Protein- und Farbstoffkonzentrationen ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Absorption bei 595 nm und dem Proteingehalt der Probe (Bradford, 1976). Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers auf Mikrotiterplatten in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Proben wurden jeweils in 1:2 Verdünnungen austitriert. Es wurde immer eine Kalibriergeraden (BSA) mitgeführt. Die Messung erfolgte im ELISA-Reader (Dynatech MR 500) bei 595 nm.

3.3.11.3 Proteinbestimmung durch photometrischen Vergleich

Die präziseste Konzentrationsbestimmungen ist der photometrische Vergleich von Coomassie-gefärbten Proteinbanden. Hierzu wurde ein 10 %-iges Polyacrylamidgel (3.3.1) - zusätzlich zu den eigentlichen Proben - mit vier bis fünf verschiedenen Mengen an BSA beladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einer Coomassie-Färbung (3.3.6.1) wurde das Gel gescannt und anschließend sowohl die BSA-Banden wie auch die des zu bestimmenden Proteins photometrisch bestimmt, unter Verwendung der Software TINA 2.0. Aus den Extinktionswerten der verschiedenen BSA-Mengen wurde eine Kalibriergerade erstellt, anhand dieser dann die Extinktionswerte der relevanten Proteinbanden den entsprechenden Mengen - respektive Konzentrationen- zugeordnet werden konnten.

3.3.12 BIAcore-Analysen

Das Biacore 2000-System detektiert Interaktionen von Molekülen ab einem Molekulargewicht von etwa 5000. Es arbeitet nach dem Prinzip der Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR, engl. **surface plasmon resonance**). Auf einem - in diesem Fall verwendeten - Goldchip mit präparierter, aktivierter Oberfläche wird ein Ligand mit definierter Menge immobilisiert. Die Menge des immobilisierten Proteins verhält sich hierbei proportional zu der detektierten Beladungsdichte. Die verbleibenden, noch freien Bindungsstellen der Chipoberfläche werden mit einem primären Aminalkohol abgesättigt, um weitere Bindungen des anschließend hinübergeleiteten Proteins an die Chipoberfläche zu verhindern. Der Chip wird mit polarisiertem Licht bestrahlt, das in einem bestimmten Winkel reflektiert wird und zu einer Abnahme der Intensität des polarisierten Lichtstrahls führt. Ein potentieller Bindungspartner (Analyt) des immobilisierten Proteins wird anschließend in laminarem Pufferfluss über den Liganden geführt und vergrößert in distinktem Maße den Austrittswinkel des reflektierten Lichtstrahls. Entsprechend der Menge des gebundenen Analyten ändert sich der Ausfallwinkel des polarisierten Lichts. Aus der Differenz ergibt sich eine Signaländerung und im zeitlichen Verlauf ein Sensogramm. Aus den Sensogrammen verschiedener Konzentrationen lassen sich unter Verwendung der Software BIAevaluation 3.0 die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten einer jeweiligen Protein-Protein-Wechselwirkung berechnen.

3.3.12.1 Immobilisierung des Liganden

Der Ligand Ku70 wurde als GST-Fusionsprotein in 0,01 M Na-Acetat-Puffer (pH 5,0) verwendet. Die Immobilisierung wurde unter Verwendung eines CM5-Chips, der eine modifizierte Dextran-Oberfläche besitzt- bei einem Fluss von 10 µl/min durchgeführt. Als Laufpuffer wurde HBS-EP verwendet. Zur Aktivierung der Oberfläche wurden 40 µl eines 1:1-Gemisches aus EDC (1-Ethyl-3-[dimethylaminopropyl]-carbodiimid-HCl)- und NHS (N-Hydroxysuccinimid)-Lösung injiziert. Anschließend wurde der Chip manuell mit 500 RU Ku70-GST (resonance unit; Kanal 1) sowie 1100 RU (Kanal 2) beladen. Kanal 3 des Chips wurde mit 1100 BSA beladen, Kanal 4 wurde nicht beladen. Danach wurde die Oberfläche des Chips mit 40 µl Ethanolamin abgesättigt und mit 15 µl HCl-Lösung (0,01 M) gereinigt. Beladene Chips konnten bei 4 °C ohne Aktivitätsverlust über mehrere Monate gelagert werden.

