

6 Materialien und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien und Zellkultur-Materialien

Laborchemikalien wurden von den Firmen Aldrich (Steinheim), Amersham-Biosciences (Uppsala, Schweden), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), MP (Irvine, USA), Pierce (Rockford, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen. Zellkultur-Materialien wurden von den Firmen BD Biosciences Discovery Labware (Bedford, USA), Biochrom KG (Berlin), Corning (New York), Nunc (Wiesbaden), PAA (Cölbe) und TPP (Trasadingen, Schweiz) bezogen.

6.1.2 Oligonucleotide und Peptide

6.1.2.1 Oligonucleotide (MWG Biotech, München)

Primer für die Klonierungen

(nicht-kursiv sind die Schnittstellen dargestellt)

- *Integrin $\alpha 3$ /cyto aus pCR2.1 (Klon 2.3 Diplomarbeit Markus Wenzel) für pGBKT7 mit NcoI- und EcoRI-Schnittstellen*

Sense-Primer „Integrin s+NcoI“:

CCA TGG CCA TGG GAA TTC GGC TTT GGA AGT GC

Antisense-Primer „Integrin r+EcoRI“

GAA TTC GAA TTC GGC TTA GCG GTC CT

- *DKFZp761C10121.1 aus pDNR-LIB (RZPD-Klon IRALp962H1641.1) für pGADT7 mit EcoRI- und XhoI-Schnittstellen*

Sense-Primer „DKFZiralh 9s+EcoRI“

GAA TTC GAA TTC GCA GGA CCT TTC TCT CGC TG

Antisense-Primer „DKFZiralh 1354r+XhoI“:

CTC GAG CTC GAG TGT CAA AGA TTC CCA TCT CC

- *Lanp aus pOTB7(RZPD-Klon IRALp962J1018) für pGADT7 mit BamHI- und XhoI-Schnittstellen*

Sense-Primer „lanpiralj 81s+BamHI“

GGA TCC GGA TCC TAT TGA TTG AAT TCC GCC GG

Antisense-Primer „lanpiralj 944r+XhoI“

CTC GAG CTC GAG TCG TTC CCA CAG CAA CGT TAC

- *Lanp* aus *pOTB7* (RZPD-Klon IRALp962J1018) für *pEGFP-C1* mit *XhoI* und *PstI*-Schnittstellen

Sense-Primer „lanpiraljs+XhoI“

CTC GAG CTC GAG GAG AGA TG GAG ATG GGC AGA

Antisense-Primer „lanpiraljas+PstI“

CTG CAG CTG CAG ATT CCA CTT AGT CAT CAT CT

Primer für die Sequenzierung

- *Integrin $\alpha 3$ /cyto* in *pGBKT7*

„T7 pCMC INV“ 5'IRD800: TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

- *DKFZp761C10121.1* in *pGADT7* und *Lanp* in *pGADT7*

„pACT2 sense“ 5'IRD800: CTA TTC GAT GAT GAA GAA ACC

„pACT2 revers“ 5'IRD700: GGC CAA GAT TGA AAC TTA GAG G

- *Lanp* in *pGEX-5X-2* bzw. *Lanp-Flag* in *pcDNA3*

„Primer pp32 forward“ 5'IRD800: CGA GGT AAC CAA CCT GAA CG

„Primer pp32 revers“ 5'IRD700: GAT ATG TGA GTT GCG GGA GG

Antisense-Oligonucleotide (ASO)

Lanp Oligo 1 nt 123-139 antisense: GCG TCC TGT TCC GCA GC

Lanp Oligo 2 nt 310-326 antisense: CCT GAG ATT CTG TTT TC

Lanp Oligo 3 nt 560-576 antisense: CTC AAC ATC AGA GTC AG

Lanp Oligo 4 nt 77-93 antisense: CTC TCG CGC TCT CTC TT

Lanp Oligo 5 nt 196-212 antisense: TCA TCC GTG AGG CCT TC

Lanp Oligo 6 nt 154-170 antisense: TTA TCC AGG ACC AGC TC

6.1.2.2 Peptide

Peptide für Immunisierungen (Eurogentech, Seraing, Belgien)

(Nummerierung der Aminosäuren (AS) entsprechend der Ratten-Sequenz für Lanp Swiss-Prot P49911)

Lanp Peptid P1 AS 1-15: MEMDKRIYLE LRNRT C

Lanp Peptid P2 AS 147-161: GYDRDNKEAP DSDVE C

Peptide für Bindungsstudien (Jerini, Berlin; Eurogentech, Seraing, Belgien)

(Nummerierung der AS entsprechend der Ratten-Sequenz für die α 1-Integrin-Untereinheit Swiss-Prot P18614 bzw. der Maus-Sequenz für die α 3-Integrin-Untereinheit Swiss-Prot Q62470)

α 1/cyto α -1 AS 1166-1180:	C KIGFFKRPLK KKMEK
α 1/cyto α -G AS 1166-1172:	C KIGFFKR
α 1/cyto α -3 AS 1173-1180:	C PLKKKMEK
α 3/cyto α 3-1 AS 1017-1035:	C KCGFFKRART RALYEAKRQ
α 3/cyto α 3-2 AS 1036-1053:	KAEMKSQPSE TERLTDDY
α 3/cyto α 3-A AS 1017-1028:	C KCGFFKRART RA
α 3/cyto α 3-B AS 1029-1041:	C LYEAKRQKAE MKS
α 3/cyto α 3-C AS 1042-1053:	C QPSETERLTD DY

Phosphopeptide (MWG Biotech, München)

α 3/cyto phospho-Serin pS AS 1041-1050:	SQPpSETERLT
α 3/cyto phospho-Threonin pT AS 1041-1050:	SQPSEpTERLT
Kontrollpeptid pK (Upstate Biotechnology):	KRpTIRR

6.1.3 Antikörper

Antikörper	Konzentration bzw. Verdünnung für Anwendung			Hersteller
	IB	IF	IP	
<u>Integrine</u>				
<i>Anti-α1-Integrin</i>				
Maus mAb Klon 33.4		3 μ g/ml	8 μ g	AG Reutter, Berlin
Kaninchen pAb AS2K5	1:2.000			AG Reutter, Berlin
<i>Anti-α3-Integrin</i>				
Maus mAb Klon Ralph3.2		2 μ g/ml	10 μ g	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Maus mAb Klon 42	0,5 μ g/ml			BD Biosciences Immunocytometry Systems, Bedford, USA
Kaninchen pAb α 3/cyto			5 μ l	Chemicon, Temecula, USA
<i>Anti-β1-Integrin</i>				
Kaninchen pAb AS2K4	1:2.000			AG Reutter, Berlin
Kaninchen pAb AS2K6			10 μ l	AG Reutter, Berlin
<u>Cytoskelett</u>				
Anti- β -Aktin Maus mAb Klon AC-74	0,1 μ g/ml			Sigma, München
Anti- β -Tubulin Maus mAb Klon TUB2.1	0,4 μ g/ml			Sigma, München

<u>Cytosolische Proteine</u>				
Anti-Calbindin Maus mAb Klon CB-955			22 µg/ml	Sigma, München
Anti-Calreticulin Kaninchen pAb	1:2.000			Affinity Bioreagents, Golden, USA
Anti-DRAL/FHL2 Kaninchen pAb	1:1.000			AG Aumailley, Köln
Anti-FAK Maus mAb Klon 77	0,25 µg/ml			BD Biosciences Immunocytometry Systems, Bedford, USA
Anti-JAB1 Maus mAb Klon 42	0,25 µg/ml			BD Biosciences Immunocytometry Systems, Bedford, USA
Anti-Lanp Kaninchen pAb	0,8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg	AG Isobe, Tokyo, Japan und AG Reutter, Berlin mit Eurogentec, Seraing, Belgien
Anti-Nucleolin Ziege pAb	0,4 µg/ml			Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Paxillin Maus mAb Klon 349	0,05 µg/ml			BD Biosciences Immunocytometry Systems, Bedford, USA
Anti-PLCγ Maus mAb Klon 10	1:1.000			BD Biosciences Immunocytometry Systems, Bedford, USA
<i>Anti-PP1</i>				
Maus mAb Klon 24	0,25 µg/ml			BD Biosciences Immunocytometry Systems, Bedford, USA
Maus mAb Klon E-9		4 µg/ml		Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
<i>Anti-PP2A</i>				
Maus mAb Klon 46	0,05 µg/ml			BD Biosciences Immunocytometry Systems, Bedford, USA
Kaninchen pAb		10 µg/ml	16 µg	Upstate Biotechnology, Charlottesville, USA
Anti-Pyk 2 mAb Klon 11	0,13 µg/ml			BD Biosciences Immunocytometry Systems, Bedford, USA
Anti-p85 (PI3K) Kaninchen pAb	1:10.000			AG Thelen, Bellinzona, Schweiz
<u>Fusionsanteile</u>				
<i>Anti-GFP</i>				
Maus mAb Klon JL-8	0,5 µg/ml			BD Biosciences Clontech, Bedford, USA
Kaninchen pAb			5 µl	Torrey Pines Biolabs, San Diego, USA
Anti-Flag Maus mAb Klon M2	14 µg/ml	1 µg/ml	8 µg	Sigma, München
Anti-c-Myc-Epitope Maus mAb Klon 9E10	1 µg/ml			Sigma, München
Anti-Hämagglutinin Maus mAb Klon 12CA5	5 µg/ml			Roche, Mannheim
<u>Andere</u>				
Maus-anti-Kaninchen Ig			8-10 µg	DAKO, Glostrup, Dänemark
Maus-anti-Kaninchen IgG			8-10 µg	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Kaninchen-anti-Schaf IgG			8-10 µg	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

Sekundäre Antikörper / Konjugate				
Ratte-anti-Maus IgG-Peroxidase	0,2 µg/ml			Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Peroxidase	0,2 µg/ml			Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Maus IgG-Cy2		6 µg/ml		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Maus IgG-TRITC		6 µg/ml		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Maus IgG-AlexaFluor®594		2 µg/ml		Molecular Probes, Eugene, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG-Cy2		6 µg/ml		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG-TRITC		6 µg/ml		Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG-AlexaFluor®594		2 µg/ml		Molecular Probes, Eugene, USA

6.1.4 Enzyme / Proteine, Marker und Kits

6.1.4.1 Enzyme / Proteine

Pfu-Polymerase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
DNase	Roche, Mannheim
RNase (DNase-frei)	Qiagen, Hilden
<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i> CIAP	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Trypsin (aus Rinderpankreas), sequencing grade	Roche, Mannheim
PP1 (kat. Untereinheit der PP1 α , rekombinant, aus Kaninchen-Skelettmuskel)	New England Biolabs, Beverly USA
PP2A (gereinigtes Dimer aus humanen Erythrocyten)	Upstate Biotechnology, Charlottesville, USA)