EDC-Lösung: 75 mg/ml EDC in H₂O (bidest.)

NHS-Lösung: 11,5 mg/ml NHS in H₂O (bidest.)

HBS-EP: 0,01 M HEPES pH 7,4; 0,15 M NaCl; 3 mM EDTA; 0,005 % Polysorbat 20 (v/v)

Ethanolamin: 1 M

HCl-Lösung: 0,01 M HCl

3.3.12.2 Analyse

Für die SPR-Messung wurde wiederum ein Fluss von 10 µl/min gewählt, das Probenvolumen für die Injektion betrug 110 µl. Während der Injektion der Probe kann im Sensogramm die Assoziationskinetik abgelesen werden. Nach dem Ende der Injektion dissoziiert der Analyt vom Liganden. Aus dieser Phase der Analyse ist es möglich, den KD-Wert einer Interaktion zwischen zwei Proteinen zu errechnen. Die Konzentration der Proben lag im Bereich von 10-2000 nM. Jede Analyse mit mindestens fünf unterschiedlichen Konzentrationen des Analyten wurde drei- bis fünfmal durchgeführt.

Für die Bindungskinetik eines Analyten mit einem immobilisierten Protein sind für den Signal-Aufbau im Biacore-System folgende Parameter von Bedeutung:

- die Konzentration des Analyten
- das Molekulargewicht des Analyten
- die Dauer der Analyt-Kontakt-Zeit.

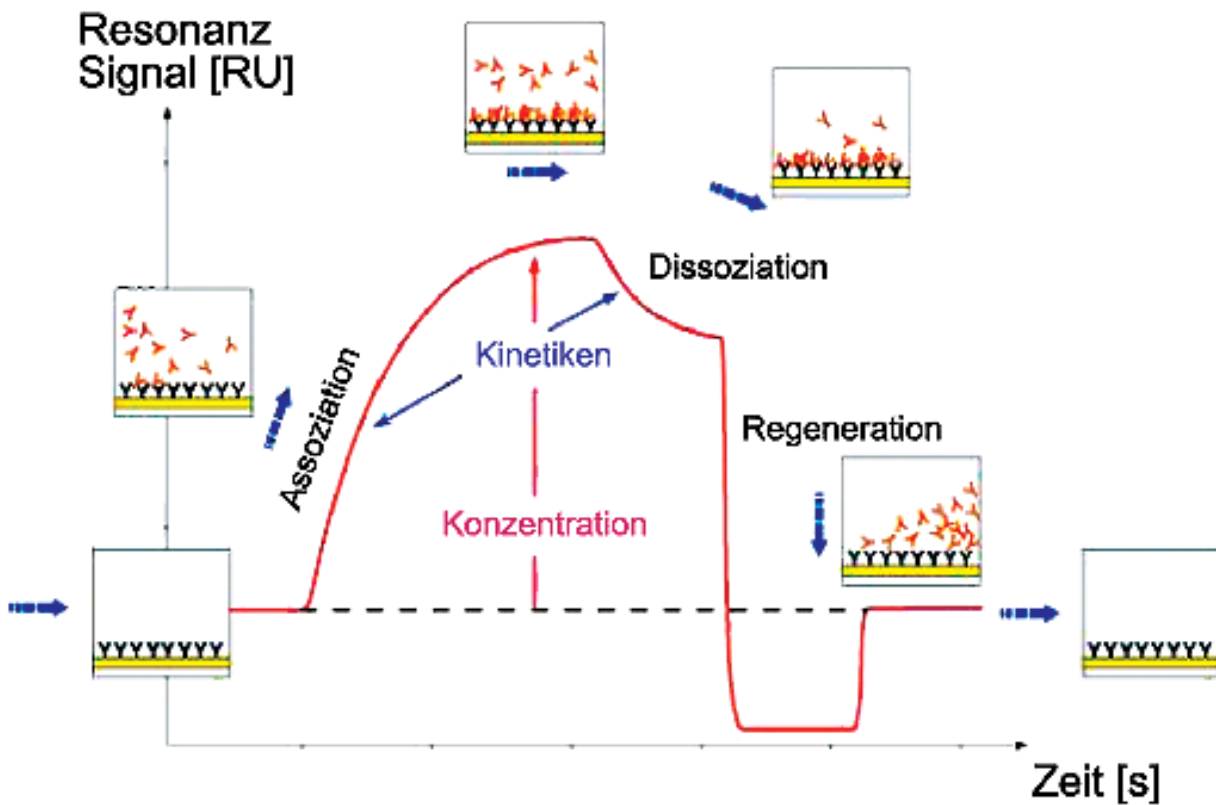


Abb. 7: Idealisierte Darstellung der Bindungskinetik einer Protein-Protein-Wechselwirkung in einem Biacore2000-System

3.3.12.3 Auswertung:

Alle Berechnungen wurden unter Benutzung der BiaEvaluation 3.0 Software (Biacore) durchgeführt. Da die Protein-Protein-Wechselwirkung von E2F1 und Ku70 einem 1:1-Bindungsmodell entspricht, konnten die Bindungskinetiken nach einer Reaktion erster Ordnung berechnet werden. Die Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten wurden mit der Option „lokal fit“ berechnet, wodurch eine Korrelation der theoretischen - aus den Geschwindigkeits-Konstanten errechneten - Bindungskurven auch im Grenzbereich erreicht werden konnte.

Die der Berechnung der Konstanten zugrunde liegende Formel lautet wie folgt:

$$B_{\text{frei}} = \frac{B - A - K_D}{2} + \sqrt{\frac{(A + B + K_D)^2}{4} - A \cdot B}$$

B_{frei} = freie Konzentration von Komponente B

A und B = totale Konzentrationen von A und B ([mol*l⁻¹])

K_D = Gleichgewichts-Konstante für $A + B = AB$

3.4 Zellkultur

3.4.1 Lagerung von Stammkulturen

3.4.1.1 Stammkulturhaltung

Zur langfristigen Aufbewahrung können Zellen bei -196 °C (N₂, flüssig) eingelagert werden. Dazu wurden etwa 10⁷ Zellen abzentrifugiert (750 x g/5 min) und in einer Mischung aus 90 % FKS und 10 % DMSO aufgenommen. Die Aliquots wurden zunächst mit Hilfe einer Einfrierbox (gefüllt mit 2-Propanol) schonend auf -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.4.1.2 Reaktivierung eingefrorener Zellen:

Für die Reaktivierung von eukaryotischen Zellen wurden tiefgefrorene Zellen (3.4.1.1) dem Stickstofftank entnommen und das Röhrchen direkt für 1 min in warmes Wasser aufgetaut. Die vollständig aufgetauten Zellen wurden mit Hilfe von 20 ml Wachstumsmedium vorsichtig suspendiert und bei 750 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen und in einer Zellkultur-Flasche mit weiteren 10 ml Medium versetzt. Das Wachstum der Zellen erfolgte in einem 37 °C-Brutschrank bei 5 % CO₂ (Heraeus 6000). Schwach proliferierende adhärenente Zellen

wurden durch die zusätzliche Gabe von nicht-essentiellen Aminosäuren (0,5 mg/ml), Hypoxanthin (0,6 mg/ml) unterstützt, bei schwach proliferierende Suspensionszellen durch die zusätzliche Gabe von nicht-essentiellen Aminosäuren (0,5 mg/ml), Hypoxanthin (0,6 mg/ml) sowie Mem-Vitamins (Gibco; 0,2 mg/ml).

Wachstumsmedium: RPMI, 10 % FKS, 1 mg/ml Penicillin, 1 mg/ml Streptomycin,
0,5 mg/ml Mercaptoethanol,
Dulbecco's MEM-Medium mit 10 % FKS

FKS: Fötales Kälberserum wurde vor Gebrauch hitzeinaktiviert:
20 min/56 °C

3.4.1.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung der unter 2.3 angegebenen Zelllinien erfolgte in Anlehnung an Standardvorschriften. Zum Passagieren wurden adhärenenten Zellen einmal mit PBS-d gewaschen und danach für 1 min in Trypsinlösung bei 37 °C inkubiert. Nach dem vollständigen Ablösen der Zellen (Mikroskop) wurden diese in zehnfachem Volumen Medium aufgenommen und ein Aliquot für die entsprechende Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Suspension wurde auf drei Monolayer-Flaschen verteilt, in denen sich bereits Dulbecco's MEM-Medium (20 ml) befand. Suspensionszellkulturen wurden nach dem Erreichen einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml geteilt. In Abhängigkeit von der Zellzyklusdauer wurden 5 - 15 ml Suspensionskultur in eine neue Monolayer-Flasche gegeben und mit RPMI-Medium auf 30 ml aufgefüllt. Dem Medium wurde gegebenenfalls mit $1/100$ Volumen einer Amphotericin-B-Lösung (0,25 µg/µl) zugesetzt, um dem Wachstum von Hefen entgegenzuwirken.