6.1.4.2 Marker

Protein-Molekulargewichtsstandards:

Proteinleiter (10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160, 220 kDa)	Gibco-BRL, Detroit, USA
Prestained Molecular Weight Marker (31, 36, 55, 61.5, 84, 116, 185)	Sigma, München
Gel Filtration Chromatography Standard 670, 158, 44, 17, 1.35 kDa	Biorad, Hercules, USA

DNA-Molekulargewichtsstandard:

1 kb-Plus-DNA-Basenpaar-Leiter

Gibco-BRL, Detroit, USA

6.1.4.3 Kits

BCA-Protein-Assay-Kit

Pierce, Rockford, USA

QIAprep[®] Minipräp-Kit

Qiagen, Hilden

QIAprep[®] Midipräp-Kit

Qiagen, Hilden

QIAquick Gelextraktions-Kit

Qiagen, Hilden

Thermo Sequenase[™] Primer Cycle Sequenzier-KitAmersham-Biosciences,
Uppsala, Schweden

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)

Roche, Mannheim

Lipofektamin[™] 2000

Invitrogen, Carlsbad, USA

Oligofektamin[™] Reagent

Invitrogen, Carlsbad, USA

Opti-MEM[®]

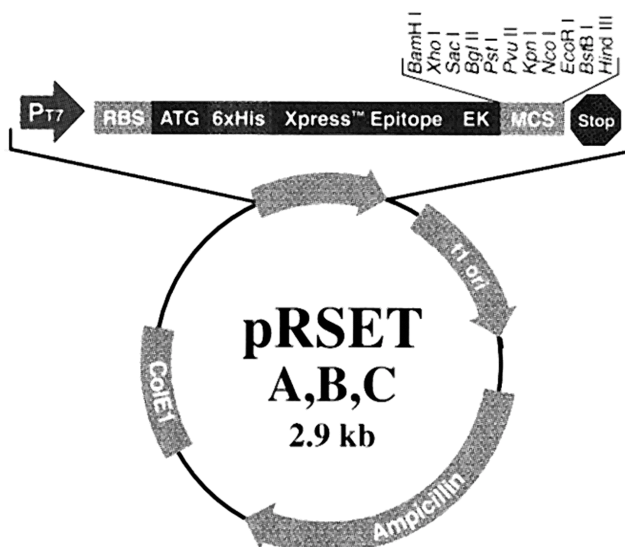
Invitrogen, Carlsbad, USA

Cell Line Nucleofektor[™] Kit V

Amaya Biosystems, Köln

6.1.5 VektorenpRSET (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Dieses Plasmid dient der Protein-Überexpression und Reinigung von klonierten Genen als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Hexahistidin-Anteil. Der Vektor ist ein pUC-Abkömmling mit einem T7-Promotor für die induzierbare Expression von Proteinen.

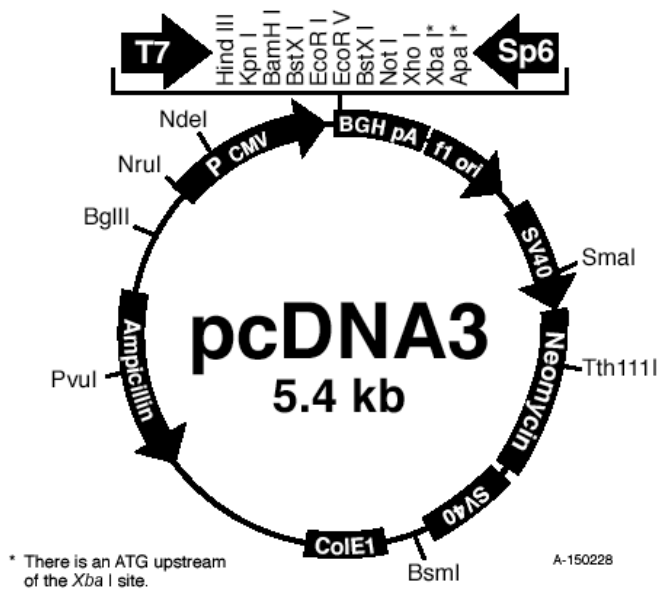
**Aufbau des Vektors pRSET**

P_{T7}: T7-Promotor, RBS: Ribosomen-Bindungssequenz, ATG: Start-Codon, 6xHis: 6 aufeinander folgende Histidin-Codons, Xpress[™]-Epitop: Sequenz für die Erkennung des translatierten Proteins durch den anti-Xpress[™]-Antikörper, EK: Enterokinase-Spaltstelle, MCS: multiple cloning site, Stop: Stopcodon, f1 ori: Replikationsstart für Einzelstrang-DNA-Synthese, ColE1: Replikationsstart in Bakterien.

Die Protein- und DNA-Sequenzen für das Fusions-Kontrollprotein und das Fusionsprotein $\alpha 3/\text{cyto}$ sind im Anhang zu finden.

pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Dieser Vektor wurde für die Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen konzipiert. Er kann sowohl für transiente als auch für stabile Transfektionen (Selektionsmarker Neomycin) verwendet werden. Er trägt den *immediate-early enhancer promoter* des humanen Cytomegalovirus und gewährleistet so die konstitutive Expression auf einem hohen Niveau in verschiedenen Säugerzellen. Der Vektor trägt hinter der *multiple cloning site* (MCS) das Polyadenylierungssignal aus dem bovinen Wachstumshormon (BGH), um die mRNA zu stabilisieren und eine effiziente Beendigung der Transkription zu gewährleisten.



Aufbau des Vektors pcDNA3

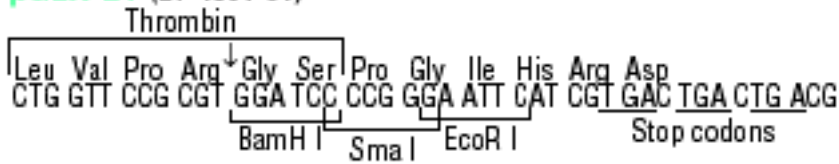
P CMV: Promoter des humanen Cytomegalovirus (CMV), T7: T7-Promoter, Sp6: Sp6-Promoter, BGH pA: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons, f1 ori: Replikationsstart für Einzelstrang-DNA-Synthese, SV40: Simian Virus 40 Promoter, Replikationsstart und Polyadenylierungssignal, ColE1: Replikationsstart in Bakterien.

PGEX-2T bzw. pGEX-5X-2 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA)

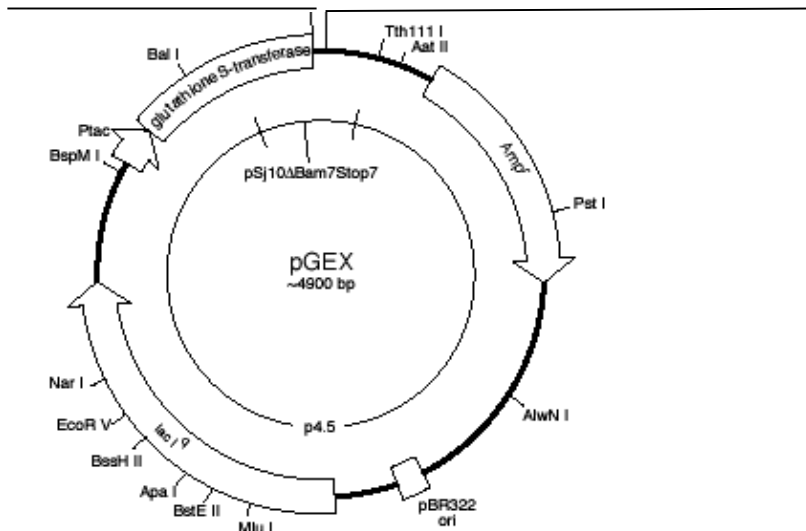
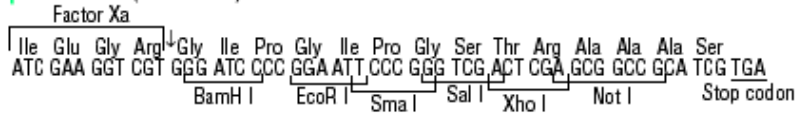
Diese Vektoren kodieren für Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum*, die in Bakterien exprimiert und anschließend über Glutathion-Sepharose gereinigt werden können. Die MCS folgt auf die kodierende Sequenz für die Glutathion-S-Transferase (GST), so daß GST den N-terminalen Bereich des Fusionsproteins ausmacht. Die kodierende Sequenz von Lanp wurde in den Vektor pGEX5X-2 kloniert. Als Negativkontrolle wurde das GST-Plasmid pGEX-2T (Amersham-Biosciences) ohne Insert verwendet, das genauso wie der Vektor pGEX-

5X-2 aufgebaut ist, jedoch statt einer Faktor Xa-Schnittstelle eine Thrombin-Schnittstelle und eine etwas anders gestaltete MCS trägt.

pGEX-2T (27-4801-01)



pGEX-5X-2 (27-4585-01)

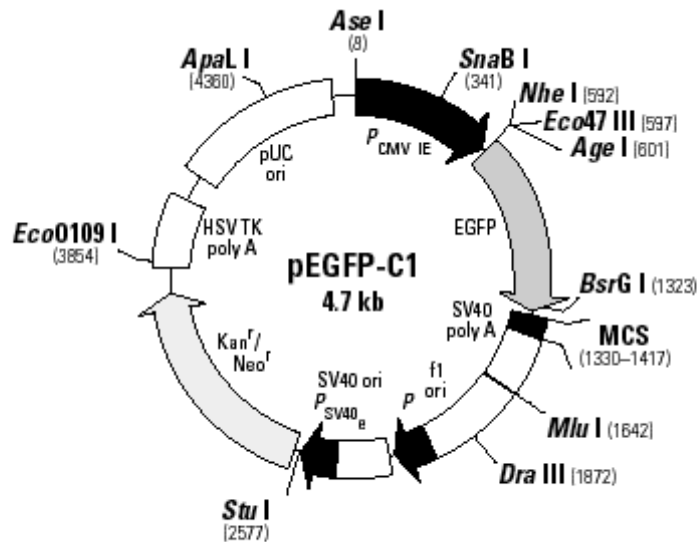


Aufbau des Vektors pGEX-5X-2

Ptac: tac Promoter für chemisch induzierbare Proteinexpression auf hohem Niveau, Factor Xa: Schnittstelle für Faktor Xa Protease, Amp^r: Gen für Ampicillin-Resistenz, pBR322 ori: Replikationsstart in Prokaryonten, lac I^q: internes lac I^q Gen für die Benutzung des Vektors in jeglichem *E.coli* Stamm.

pEGFP-C1 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA)

Dieser Vektor kodiert eine in den roten Bereich verschobene Variante des Wildtyps des *green-fluorescent protein* (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*, die auf stärkere Fluoreszenz und höhere Expression in Säugerzellen optimiert wurde. Die MCS liegt hinter der kodierenden Sequenz für GFP. Die Fusionsproteine bestehen folglich aus N-terminalem GFP und C-terminalem Fremdprotein. Die flankierenden Sequenzen der eGFP-Sequenz (*enhanced green-fluorescent protein*) wurden in die Kozak-Konsensus-Sequenz umgewandelt, um die Translationseffizienz in Eukaryonten zu steigern.