PBS-d: 8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 0,2 g/l KH_2PO_4 ; 1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$;
0,3 g Penicillin; 0,1 g Streptomycin

Trypsinlösung: 0,25 % Trypsin; 0,05 % EDTA ad 1 l PBS-d

3.4.2 Herstellung von Kernextrakten

Adhärenz wachsende Zelllinien wurden zunächst mit PBSd gewaschen und anschließend trypsinisiert. Durch erneute Zugabe von PBSd konnte das Trypsin neutralisiert werden und die Zellen bei 4 °C 1200 rpm 10 min abzentrifugiert werden. Suspensionszellen konnten direkt abzentrifugiert und mit PBSd gewaschen werden. Nun wurden die Zellen in hypotonischem Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in hypotonischem Puffer mit 0,5 % NP-40 resuspendiert. Während einer dreiminütigen Inkubation auf Eis, wurden die Zellen wiederholt auf einem Vortexer stark gemischt. Anschließend wurde sonifiziert und schließlich bei 9000 rpm 10min in der Kühlzentrifuge das Kernextrakt vom Rest getrennt. Der Niederschlag konnte nun in dem gewünschten Bindepuffer aufgenommen werden.

Hypotonischer Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7.8; 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM PMSF

3.4.3 Transfektionsmethoden für eukaryotische Zellen

3.4.3.1 *Transfektion durch Liposomen*

Obwohl vom Hersteller ausdrücklich beschrieben (Gibco, Invitrogen), wurde diese Transfektionstechnik nur für adhärenz Zellen verwendet. Vorversuche ergaben sodann folgendes, optimiertes Protokoll: ~ 60 % konfluente adhärenz Zellen wurden 2 h vor der eigentlichen Transfektion mit FKS- und Glutamin-freien Medium ausgehungert. Wie Vorversuche ergaben, wird hierdurch die Aufnahme von DNA erleichtert. Der Transfektionsansatz wurde wie folgt angesetzt: 10-12 µg DNA, 12,5 µl Lipofectamin und 0,6 ml Optimem[®] wurden gut gemischt und für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2,4 ml Optimem hinzugegeben und in die 10 cm Schale gegeben, aus der direkt davor das Medium abgesaugt wurde. Die Inkubation wurde ü.N. durchgeführt (≥ 14 h), die ersten 4 h wurde die Schale stündlich sanft geschwenkt, um eine gute Verteilung zu jedem Zeitpunkt sicherzustellen. Der Transfektionsansatz wurde abgesaugt, die Zellen wurden einmal kurz mit PBS-d gewaschen und anschließend für weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen, die Zellen konnten nun zur Bestimmung der Transfektionsrate im FACS gemessen werden oder für die Zellzyklus-Experimente weiter behandelt werden.

3.4.3.2 *Transfektion durch Elektroporation*

Die Transfizierung von eukaryotischen Zellen durch Elektroporation wurde hier ausschließlich für Suspensionszellen (Raji- und Namalva-Zellen) verwendet. Die Zellen werden dabei einem kurz einwirkenden, homogenen, elektrischen Feld ausgesetzt, in dem sich die Membran-Dipol-Moleküle ausrichten. Dies führt zu Störungen in der geregelten Anordnung der Membran-Moleküle und zur Bildung kleiner Poren in der Membran, durch die die zu transfizierende DNA eindiffundieren kann. Das elektrische Feld wird durch eine Kondensator-Entladung erzeugt. In manchen Fällen kann durch die Zugabe von Poly-L-Lysin die Effizienz der Transfektion erhöht werden. Das zu transfizierende Plasmid muss zu über 90% aus der "supercoiled"-Form bestehen, da die Ergebnisse sonst nicht reproduzierbar sind. Während der Abzentrifugation (10 min/500 x g) der Zellen (pro Ansatz $0,7 \times 10^7$ Zellen), wurden die Transfektionsansätze in Eppendorfgefäßen vorbereitet. 2 - 10 μ g Plasmid-DNA (Volumen $\leq 20 \mu$ l), 30 ml 175 mM ATP, pH 7,35 (titriert mit KOH) und gegebenenfalls 7 μ l 10 mM Poly-L-Lysin (durchschnittliches Molgewicht 3800; Sigma-Chemie, München) wurden vermischt. Die abzentrifugierten Zellen wurden mit EP-Puffer, der kurz zuvor auf 20 mM $MgSO_4$ eingestellt wurde, zu einer Dichte von $0,5 \times 10^7$ aufgenommen und zu jedem Transfektionsansatz 0,4 ml Zellsuspension pipettiert. Die Ansätze wurden dann in eine Elektroporations-Küvette überführt (Elektrodenabstand: 4 mm) und der Kondensatorentladung ausgesetzt (Kapazität: 1050 μ F bei 275 V; Gene Pulser, Fa Biorad). Die Halbwertszeit der Kondensatorentladung lag im Bereich von 20 – 30 ms. Die Zellen wurden anschließend in Halbmikrotiterplatten gegeben und 15 min im Brutschrank inkubiert, bevor 5 ml Medium zugesetzt wurde. Die Zellen wurden nach 1 - 2 Tagen aufgearbeitet.

EP-Puffer: 50 mM K_2HPO_4 ; 20 mM Kaliumacetat-Puffer, pH 5,2;
⇒ auf pH 7,35 durch KOH

3.4.4 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie (engl.: fluorescence activated cell sorting, Abk.: FACS) diente zum Nachweis von Oberflächenmolekülen auf eukaryotischen Zellen. Diese Nachweis- und Messmethode ermöglicht die Bestimmung des prozentualen Anteils einer einzelnen Zellpopulation zur Gesamtzellpopulation. Für die Erfassung der Zellen dienen zum einen mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte oder auto-fluoreszierende Oberflächen-Proteine. Des weiteren können die Zellen auch durch die Anfärbung der DNA detektiert werden. In dem hier durchgeführten Protokoll kann durch die Anfärbung der DNA mit Propidiumjodid die sukzessive Erhöhung des DNA-Gehaltes während des Zellzyklusses erfasst werden. Das verwendete Gerät (FACScalibur, Beckton & Dickenson) erlaubt die simultane, quantitative Erfassung von vier verschiedenen Fluoreszenzsignalen und zwei Parametern der Lichtstreuung, anhand derer direkt die Größe sowie die Granularität der Zellen beurteilt werden können.

Die Auswertung von Transfektionseffizienzen erfolgte mit dem auch für die Messung verwendete Programm Cellquest (Beckton&Dickenson). Für die Auswertung der Zellzyklus-Experimente wurde das Programm Modfit 2.0 Lt (Beckton&Dickenson) verwendet.

3.5 Zellzyklus-Experimente

3.5.1 Transfektion, Blockierung und Aliquotnahme in den Zellzyklus

Für die durchgeführten, relevanten Zellzyklus-Experimente wurden aufgrund der Fragestellung folgende Zellen verwendet: Chinese hamster ovary, K1 (CHO-K₁) sowie die Ku-defiziente Zelllinie X-Ray-Sensitive 1 (XRS1). Am Vortag ausgesäte Zellen (Konfluenz ~70 %) wurden nach der unter 3.4.3.1 aufgeführten Methode transfiziert. Der Transfektionsansatz wurde nach 18 h abgesaugt und die Zellen mit frischem Medium für weitere 24 h im Brutschrank belassen. Die Zellen wurden anschließend mit FKS- und Glutamin-freien Medium für 2 h inkubiert und mit 0,6 mM Mimosin (in

FKS- und Glutamin-freien Medium) für 18 h in der späten G₁-Phase synchronisiert. Anhand eines separaten Aliquots wurde mit Hilfe der FACS-Analyse (3.4.4) die Blockierung der Zellen in der späten G₁-Phase des Zellzyklusses überprüft. Für den Wiedereintritt in den Zellzyklus wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Wachstumsmedium (vorgewärmt) versehen. Nachdem bei allen Ansätzen das Mimosin durch Wachstumsmedium ausgetauscht worden war (1,5 - 2 h), wurde das Medium nochmals durch frisches ersetzt. Fortan wurden in definierten Zeitabständen Aliquots genommen.