Aufbau des Vektors pEGFP-C1

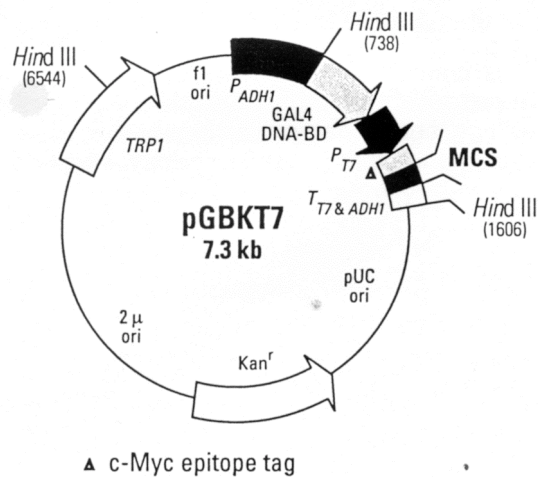
pUC ori: Replikationsstart in Prokaryonten, P CMV: Promoter des humanen Cytomegalovirus (CMV), EGFP: enhanced green-fluorescent protein, MCS: multiple cloning site, SV40 poly A: Polyadenylierungssignal aus Simian Virus 40, f1 ori: Replikationsstart für Einzelstrang-DNA-Synthese, SV40 ori: Replikationsstart aus Simian Virus 40, P SV40: Promoter aus Simian Virus 40, Kan^r/Neo^r: Kanamycin- und Neomycin-Resistenz-Gen, HSV TK poly A: Polyadenylierungssignal der Thymidinkinase des Herpes simplex Virus.

Die DNA-Sequenz des Fusionsproteins GFP-Lanp ist im Anhang zu finden.

pGBKT7 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA)

Der Vektor ermöglicht die Expression von Proteinen, die an den C-Terminus der Gal4-DNA-Bindungsdomäne fusioniert sind. In der Hefe erfolgt eine starke Expression über den konstitutiven Promoter der Alkohol-Dehydrogenase 1 (ADH1). Der Terminator von T7 und ADH1 beendet die Transkription. Der Vektor trägt außerdem einen c-Myc-Epitop-Tag sowie das Resistenzgen für Kanamycin für die Selektion in *E.coli* und den Ernährungsmarker TRP1 für die Selektion in *S.cerevisiae*.

Die DNA-Sequenz des Fusionsproteins Gal4-DNA-BD- α 3/cyto ist im Anhang zu finden.

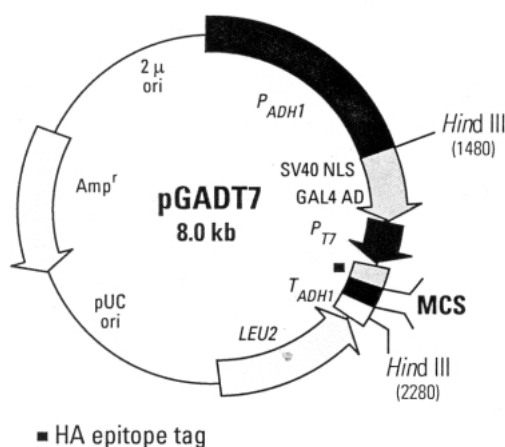


Aufbau des Vektors pGBKT7

f1 ori: Replikationsstart für Einzelstrang-DNA-Synthese, P ADH1: Promoter von ADH1, GAL4 DNA-BD: Gen für die Gal4-DNA-Bindungsdomäne, P T7: Promoter von T7, MCS: multiple cloning site, T T7&ADH1: Terminator aus T7 und ADH1, pUC ori: Replikationsstart für Bakterien, Kan^r: Gen für die Kanamycin-Resistenz, 2 μ ori: Replikationsstart für Hefen.

pGADT7 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA)

Der Vektor ermöglicht die Expression von Proteinen, die an das C-terminale Ende der Gal4-Aktivierungsdomäne fusioniert sind. In der Hefe erfolgt eine starke Expression über den konstitutiven Promoter von ADH1. Der Terminator von T7 und ADH1 beendet die Transkription. Das Fusionsprotein wird durch das angehängte Kernlokalisierungssignal aus SV40 in den Kern gebracht. Außerdem enthält das Fusionsprotein einen Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) sowie Ampicillin-Resistenz für die Selektion in *E.coli* als auch LEU2 für die Selektion über die Nahrungszusammensetzung in *S.cerevisiae*.



Aufbau des Vektors pGADT7

2 μ ori: Replikationsstart für Hefen, P ADH1: Promoter von ADH1, SV40 NLS: Kernlokalisierungssignal aus SV40, GAL4 AD: Gal4-Aktivierungsdomäne, P T7: Promoter von T7, T ADH1: Terminator aus ADH1, pUC ori: Replikationsstart für Bakterien, Amp^r: Gen für die Ampicillin-Resistenz.

Die DNA-Sequenzen der Fusionsproteine Gal4-AD-Lanp und Gal4-AD-DKFZ sind im Anhang zu finden.

6.1.6 Versuchstiere

Balb-c-Mäuse wurden zur Präparation von Hirnen zur Gewinnung von Zellen und für Gewebeschnitte eingesetzt.

6.1.7 Eukaryontenzellen

6.1.7.1 Säugerzellen

PC12 (ATCC, Rockville, USA)

Diese Zelllinie stammt aus einem transplantierbaren Pheochromocytom des Nebennierenmarks der Ratte. Die Zellen gehen nach NGF-Gabe reversibel in einen neuronalen Phänotyp über [Greene und Tischler, 1976].

RLF (ATCC, Rockville, USA)

Die Fibroblasten stammen aus der Lunge von Ratten.

HaCaT (N.E. Fusenig, Heidelberg)

Diese Zelllinie humaner Keratinocyten wurde von der Arbeitsgruppe von N.E. Fusenig [Boukamp et al., 1988] etabliert. Sie wurde aus einer histologisch normalen humanen Gewebeprobe durch spontane Mutation nach Kultivierung unter niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen und bei erhöhten Temperaturen gewonnen (*human keratinocytes kept in high calcium at low temperature*).

Cos7 (ATCC, Rockville, USA)

Diese Fibroblasten-artige Zelllinie wurde aus der Niere des Affen gewonnen und durch Transformation mit SV-40 immortalisiert.

SCC25 (ATCC, Rockville, USA)

Diese Zelllinie epithelialen Ursprungs stammt aus einem humanen squamösen Zellkarzinom.

6.1.7.2 Hefen

Cerevisiae saccharomyces AH109 (Clontech, Palo Alto, USA)

Genotyp: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

6.1.8 Prokaryontenzellen

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Genotyp: F⁻ ompT, hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm rne131 (DE3) pLysS (Cam^R).

Das konstitutiv transkribierte Gen für T7-Lysozym auf dem pLysS-Plasmid reduziert die Hintergrundexpression. Die T7-Polymerase ist in das Genom inseriert und lässt sich durch einen IPTG-sensitiven lacUV5-Promotor selektiv induzieren.

Escherichia coli One Shot® TOP10 kompetente Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Genotyp: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) end A1 nupG.

6.1.9 Geräte

Brutschrank	Heraeus 6000, Kendro Laboratory Products
Coulter Counter	Coulter Particle Counter Z1
Digitales Imaging System	LAS-1000, Fujifilm, X-Ray
ELISA-Reader	Sunrise, Tecan
Feinwaage	Adventurer, Ohaus
FACScan	BD Biosciences Immunocytometry Systems
FPLC®System	Amersham Biosciences
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200, Zeiss
Gel-/Blot-Apparaturen	Miniprotrean II, Biorad
Kühlzentrifuge	Sorvall RC-5B, Kendro Laboratory Products
Laser Scanning Mikroskop	LSM410, Zeiss
Magnetrührer	IKAMAG, Roth
Mikroskop	Diavert, Leica
PCR-Cycler	Robo-Cycler Gradient 96, Stratagene
Photometer	BioPhotometer, Eppendorf
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf
Schüttel-Inkubator	Innova 4230 Shaker, Memmert
Sterilbank	Gelaire Class 100, Gelman Instruments
Thermomixer	5436, Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge pico Heraeus, Kendro Laboratory Products
Transilluminator	MWB-Biotech
Ultraschall	Sonicator™ W-375, Heat Systems-Ultrasonics, Inc.
Ultrazentrifuge	Sorvall CombiPlus, Kendro Laboratory Products

Waage	CP622, Sartorius
Wasserbad	GFL
Zentrifuge	Laborzentrifuge 3-10, Sigma
Zentrifuge	Digifuge Heraeus, Kendro Laboratory Products

6.1.10 Sonstige Materialien

Antibiotika:

Ampicillin	Boehringer Mannh.
Chloramphenicol	Roth
Genitacin	PAA
Kanamycin	Gibco
Penicillin	PAA
Streptomycin	PAA

Aktivatoren:

PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	MP

Bestandteile der extrazellulären Matrix:

Kollagen-IV aus humaner Plazenta	Sigma
Laminin-1 aus EHS-Sarkom der Maus	Roche
Poly-L-lysin 0,1% MW 150-300 kDa	Sigma

Protease Inhibitor Cocktail <i>for general use</i>	Sigma
Nitrozellulosemembran	Schleicher&Schüll
Permanox 8-Kammer-Objektträger	Nunc

Sepharosen:

aktivierte Thiolsepharose	Amersham
anti-Rabbit IgG Agarose	Sigma
CNBr-aktivierte Sepharose	Amersham
Glutathion-Sepharose	Amersham
Gelfiltration Superdex [®] 200 HR 10/30	Amersham
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen
Protein-G-Sepharose	Amersham
Protein-A-Sepharose	Amersham

Sepharose 4B	Amersham
<u>Trypsin:</u>	
Accutase	PAA
Viralex	PAA
Quervernetzer DSS (Disuccinimidylsuberat)	Pierce
Röntgenfilme Biomax ML	Kodak
<i>Nerve growth factor</i> NGF 7S	Roche

6.2 Methoden

6.2.1 Zellbiologische Methoden für Säugerzellen

6.2.1.1 Allgemeine zellbiologische Methoden für Säugerzellen

Alle Säuger-Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C unter 5% CO₂-Begasung kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden in der sterilen Atmosphäre einer Zellkulturwerkbank durchgeführt.