3.5.2 Aufarbeitung der Eukaryotenzellen

Die Aliquots wurden geteilt, wobei ein Teil für die später folgende Immunfluoreszenz-Färbung (3.5.2.2) in -20 °C-kaltem Ethanol unter vortexen hinzu pipettiert und somit fixiert wurde. Die Lagerung dieser Proben erfolgte bei -20°C für ≥ 1 Tag. Die für den Luciferase-Assay entnommenen Zellen wurden abzentrifugiert (5 min/2500 x g) und anschließend in 200 μ l Lysispuffer suspendiert. Nach 20 min (RT) wurden die Zellen bei -80 °C (für maximal drei Tage) gelagert.

3.5.2.1 Luciferase-Assay

Die bei -80 °C-gelagerten Lysate wurden bei RT in 30 min aufgetaut und zentrifugiert (5 min/3500 x g). Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, jeweils 40 μ l des Zelllysats wurden für die Luciferase-Messung verwendet. Pro Messung wurden 100 μ l Luciferase-Substrat (Promega) injiziert. Es wurde darauf geachtet, dass die zu untersuchende Promoteraktivität respektive die gemessenen relativen Lichteinheiten (**relative light units, RLU**) einen Wert von 50000 RLU nicht überstiegen. Andernfalls wurde die Probe entsprechend verdünnt und die Verdünnung dann in der Auswertung berücksichtigt.

3.5.2.2 Immunfluoreszenz-/DNA-Doppelfärbung

Hierzu wurden die in Ethanol fixierten und bei -20 °C gelagerten Zellen (3.5.1) abzentrifugiert (10 min/750 x g/4 °C) und der Überstand sorgfältig abgesaugt. Die

perforierten Zellen wurden nun mit jeweils 1 ml DNA-Färbelösung (30 min/37 °C) gefärbt, wobei gleichzeitig ein Abbau der endogenen RNA erfolgte. Es wurde erneut zentrifugiert (10 min/750 x g/4 °C) und jeweils 5 ml kaltes PBS (+2 % FKS) hinzugegeben. Die kleinen Falconröhrchen wurden kurz geschwenkt und zentrifugiert (10 min/750 x g/4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, die restliche Lösung mit einer 200 µl-Pipette entfernt. Als zweite Färbung der Zellen wurde eine Oberflächen-Färbung über das bei allen Ansätzen kotransfizierte H-2K^K durchgeführt. Hierzu wurde zu jeder Probe 50 µl Ak-Lösung gegeben und ü.N. bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Zu den Zellen wurde dann je 5 ml kaltes PBS gegeben, kurz geschwenkt und zentrifugiert (10 min/750 x g/4 °C). Der Überstand wurde erneut abzentrifugiert, die Zellen in 200 µl kaltem PBS suspendiert und anschließend durchflußzytometrisch untersucht.

DNA-Färbelösung: 50 µg/ml Propidiumjodid; 0,1 mg/ml RNaseA; 0,1 %
0,1 % NP-40, in PBS.

Ak-Lösung: 0,1 Vol. H-2K^K-FITC (mAb) in PBS (+ 2 % FKS)

3.5.3 Analyse der Zellzyklus-Experimente

Die Analyse der gefärbten Zellen wurde mit dem Durchflußzytometer FACScan der Fa. Becton-Dickinson durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Modfit Lt 2,0 ausgewertet. Hierbei wurde der Synchronisations-Wizard zu Hilfe genommen. Die hieraus hervor gegangenen Daten wurden über das Windows-Office-Programm Excel ausgewertet und graphisch dargestellt, auch die aus den Luciferase-Messungen hervorgegangenen Werte wurden über Excel ausgewertet. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte anhand des Dualen Systems. Eine Korrektur der Luciferasewerte durch den Proteingehalt wurde aufgrund der Ungenauigkeit nicht hinzugezogen. Als Korrekturwert diente die Kotransfektion mit dem Promoter des Housekeeping-Gens Thymidinkinase (TK), dessen Aktivität als zweiter Wert im dualen System zu sehen ist.