Die PC12-Zellen wachsen in Suspension in Kulturflaschen. Je nach Zelldichte werden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert und 1:2 verdünnt. Dazu werden die Suspensionszellen bei 900 rpm für 3 min zentrifugiert und das Zellpellet wird in Medium aufgenommen und verdünnt in Kulturflaschen weitergezogen.

Die RLF-Zellen wachsen in einer einzelligen Schicht in Kulturschalen. Das Passagieren erfolgt bei Konfluenz der Zellen. Hierzu wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS (*phosphate-buffered saline*) mit 0,05% EDTA kurz gewaschen und anschließend in PBS/EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden dann vom Schalenboden abgelöst und in 15 ml-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 900 rpm für 3 min wird das Zellpellet mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert, in Medium aufgenommen und in Aliquots auf die neuen Kulturschalen verteilt.

Die HaCaT-Zellen wachsen als einzellige Schicht auf Plastik. Sie werden bei Konfluenz mit PBS/EDTA gewaschen und mit Viralex-Trypsin (PAA) in PBS/EDTA abgelöst. Die Zellen werden in 15 ml-Röhrchen überführt, zentrifugiert (900 rpm für 3min), mit PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert, in neuem Medium aufgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt.

Cos7-Zellen wachsen als einzellige Schicht auf Plastik. Sie lassen sich im konfluenten oder subkonfluenten Stadium mit PBS/EDTA leicht ablösen. Die Zellen werden in ein 15 ml-Röhrchen überführt, zentrifugiert (900 rpm für 3min), mit PBS gewaschen,

nochmals zentrifugiert, in neuem Medium aufgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt.

Die SCC25-Zellen wachsen adhärent auf Plastik. Die Zellen werden kurz vor dem Erreichen oder spätestens beim Erreichen des konfluenten Stadiums zur weiteren Passage mit PBS/EDTA gewaschen und mit Viralex/Trypsin (PAA) in PBS/EDTA abgelöst. Die Zellen werden in einem 15 ml-Röhrchen bei 900 rpm für 3 min abzentrifugiert, mit PBS gewaschen, in neues Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturschalen verteilt.

Nährmedien und Puffer für die Säuger-Zellkultur

Medium für PC12-Zellen:

450 ml	RPMI-Medium
50 ml	Pferdeserum
50 MU	Penicillin
50 mg	Streptomycin
220 mg	L-Glutamin

Medium für RLF-Zellen:

400 ml	RPMI-Medium
100 ml	Fötale Kälberserum
50 MU	Penicillin
50 mg	Streptomycin
220 mg	L-Glutamin

Medium für HaCaT-Zellen:

450 ml	RPMI-Medium
50 ml	Fötale Kälberserum
50 MU	Penicillin
50 mg	Streptomycin
220 mg	L-Glutamin

Medium für Cos7-Zellen:

450 ml	DMEM-Medium
50 ml	Fötale Kälberserum
50 MU	Penicillin
50 mg	Streptomycin
220 mg	L-Glutamin

<i>Medium für SCC25-Zellen:</i>	350 ml	Ham's F12:DMEM 1:1
	150 ml	Fötales Kälberserum
	200 µg	Hydrocortison
	50 MU	Penicillin
	50 mg	Streptomycin
	220 mg	L-Glutamin

PBS-Puffer

150 mM	NaCl
3 mM	KCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄
1 mM	KH ₂ PO ₄

PBS/EDTA

0,5 g	EDTA (=1,34 mM)
in 1 l PBS lösen	

mit H₂O bidest. auf 1 l, pH 7,2

mit NaCl Osmolarität auf 300 mosm
einstellen

6.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Zellpellets können in Serum (Pferdeserum oder fötales Kälberserum respektive) mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und langsam eingefroren werden. Die Zellsuspension wird in Einfrierröhrchen überführt und für einige Stunden bei -20°C gefroren, danach können sie bei -80°C oder für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Alternativ können die Einfrierröhrchen in einem Iso-propanolbad sofort bei -80°C eingefroren und für längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Gefrorene Zellpellets werden rasch bei 37°C aufgetaut und kurz vor dem vollständigen Auftauen langsam in vorgewärmtes Medium pipettiert. Durch Zentrifugieren bei 900 rpm für 3 min wird das DMSO entfernt. Das Pellet wird in Medium resuspendiert und in Flaschen bzw. Schalen kultiviert.

6.2.1.3 Generierung Laminin-5-reicher Matrix

Die SCC25-Zellen sezernieren unter anderem in verstärktem Maße Laminin-5. Platten, auf denen SCC25-Zellen kultiviert worden waren, können nach schonendem Ablösen der Zellen zur Kultivierung anderer Zellen auf Laminin-5-reicher Matrix verwendet werden. Dazu werden die SCC25-Zellen 5-7 Tage nachdem sie konfluent gewachsen

sind mit PBS/EDTA gewaschen und mit konzentrierter Accutase (besonders milde Form des Trypsins von PAA) abgelöst, was in diesem sehr dichten Zustand 30-120 min dauert. Die Zellen werden nach dieser Behandlung nicht weiter verwendet. Die Platten werden mit PBS/EDTA gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C mit sterilem H₂O bidest. inkubiert, um noch verbliebene Zellen zum Platzen zu bringen. Dann wird das Wasser abgesaugt, die Platten werden getrocknet und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.2.1.4 Gewinnung von Primärzellen aus Kleinhirngewebe

Um aus Kleinhirnen Primärzellen zu gewinnen, verwendet man am besten die Gehirne neugeborener 5-6 Tage alter Mäuse. Mäuseweibchen sind alle 3 Tage fruchtbar und tragen ihre Jungen innerhalb von 19-21 Tagen aus. Das Kleinhirn enthält zu 90-95% Körnerzellen, die sehr klein sind (Körperdurchmesser von 6-8 µm) und bipolare lange Fortsätze ausbilden.

Für die im folgenden beschriebene Präparation der Kleinhirne verwendet man 3-5 Mäuse. Die Mäuse werden dazu rasch mit einer scharfen Schere geköpft. Die Kopfhaut wird entfernt. Am Hinterkopf setzt man die Schere an der Öffnung am Wirbelkanal an und schneidet entlang der Schädeldecke einen halbkreisförmigen Schnitt von Ohr zu Ohr. Die Schädeldecke läßt sich jetzt mit dem Gehirn nach oben wegklappen. Man entfernt nun die weiche Schädeldecke und betrachtet das Gehirn von oben, mit der vorderen Hälfte zum Betrachter hin ausgerichtet. Die großen Hemisphären lassen sich gut erkennen. Dahinter liegt quer das Kleinhirn, dessen gefurchte Struktur ebenfalls gut zu erkennen ist. Man klemmt das Kleinhirn mit einer Pinzette aus den umgebenden Strukturen heraus und überführt es in 1x HBSS-Puffer. Der Rest des Gehirns wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und kann bei -80°C für Protein- oder RNA-Extraktionen aufbewahrt werden. Man sammelt die Kleinhirne in 1x HBSS-Puffer und zupft vorsichtig die Hirnhaut und andere verunreinigende Strukturen ab. Die Kleinhirne werden in 15 ml-Reaktionsgefäße überführt, mit 1x HBSS gewaschen und dann in 1 ml Trypsinlösung (0,5% in 1x HBSS) für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Trypsinlösung wird vorsichtig entfernt, es wird 3x mit 1x HBSS gewaschen und dann werden die Kleinhirne in 1 ml DNase-Lösung (0,02% in HBSS) aufgenommen. Ab diesem Moment wird unter der Sterilbank gearbeitet. Die Kleinhirne werden durch rundgeschmolzene Pasteurpipetten gezogen, ohne Schaum zu produzieren. Man verwendet dabei nach und nach Pasteurpipetten mit immer kleiner

werdenden Öffnungen. Es werden 5 ml 1x HBSS zugegeben und nochmals durch die Pasteurpipette mit der kleinsten Öffnung gezogen.

Will man alle Zellen des Kleinhirns in Kultur nehmen, kann man die so gewonnene dissoziierte Zellgruppe ohne weitere Reinigungsschritte in Kultur nehmen oder zur weiteren Reinigung noch eine Filtrierung durch ein Nylon-Netz mit 60 µm großen Poren anschließen. Die Zellen werden in 200 µl kaltem BME-Medium mit 10% Pferdeserum aufgenommen, mit einer dünn ausgezogenen rundgeschmolzenen Pasteurpipette gut vereinzelt, auf 1-2 ml Medium aufgefüllt, gezählt und auf vorbeschichteten Platten gebracht. Nach 2-3 h wechselt man das Medium und setzt X1-Medium ein.

Will man nur die Körnerzellen in Kultur nehmen, schließt sich zur Reinigung und Anreicherung dieser kleinen und dichten Zellen ein Percoll-Gradient an. Dazu mischt man 4,5 ml Percoll (Sigma) mit 0,5 ml 10x HBSS und gibt davon 4,5 ml mit 5,5 ml HBSS in ein 50 ml-Reaktionsgefäß und mischt gut. Die Zellsuspension wird vorsichtig auf diese Lösung überschichtet und das Ganze wird 15 min mit 2.700 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Körnerzellen befinden sich als Pellet am Boden des Gradienten und werden von dort mit einer rundgeschmolzenen Pasteurpipette aufgesaugt und in 5 ml kaltes 1x HBSS überführt, nochmals 5 min mit 2.000 rpm bei 4°C zentrifugiert, wieder in 5 ml HBSS aufgenommen und erneut 5 min mit 800 rpm zentrifugiert. Die Zellen werden in 200 µl kaltem BME-Medium mit 10% Pferdeserum aufgenommen, mit einer dünn ausgezogenen rundgeschmolzenen Pasteurpipette gut vereinzelt, auf 1-2 ml Medium aufgefüllt, gezählt und auf vorbeschichteten Platten ausgebracht. Nach 2-3 h wechselt man das Medium und setzt X1-Medium ein.

Nährmedien und Puffer für die Primärzellkultur aus Kleinhirn

<i>BME-Medium für Primär-</i>	450	ml	BME-Medium
<i>zellkultur:</i>	50	ml	Pferdeserum
	50	MU	Penicillin
	50	mg	Streptomycin
	220	mg	L-Glutamin

<i>X1-Medium für Primärzellkultur:</i>	500	ml	BME-Medium
	5	mg	Insulin
	15	µM	Selen
	50	mg	Transferin
	500	µl	Aprotinin
	2	µM	Thyroxin
	500	mg	BSA

<i>10x HBSS:</i>	0,4	g	KCl
	0,06	g	KH ₂ PO ₄
	8,0	g	NaCl
	0,113	g	Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O
	1,0	g	Glucose
	0,35	g	NaHCO ₃
	2,38	g	Hepes
	1,0	g	BSA
	ad 100	ml	H ₂ O bidest.

6.2.1.5 NGF-induzierte Differenzierung von PC12-Zellen

Die Differenzierung erfolgt in Zellkulturschalen bzw. auf Objektträgern variabler Grundfläche, die mit Kollagen-IV oder Laminin-1 (je 20 µg/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet wurden bzw. die Laminin-5-reiche Matrix tragen. Pro cm² werden 5x 10⁴ Zellen in Medium ausgesät. Den Zellen wird 250 ng/ml bzw. 100 ng/ml NGF zugegeben. Die Differenzierung erfolgt in einem Zeitraum von 72 h. Bereits nach 24 h sind deutlich Neuritenansätze zu sehen und nach 48 h sind die Neuriten bereits deutlich ausgeprägt.

6.2.1.6 Quantifizierung der Neuritenlängen differenzierter PC12-Zellen

Die mit NGF differenzierten Zellen werden nach 72 h Differenzierung mit PBS vorsichtig gewaschen und anschließend mit 1% Glutardialdehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert. Es wird 3x sanft mit PBS gewaschen und dann mit 0,1% Kristallviolett (in H₂O, filtriert) für 25 min bei RT gefärbt. Überschüssige Farbe wird vorsichtig, aber

gründlich mit Wasser gewaschen. Die Zellen werden an der Luft getrocknet und können wie im folgenden beschrieben ausgewertet werden.

Transfizierte Zellen werden durch indirekte Immunfluoreszenz (6.2.1.8) gefärbt und anschließend quantifiziert.

Es wurden Bilder mit dem 10x Objektiv und 1,6x Nachvergrößerung aufgenommen, ausgedruckt und die Neuriten auf Folie abgezeichnet sowie die Zellzahl notiert. Die Folien wurden mit 150 dpi eingescannt und der Pixelwert pro Zelle bestimmt.

Lösungen für die Färbung von Zellen

Fixierungslösung: 1% Glutardialdehyd
in PBS

Kristallviolett-Färbelösung: 0,1% Kristallviolett
in H₂O bidest., filtrieren

6.2.1.7 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Die 96-Well-Mikrotiterplatten werden mit je 100 ng Peptid bzw. Protein in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C beschichtet. Die unspezifischen Bindungen werden mit 1% BSA (bovines Serumalbumin) in PBS für mindestens 30 min bei RT abgesättigt. Die so vorbehandelte Mikrotiterplatte wird für 2 h bei RT mit den Seren in verschiedenen Verdünnungen inkubiert, anschließend 3x mit PBS gewaschen. Darauf folgt eine weitere Inkubation für 2 h bei 37°C mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper, z.B. Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, der 1:1000 mit PBS verdünnt wurde. Die Entwicklung erfolgt mit dem Substratpuffer, der 1 mg/ml ABTS (*2,2'-Azino-bis-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt crystals*) enthält. Nach 10-30 min wird die Farbentwicklung im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen.

Lösungen für den ELISA

Beschichtungspuffer: 0,2 M Natriumcarbonat, pH 9,4 -9,7

Substratpuffer: 1 mg/ml ABTS
0,05 M NaH₂PO₄
0,03% H₂O₂
pH 4,2 (mit CH₃COOH einstellen)

6.2.1.8 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Lokalisation zellulärer Proteine kann durch die indirekte Immunfluoreszenz untersucht werden. Dazu werden Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine

eingesetzt. Diese Antikörper werden dann von sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert und so sichtbar gemacht.

Es werden Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm oder Objektträger, die mit Kammern zur Kultivierung von Zellen versehen sind, mit Kollagen-IV bzw. Laminin-1 (je 20 µg/ml in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die beschichteten Schalen/Objektträger werden 1x mit PBS gewaschen, anschließend werden pro cm² 5x10⁴ PC12-Zellen, 10⁴ RLF bzw. 2,5x10⁴ HaCaT in Medium ausplattiert. Die PC12-Zellen konnten mit NGF (250 ng/ml) 72 h differenzieren. Die RLF und HaCaT konnten 90 min adhären. Nach der Inkubation im Brutschrank werden die Schalen/-Objektträger 3x mit PBS gewaschen, mit Paraformaldehyd fixiert (10 min, RT). Zur Färbung intrazellulärer Proteine werden die Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert (10 min, RT). Nach 3x Waschen mit PBS werden die unspezifischen Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS abgesättigt. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgt über Nacht bei 4°C. Anschließend werden die Proben 3x mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Inkubation mit Fluoreszenz-gekoppelten Reagenzien erfolgt im Dunkeln. Nach 2x Waschen mit PBS werden die Schälchen/Objektträger getrocknet und die Zellen werden mit Elvanol unter Objektgläschen eingedeckt. Die Ergebnisse wurden am Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) bzw. am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM410 von Zeiss) als Tiff-Dateien dokumentiert.

Die Färbung von Gewebeschnitten erfolgt nach denselben Prinzipien mit leichten Abweichungen im Protokoll:

Die 6 µm dicken Schnitte wurden auf Poly-L-lysin-beschichteten Glasobjektträgern aufgebracht und sind bereits mit 4% PFA während bzw. nach der Organentnahme fixiert worden. Die Gewebeschnitte auf Objektträgern werden bei -80°C gelagert. Die Schnitte werden aufgetaut, gut getrocknet (am besten unter dem Luftfluß einer Sterilbank), für 15 min mit 0,3% Triton X-100 in PBS permeabilisiert und mit 1% BSA für 15 min blockiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgt über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Gewebeschnitte sind auf den Objektträgern mit einem wasserabweisenden Stift umrandet, so daß sich Flüssigkeitstropfen auf den Schnitten halten können. Anschließend wird 3x je 10 min mit viel PBS gewaschen. Der Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper wird für 2h bei RT auf den Schnitten inkubiert. Man wäscht wiederum 3x je 10 min mit viel PBS und läßt die Objektträger trocknen. Es wird mit Elvanol dünn unter Deckgläschen eingedeckelt. Die Ergebnisse

wurden am Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) bzw. am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM410 von Zeiss) als Tiff-Dateien dokumentiert.

Lösungen für Immunfluoreszenzanalysen

Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd

Permeabilisierungslösung: 0,1% Triton X-100 bzw. 0,3% Triton X-100 für Gewebeschnitte

Blockierlösung: 1% BSA

Elvanol: 3 g Polyviol

in 40 ml PBS lösen und 16 h rühren lassen

15 ml Glycerin zugeben und weitere 16 h rühren lassen, 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren, Überstand zur Weiterverwendung dekantieren

1 mg Phenylendiamin / ml Gesamtvolumen zugeben und lichtgeschützt lösen, pH auf 8 einstellen, 250 µl Mercaptoethanol zugeben und lösen, Ansatz aliquotieren und bei -20°C aufbewahren

6.2.1.9 Durchflußzytometrie/FACS (*fluorescence-activated cell scanning*)

Bei der Durchflußzytometrie müssen die vereinzelt Zellen nacheinander eine Meßzelle passieren, in der sie von einem Laser angestrahlt werden. Über die von der Zelle verursachte Streuung des Lichtes erhält man Auskünfte über die Größe sowie Granularität der Zelle. Die Zellen können außerdem mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt werden, so daß man weitere Informationen über Zellart und Zustand der Zelle erhalten kann. Das FACS-Gerät von BD Biosciences Immunocytometry Systems verfügt über einen Argon-Laser, der eine Anregungswellenlänge von 488 nm generiert. Es stehen drei verschiedene Emissionskanäle zur Verfügung, so daß bis zu drei verschiedene Fluorochrome eingesetzt werden können, wenn ihre Anregung im Bereich von 488 nm und ihre Emission in nicht überlappenden Bereichen liegt (z.B. Fluorescein-Isothiocyanat FITC und Tetramethylrhodamine-Isothiocyanat TRITC bzw. Phycoerythrin PE). Über die Inkorporation von Propidiumiodid (PI), das in Nucleinsäuren interkaliert, kann das Zellzyklus-Stadium bestimmt werden, in dem sich die Zelle momentan befindet, auch tote Zellen, Zelltrümmer und -aggregate können so erfaßt werden.

Für die FACS-Analyse werden pro Ansatz 10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen müssen in PBS/EDTA gut vereinzelt werden.

Für die Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern empfiehlt es sich, die Zellen mit 4% PFA zu fixieren. Die Zellen werden mit dem primären Antikörper (1,25-1,5 μg) für 45 min auf Eis inkubiert, 2x mit PBS gewaschen und anschließend mit dem sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper für 45 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Zellen werden 4x mit PBS gewaschen und mittels des Lysis II-Programms am FACScan (BD Becton Dickinson) analysiert. Als Negativkontrolle dienen Zellen, die nur mit dem sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper inkubiert wurden.

Für die Färbung mit PI werden die Zellen nach der Vereinzelnung mit PBS/EDTA in 1 ml 70%igem Ethanol resuspendiert und über Nacht bei -20°C gelagert (alternativ auch 1 h bei RT oder 2 h bei 4°C). Die Zellen können in Ethanol bei -20°C bis zu zwei Wochen gelagert werden. Durch das Ethanol werden die Zellen sowohl permeabilisiert als auch fixiert. Zu dieser Zell-Ethanol-Mischung (1 ml) werden 14 ml PBS gegeben und sanft gemischt. Die Zellen werden abzentrifugiert und in 400-600 μl PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Vor der Färbung mit PI können die Zellen wahlweise für 30 min bei RT mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase (DNase frei) in PBS mit 0,1% Triton X-100 inkubiert werden, um Hintergrundsignale durch Färbung der RNA zu vermeiden. Die Messung am FACS-Gerät erfolgt sofort im Anschluß. Für die Zellzyklus-Studien sollten jeweils unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und entsprechend behandelte Zellen (z.B. Zellen, die durch Serumentzug in den G_1 -Arrest getrieben wurden) als Positivkontrolle eingesetzt werden.

Grundsätzlich werden alle Zentrifugationsschritte mit Zellen nach der Fixierung und Permeabilisierung bei 1.200 rpm für 5 min durchgeführt, da sie sich im allgemeinen schlechter pelletieren lassen als native Zellen.

Lösungen für die Durchflußzytometrie

PBS/EDTA 2-2,5 mM EDTA in PBS

6.2.1.10 Adhäsionsassay

Die Fähigkeit von Zellen, auf Matrixproteinen zu adhären, kann im Adhäsionsassay getestet werden. Die absolute Zellzahl der eingesetzten Zellen wird durch die unspezifische Adhäsion auf Poly-L-lysin festgestellt. Die Zahl der adhären Zellen wird nach der Färbung der Zellen photometrisch im ELISA-Reader bestimmt.

Es werden 96-Well-Mikrotiterplatten (TPP) über Nacht bei 4°C mit je 20 µg/ml Laminin-1, Kollagen-IV bzw. Poly-L-lysin in PBS beschichtet. Die Platten werden 1x mit PBS gewaschen und mit 1% BSA für 4 h bei 4°C blockiert. Nach 3x Waschen mit PBS werden pro Well in 100 µl serumfreiem Medium 5×10^4 PC12-Zellen ausplattiert. Die Zellen werden zuvor bereits 30 min ohne Serum unter Zellkulturbedingungen gehalten. Die Adhäsion erfolgt für 2 h unter Zellkulturbedingungen. Anschließend wird die Platte vorsichtig ausgeschlagen und mit PBS gewaschen. Die adhärenen Zellen werden für 10 min bei RT mit 1% Glutardialdehyd in PBS fixiert, 3x mit PBS gewaschen und dann mit 0,1% Kristallviolett für 25 min bei RT gefärbt. Die Farbe wird aus der Platte geschlagen und die Platte wird gründlich mit H₂O bidest. gewaschen. Die Platte wird getrocknet. Die gefärbten Zellen werden mit 0,5% Triton X-100 in H₂O bidest. lysiert. Die OD₅₇₀ (Optische Dichte bei 570 nm) wird nach ca. 1h bestimmt. Pro Versuchsansatz werden für jeden Wert mindestens vier Wells zur Auswertung herangezogen, aus denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt werden.

6.2.1.11 Proliferationsassay

Zur Bestimmung des Proliferationsverhaltens von Zellen wurde der kolorimetrische BrdU-Cell-Proliferation-ELISA von Roche eingesetzt, der auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) beruht. Die Zellen werden bis zu 24 h mit 10 µM BrdU unter Zellkulturbedingungen inkubiert (Markierung der Zellen) und nach Fixieren und Lysieren der Zellen wird das eingebaute BrdU über einen Peroxidase-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper detektiert und quantifiziert.

Der Assay wird in 96-Well-Mikrotiterplatten (PAA) durchgeführt, die über Nacht bei 4°C mit 20 µg/ml Matrixproteinen beschichtet werden. Pro Well werden 5×10^3 PC12-Zellen in 100 µl Medium mit Serum und bei Bedarf Inhibitoren eingesetzt. 24 h vor Ende der Inkubationszeit wird BrdU (Endkonzentration 10 µM) zugegeben. Die Platten werden nach Beendigung der Inkubation ausgeschlagen und mit 200 µl/Well FixDenat für 30 min bei RT fixiert. Die Lösung wird wieder ausgeschlagen, 100 µl/Well Anti-BrdU-Peroxidase (10 µl/ml) werden zugegeben und für 90 min bei RT inkubiert. Die Platte wird ausgeschlagen, 3x mit 100 µl/Well 1x Waschpuffer (10x washing buffer 1:10 mit H₂O bidest. verdünnt) gewaschen und 15 min bei RT mit 100 µl/Well Substratlösung (Tetramethylbenzidin) inkubiert. Anschließend wird die Platte bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen.

Pro Versuchsansatz werden für jeden Wert mindestens vier Wells zur Auswertung herangezogen, aus denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt werden. Als Negativkontrollen werden Wells ohne Zellen mitgeführt sowie Wells mit Zellen, denen kein BrdU zugesetzt wurde.

Lösungen für den Proliferationsassay

Bestandteile des Kits „Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ von Roche:

<i>BrdU labeling reagent 1000x:</i>	10 mM 5-Brom-2'-desoxyuridin in PBS, pH 7,4, steril
<i>FixDenat:</i>	Fixierungs- und Denaturierungslösung
<i>Anti-BrdU-POD:</i>	Maus mAb anti-BrdU Peroxidase-gekoppelt
<i>Antibody dilution solution:</i>	Verdünnungslösung für den Antikörper, wahlweise kann auch H ₂ O bidest. verwendet werden
<i>Washing buffer 10x:</i>	10x PBS
<i>Substrate solution:</i>	TMB Tetramethyl-benzidine

6.2.1.12 Transfektion von Säugierzellen mit Plasmid-DNA bzw. mit DNA Oligonucleotiden

Transfektion mittels Lipofektion

Für die stabile (mit Selektionsdruck) bzw. transiente (ohne Selektionsdruck) Transfektion von Säugierzellen mit Plasmid-DNA kann mithilfe von positiv geladenen polykationischen Lipiden die Komplexierung und Aufnahme der negativ geladenen DNA in die Zellen erleichtert werden. Es wurde Lipofektamin™2000 Reagent sowie das für die Lipofektion optimierte Medium Opti-MEM® von Invitrogen verwendet. Das Lipofektamin-Reagenz enthält zwei positiv geladene Komponenten: DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate), ein polykationisches Lipid und DOPE (dioleoyl phosphatidylethanolamine), ein Phospholipid. Beide Reagenzien zusammen umhüllen die Plasmid-DNA und ermöglichen über ihre hydrophoben Anteile die Fusion mit der Zellmembran.

Für die Einschleusung von Oligonucleotiden wurde das Oligofektamin™ Reagent von Invitrogen eingesetzt, welches für die Applikation von kurzen Oligonucleotiden optimiert wurde, aber grundsätzlich nach denselben Prinzipien wie Lipofektamin funktioniert.

Für die Lipofektion mit Lipofektamin ist es wichtig, daß die Zellen am Vortag der Transfektion bereits in Medium ohne Antibiotika gehalten werden und daß die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion in hoher Zelldichte (90-95%) adhären vorliegen. Die PC12-Zellen ($3-4 \times 10^6$) werden am Vortag der Transfektion ohne Antibiotika auf Kollagen-IV-beschichteten Schälchen mit 3,5 cm Durchmesser kultiviert. Für die Transfektion werden 2,5 µg DNA mit 100 µl Opti-MEM sowie 15 µl Lipofektamin mit 100 µl Opti-MEM gemischt. Die beiden Mischungen werden vereinigt, leicht geschüttelt und 15-45 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden mit serumhaltigem Medium gewaschen. Das DNA-Lipofektamin-Gemisch wird mit 0,8 ml serumhaltigem Medium versetzt, gut gemischt und auf die gewaschenen Zellen gegeben. Nach 16 h wird das Medium gewechselt werden und die Zellen können für weitere Assays eingesetzt bzw. replattiert werden.

Für die Transfektion der Zellen mit Oligofektamin werden die Zellen weniger dicht ausplattiert werden. Das Medium darf kein Antibiotikum enthalten. Es werden am Vortag der Transfektion 1×10^6 Zellen auf Kollagen-IV-beschichteten Schalen mit 6 cm Durchmesser ausplattiert. Es werden 20 µl (0,4 nmol) des Oligonucleotids mit 350 µl Opti-MEM sowie 6 µl Oligofektamin mit 24 µl Opti-MEM gemischt. Die beiden Mischungen werden zusammengeführt und 15-20 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden 1x mit Opti-MEM gewaschen und 1,6 ml Opti-MEM werden pro Schale vorgelegt. Die Oligonucleotid-Oligofektamin-Mischung wird zu den Zellen gegeben und diese werden für 4 h unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der 4 h wird Medium mit 3x Menge an Serum zugegeben. Die Zellen werden weiter inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und analysiert.

Transfektion mittels Nucleofektion

Für schwer transfizierbare Zellen, wie in Suspension wachsende Tumorzellen und Primärzellen, wurde die Nucleofektor™-Technologie (Amaxa Biosystems) eingesetzt. Diese Methode kombiniert die elektrischen Parameter der Elektroporation mit optimierten Pufferlösungen, die den Transport der DNA direkt in den Zellkern ermöglichen sollen.

Die Zellen müssen vor der Transfektion nicht unter gesonderten Bedingungen gehalten werden. Die Cos7-Zellen sollten jedoch am Tag vor der Transfektion passagiert werden. Für die Transfektion setzt man RPMI- statt des sonst zur Kultivierung verwendeten DMEM-Mediums ein. Die Zellen werden suspendiert, einzelt (für PC12-Zellen empfiehlt sich die Behandlung mit Viralex-Trypsin (PAA) in

PBS/EDTA für 10 min) und zentrifugiert sie mit 90 (PC12) bzw. 200 (Cos7) g ab, um erneute Aggregation zu vermeiden. Für einen Transfektionsansatz können maximal 2×10^6 (PC12) bzw. 1×10^6 (Cos7) Zellen eingesetzt werden. Diese Zellzahl wird in 100 μ l des optimierten Transfektionspuffers (Nucleofektor™ Solution V) aufgenommen, dem bereits 2-3 μ g der DNA zugefügt wurden. Die Mischung wird sofort luftblasenfrei in die Küvette überführt, in das Nucleofektor-Gerät gestellt und mit dem entsprechenden Programm (U-29 für PC12, A-24 für Cos7) elektroporiert. Nach dem Elektropuls werden die Zellen sofort in 500 μ l vorgewärmtes Medium überführt und in insgesamt 2 ml Medium kultiviert. PC12-Zellen sollten zunächst zur Regeneration einen Tag in Suspension gehalten werden, bevor sie für Assays ausplattiert werden.

6.2.2 Zellbiologische Methoden für Hefezellen

6.2.2.1 Allgemeine zellbiologische Methoden für die Kultivierung von Hefezellen

Die Zellen wachsen entweder auf Agar-Platten bei 30°C oder in Flüssigmedium bei 30°C unter Schütteln (230-270 rpm). Die Hefen verdoppeln sich im Schnitt alle 3-5 h. Um über Nacht Flüssigkulturen anzuziehen, sollte man nur frische (nicht älter als 2 Monate) Kolonien von Agar-Platten verwenden. Man verwendet eine große (2-3 mm Durchmesser) Kolonie für 5 ml Medium. Es ist wichtig, die Ansätze sehr gut zu mischen, um die Zellen wirklich zu vereinzeln. Nach Inkubation für 16-18 h bei 30°C und 230-270 rpm erreichen die Zellen gewöhnlich die stationäre Phase ($OD_{600} > 1,5$). Um Zellen in der Wachstumsphase zu erhalten, transferiert man so viel einer Übernachtkultur, daß man als Ausgang eine $OD_{600} = 0,2-0,3$ erhält und inkubiert diese für 3-5 h unter Schütteln (230-250 rpm) bei 30°C. So erreicht man meist eine OD_{600} von 0,4-0,6.

Nährmedien für die Hefekultur

<i>YPDA-Medium:</i>	20	g	Pepton
	10	g	Hefeextrakt
	20	g	Glucose
	0,03	g	Adenin
	ad 1	l	H ₂ O bidest.

Pepton und Hefeextrakt werden in nicht ganz 1 l H₂O bidest. angesetzt und autoklaviert. Glucose und Adenin werden aus sterilen Stammlösungen dem autoklavierten Grund-Medium zugesetzt.

YPDA-Platten: wie Medium mit 20 g Agar

<i>Selektions-Medium:</i>	13,4 g	Hefe-Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
	10 g	Hefeextrakt
	20 g	Glucose
	100 ml	10x Aminosäuren-Supplement
	ad 1 l	H ₂ O bidest.

Die Nitrogen Base wird mit nicht ganz 1 l H₂O bidest. angesetzt und autoklaviert. Von Glucose und Aminosäuren werden aus sterilen Stammlösungen dem autoklavierten Grund-Medium zugesetzt.

10x Aminosäuren-Supplement

Das 10-fach konzentrierte Aminosäuren-Supplement enthält alle außer einer oder mehrerer der folgenden Komponenten (Beispiel: Das Trp/Leu-Supplement enthält alle der unten aufgeführten Komponenten außer Tryptophan und Leucin.) Die Aminosäuren-Supplemente können autoklaviert und bis zu 1 Jahr bei 4°C aufbewahrt werden. Serin, Aspartat und Glutamat sind in dem Aminosäuren-Supplement nicht enthalten, da sie das Medium zu sauer machen würden. Die Hefen sind in der Lage, diese Aminosäuren selbst zu synthetisieren.

L-Isoleucin	300 mg/ml
L-Valin	1500 mg/ml
L-Adenin Hemisulfat	200 mg/ml
L-Arginin HCl	200 mg/ml
L-Histidin HCl Monohydrat	200 mg/ml
L-Leucin	1000 mg/ml
L-Lysin HCl	300 mg/ml
L-Methionin	200 mg/ml
L-Phenylalanin	500 mg/ml
L-Threonin	2000 mg/ml
L-Tryptophan	200 mg/ml
L-Tyrosin	300 mg/ml
L-Uracil	200 mg/ml

Selektions-Platten: wie Medium mit 20 g Agar

Der Agar sollte nicht zusammen mit der Nitrogen Base autoklaviert werden. Am besten macht man zwei getrennte Ansätze zu je knapp einem halben Liter, man autoklaviert den Agar und gibt die Nitrogen-Base-Lösung, Glucose und Aminosäuren sterilfiltriert dazu, da sonst einzelne Bestandteile ausfallen.

6.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Hefezellen

Hefezellen können über Jahre als 25% Glycerin-Stocks bei -80°C gelagert werden. Dazu pickt man eine Kolonie von einer Agar-Platte und überführt diese in 200-500 μl des entsprechenden Mediums (transfizierte Hefen sollten immer unter Selektionsdruck gehalten werden). Man mischt die Zellen intensiv, um die Zellaggregate aufzulösen, gibt steriles 50%iges Glycerin dazu, bis eine Endkonzentration von 25% Glycerin erreicht wird. Die Mischung muß gut durchmischt und dann eingefroren werden.

Aus den gefrorenen Glycerin-Stocks streicht man einen Teil auf einer Agar-Platte aus. Innerhalb von 3-5 Tagen sollten sich Kolonien bilden, die einen Durchmesser von ca. 2 mm haben. Diese Kolonien dienen während der nächsten 2 Monate als Arbeitsmaterial. Danach sollten wieder neue Kolonien aus einem Glycerin-Stock gezogen werden. Die Glycerin-Stocks können mehrere Male aufgetaut und wieder eingefroren werden. Sollten die Zellen auf der Platte nicht wachsen, empfiehlt es sich, den Glycerin-Stock komplett aufzutauen, gut zu mischen und daraus auszustreichen, da die Zellen eventuell auf den Boden des Einfrierröhrchens abgesunken sind.

6.2.2.3 Transformation von Hefen mit Plasmid-DNA

Die Transformation wurde nach der Lithium-Acetat-Methode durchgeführt. Die Transformation von Hefen mit mehreren Plasmiden kann entweder parallel oder sequentiell durchgeführt werden. Die Transfektionseffizienz sinkt bei der parallelen Cotransformation von 10^5 auf 10^4 Zellen pro μg DNA. Daher wurden die Cotransformationen nacheinander durchgeführt. Prinzipiell ist jedoch auch die parallele Transfektion möglich und weniger arbeitsaufwendig.

Für die Transformation ergeben frische Kolonien (1-3 Wochen alt) die besten Ergebnisse. Pro Transformation werden mehrere große Kolonien (2-3 mm Durchmesser) in 1 ml Medium gut resuspendiert (5 min intensiv mischen!). Man überführt diese Zellsuspension in 50 ml des entsprechenden Mediums und inkubiert die Zellen für 16-18 h bei 30°C und 250 rpm. 30 ml oder mehr dieser Übernachtskultur werden in 300 ml YPDA-Medium überführt, bis eine OD_{600} von 0,2-0,3 erreicht ist. Man inkubiert

für weitere 3 h bei 30°C und 230 rpm. Die OD₆₀₀ sollte zwischen 0,4 und 0,6 liegen. Die Zellen werden in einem 50 ml-Röhrchen bei 1.000 g für 5 min bei RT abzentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird gründlich in sterilem TE-Puffer (Tris/EDTA) oder in H₂O bidest. aufgenommen. Man sammelt die resuspendierten Zellen in einem Röhrchen (Endvolumen 25-50 ml) und zentrifugiert nochmals bei 1.000 g für 5 min bei RT. Der Überstand wird wiederum verworfen und das Zellpellet wird in 1 ml frisch angesetztem MIX 1 resuspendiert.

In einem neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäß legt man 1 µg Plasmid-DNA und 0,05 mg Herings-Sperma-DNA vor. Darauf pipettiert man 40 µl der Zellen in MIX 1, gibt weitere 230 µl von MIX 2 dazu und mischt das Ganze vorsichtig. Diese Mischung inkubiert man 30 min bei 30°C und 200 rpm. Man gibt 30 µl DMSO dazu und mischt ganz vorsichtig. Bei 42°C werden die Zellen für 7 min einem Hitzeschock unterzogen und anschließend für 1-2 min auf Eis gestellt. Man zentrifugiert die Zellen für 5 sec bei 13.000 rpm bei RT, nimmt das Zellpellet in 0,2 ml 1x TE auf, plattiert alles auf den entsprechenden Selektionsplatten aus und inkubiert diese kopfüber bei 30°C.

Werden mehrere Plasmide gleichzeitig transformiert, gibt man von jedem Plasmid 1 µg Plasmid-DNA zusammen mit der Träger-DNA in den Reaktionsansatz.

Die Transformationseffizienz wird folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{cfu}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{\text{cfu} * \text{Volumen der Gesamtsuspension } (\mu\text{l})}{\text{ausplattiertes Volumen } (\mu\text{l}) * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Menge der eingesetzten DNA } (\mu\text{g})}$$

cfu = colony-forming unit

Lösungen für die Transfektion von Hefen

<i>MIX 1:</i>	0,1 M LiAc 0,5x TE (Tris/EDTA) 1 M Sorbitol
<i>MIX 2:</i>	0,1 M LiAc 1x TE (Tris/EDTA) 40% Polyethylenglykol
<i>10x TE:</i>	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 10 mM EDTA

6.2.3 Mikrobiologische Methoden für Bakterienzellen

6.2.3.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden für die Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht von *E.coli*-Stämmen erfolgt in SOB-Medium bzw. LB-Medium unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika. Die Kulturen werden bei 37°C auf Festmedium oder bei 37°C in Schüttelkulturen mit 220 rpm inkubiert. Bei Flüssigkulturen sollte beachtet werden, daß die Bakterien in ihren Kultivierungsgefäßen mindestens 2/3 Gasraum über der Flüssigkeit haben sollten, um eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff während der Inkubationszeit zu gewährleisten.

Nährmedien für die Bakterienkultur

<i>SOB-Medium:</i>	20	g	Pepton
	5	g	Hefeextrakt
	0,5	g	NaCl
	0,4	g	MgCl ₂
	186	mg	KCl
	ad 1	l	H ₂ O bidest.

SOB-Agar: wie Medium mit 15 g Agar

<i>SOC-Medium:</i>	20	g	Pepton
	5	g	Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	10	mM	MgCl ₂
	10	mM	MgSO ₄
	2,5	mM	KCl
	20	mM	Glucose
	ad 1	l	H ₂ O bidest.

<i>LB-Medium:</i>	10	g	Pepton
	5	g	Hefeextrakt
	10	g	NaCl
	ad 1	l	H ₂ O bidest.

LB-Agar: wie Medium mit 15 g Agar

6.2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Bakterien

Bakterienkulturen können über mehrere Monate bei -80°C gelagert werden. Hierzu wurden Übernachtskulturen mit 20% sterilem Glycerin (v/v) versetzt, gut gemischt und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Das Glycerin dient als "Frostschutzmittel".

Die Glycerin-Stocks sollten nicht aufgetaut und wieder eingefroren werden. Man kann von den gefrorenen Glycerin-Stocks mit einer Impföse etwas abkratzen und auf Agarplatten ausstreichen. Die Kulturen auf Agarplatten lassen sich bis zu 6 Wochen bei 4°C aufbewahren. Von den gewachsenen Kolonien der Platte kann man immer wieder neue Flüssigkulturen ziehen. Auch Flüssigkulturen sind einige Wochen bei 4°C lagerbar.

6.2.3.3 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA [Sambrook et al., 1989]

Die Transformation erfolgt nach dem Hitzeschock-Prinzip. Kompetente Zellen (kompetente OneShot[®]TOP10- oder BL21-Zellen von Invitrogen) werden langsam auf Eis aufgetaut. 5 μl eines Ligationsansatzes bzw. 0,1 μg der Plasmid-DNA wird zu den aufgetauten Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wird für 30 min auf Eis inkubiert, 30 sec bei 42°C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. 250 μl SOC-Medium werden zugegeben und die Zellen werden 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 20-200 μl werden auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C kopfüber inkubiert. Der Rest kann bei 4°C aufbewahrt und später noch ausplattiert werden.

6.2.3.4 Expression rekombinanter Fusionsproteine in *E. coli*

Sämtliche Überexpressionsexperimente wurden mit dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pLysS durchgeführt. Dieser Stamm enthält ein Gen für die T7-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors. Das Plasmid pLys enthält zusätzlich ein konstitutiv schwach exprimiertes Gen für T7 Lysozym, welches die Hintergrundexpression durch Inhibition der T7-Polymerase verringert. Durch Zugabe des Galactosids IPTG zum Medium wird die Expression der T7-Polymerase durch den lacUV5-Promotor induziert, die anschließend die Inserts in pRSET C bzw. pRSET A sowie in pGEX-5X-2 bzw. pGEX-2T in Abhängigkeit des T7-Promotors transkribiert. Es wird aus einer 2-4 ml Übernachtskultur eine größere Kultur (25-30 ml) angeimpft. Die Kultivierung erfolgt unter Einsatz von Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Chloramphenicol (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in SOB- bzw. LB-Medium für poly-His-Tag- und GST-Fusionsproteine respektive.

Fusionsproteine mit poly-His-Tag

Die Überexpression von rekombinanten Proteinen erfolgte nach dem Benutzerhandbuch des Herstellers des Expressionsvektors pRSET (Invitrogen). Zunächst wurde eine Pilotexpression in kleinem Maßstab (25 ml-Kultur) durchgeführt, um die optimalen Bedingungen für die Expression und die weitere Aufarbeitung des überexprimierten Proteins zu bestimmen.

Für die Proteinexpression in größerem Maßstab wurden die optimalen Bedingungen und Zeiten der Pilotexpression auf eine größere Menge Zellen übertragen. Für die Expression wurden Ansätze von 2-4 l gewählt. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,5-0,6 wurde mit dem Galactosid IPTG (Endkonzentration: 1mM) die Expression der Fusionsproteine induziert. Für das Kontroll-Fusionsprotein wurden die Zellen 2,5 h nach der Induktion bei 4°C gelagert und sukzessive abzentrifugiert (6.000 rpm für 8 min bei 4°C). Die Pellets wurden in 12 ml nativem Lysis- und Bindungspuffer pro 1 l Kultur resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Für das Fusionsprotein $\alpha 3/\text{cyto}$ wurden die Zellen 3 h nach der Induktion bei 4°C gelagert und nach und nach abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 14 ml denaturierendem Lysispuffer resuspendiert, 30 min langsam gerührt und anschließend bei -20°C eingefroren.

Lösungen

Nativer Lysis- und Bindungspuffer

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
500 mM NaCl, pH 7,8

Denaturierender Lysispuffer

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
500 mM NaCl
6 M Guanidinium•HCl, pH 7,8

Fusionsproteine mit GST-Anteil

Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde immer kurz vor der Verwendung der Fusionsproteine im *pull down* durchgeführt, da das GST-Lanp-Fusionsprotein nicht stabil ist und auch bei Lagerung bei -80°C innerhalb kurzer Zeit abgebaut wird. Deshalb wurden nur kleine Mengen (30 ml-Kulturen) zur Expression angesetzt. Die Kultur wird bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,6 unter Schütteln bei 37°C kultiviert, dann erfolgt die Induktion der Expression mit 0,1 mM IPTG und Inkubation für weitere 4 h bzw. auch über Nacht bei 30°C unter Schütteln. Die Zellen werden abzentrifugiert (6.000 rpm für 8 min bei 4°C), in Waschpuffer 1 gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 3 ml Lysispuffer resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und möglichst sofort für den Zellaufschluß weiterverarbeitet.

Lösungen

Waschpuffer 1

50 mM Tris-HCl, pH 8
200 mM NaCl
1 mM EDTA

Lysispuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8
200 mM NaCl
1 mM EDTA
5 mM DTT (Dithiothreitol)
1 mM PMSF (Phenylmethyl sulfonylfluorid)
Proteaseinhibitor-Cocktail 1:500

6.2.4 Molekularbiologische Methoden

6.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Menge und Reinheit der DNA bzw. RNA abzuschätzen, kann man die Absorption der DNA-bzw. RNA-haltigen bei 260 bzw. 280 nm messen. Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum für DNA/RNA, bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} läßt sich somit auch ein Rückschluß auf die Reinheit der DNA/RNA ziehen. Werte unter 1,8 zeigen an, daß die Probe zu viele Proteine enthält, Werte über 2,0 weisen erfahrungsgemäß darauf hin, daß die Probe wahrscheinlich viel RNA bzw. DNA als Verunreinigung enthält. Über den Extinktionskoeffizienten für DNA bzw. RNA in wäßriger Lösung läßt sich über das Lambert-Beer-Gesetz die Konzentration der DNA/RNA ermitteln.

Eine weitere Möglichkeit, Reinheit und Menge abzuschätzen ist die Analyse nach elektrophoretischer Trennung im Gel (6.2.4.2). Der Auftrag bekannter DNA-Mengen als Standard ermöglicht die Quantifizierung der Probe. RNA und genomische DNA können im Agarosegel gut zugeordnet werden.

6.2.4.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Elektrophoresen wurden zur Größenbestimmung nach Plasmidisolierung benutzt. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines linearen DNA-Nucleinsäurefragmentes ist umgekehrt proportional zum Logarithmus seines Molekulargewichtes. Die DNA kann nach der Elektrophorese mittels Interkalation von Ethidiumbromid unter ultraviolettem Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich mit Standard-Größenmarkern kann die Größe bestimmt werden.

Die Auftrennung erfolgte hauptsächlich in 1%igen Agarosegelen. Die Agarose wird in TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA) durch Kochen gelöst und nach Abkühlen auf 50°C in entsprechende Gelschlitten gegossen. Nach Erstarren der Agarose wird das Gel in die mit 1xTAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben werden mit Probenpuffer versetzt, in die Taschen gefüllt und bei 75 V bis zur gewünschten Laufstrecke aufgetrennt. Nach 10-minütiger Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml) kann die DNA unter ultraviolettem Licht (366 nm) visualisiert und fotografiert werden.

Lösungen für Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

<i>TAE-Puffer:</i>	0,04	M	Tris-HCl, pH 8,5
	0,1	%	Essigsäure
	2	mM	EDTA
<i>Agarosegele:</i>	1	%	Agarose in TAE-Puffer
<i>5x Probenpuffer:</i>	60	%	Glycerin
	60	mM	EDTA
	0,025	%	Bromphenolblau (läuft bei ca. 300 bp)
	0,025	%	Xylencyanol (läuft bei ca. 1.000 bp)

6.2.4.3 Elution aus dem Gel

DNA-haltige Banden können aus Agarose-Gelen geschnitten und die DNA daraus eluiert werden. Dazu wurde das QIAquick Gelextraktions-Kit von Qiagen verwendet. Die Agarose-Gel-Stücke werden in 3 Gel-Volumen Puffer QG aufgenommen und innerhalb von 10 min bei 50°C geschmolzen. Es wird 1 Gel-Volumen Isopropanol zugegeben und die Mischung wird auf Säulen gegeben, die eine Silicagel-Membran enthalten, an welche die DNA bindet, während Verunreinigungen wie Primer, Salze, Nucleotide, Enzyme, Agarose, Ethidiumbromid, Detergenzien und Öle nicht gebunden werden. Diese Säulen eignen sich somit auch zur Reinigung von PCR-Produkten (*polymerase chain reaction*). Die Säulen werden mit Ethanol-haltigem Puffer PE gewaschen. Die Elution erfolgt mit dem basischen Puffer EB, der wenig Salz enthält oder mit sterilem H₂O bidest..

6.2.4.4 Plasmid-Schnell-Präparation [Birnboim und Doly, 1979]

Von einer *E.coli*-Übernachtskultur werden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 200 µl Minilysatlösung I

resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Das in dieser Lösung enthaltene Lysozym verdaut die bakterielle Zellwand, das EDTA entzieht den Membranproteinen zur Stabilisierung notwendige zweiwertige Kationen. Anschließend werden 200 µl Minilysatlösung II vorsichtig zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Das SDS in der Lösung solubilisiert Phospholipide und Membranproteine der Bakterienplasmamembran, NaOH denaturiert die genomische und Plasmid-DNA. Wichtig ist eine langsame Zugabe der Lösung, da die genomische DNA in Bruchstücke zerfallen kann. Nach Zugabe von 200 µl der vorgekühlten, neutralisierenden Minilysatlösung III folgt eine 30-minütige Inkubation im Eisbad. Durch die hohe Salzkonzentration dieser Lösung werden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt, während die Plasmid-DNA gelöst bleibt. Eine anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert die zellulären Proteine und die chromosomale DNA. Der Plasmid-haltige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, nochmals 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und wiederum in ein neues Gefäß überführt. Mit 1 ml 2-Propanol wird die Plasmid-DNA während einer 5-minütigen Inkubation bei RT gefällt. Die DNA wird durch 15-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm pelletiert. Das DNA-Pellet wird mehrmals mit 1 ml unvergälltem 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die trockene Plasmid-DNA wird in 50 µl sterilem H₂O bidest. gelöst und bei -20°C aufbewahrt. Die Ausbeute betrug ca. 6-7 µg DNA/ml Bakterienkultur.

Lösungen für die Plasmid-Schnell-Präparation

Minilysatlösung I (Puffer P1):

50	mM	Tris-HCl, pH 8
10	mM	EDTA
100	µg/ml	RNase A
2	mg/ml	Lysozym

Minilysatlösung II (Puffer P2):

0,2	M	NaOH
1	%	SDS (w/v)

Minilysatlösung III (Puffer P3):

3	M	Natriumacetat, pH 5,5
---	---	-----------------------

6.2.4.5 Plasmid-Präparation im Midi- bzw. Maxi-Maßstab und Reinigung durch Anionen-Austauscher-Säulen

Für die Präparation größerer Mengen an DNA kann man die als Minipräparation bezeichnete Plasmid-Schnell-Präparation in entsprechend größerem Maßstab nach demselben Prinzip und mit denselben Reagenzien durchführen. Für besonders saubere DNA (z.B. für die Transfektion von Säugerzellen) empfiehlt sich die Nutzung von Säulen zur chromatographischen Reinigung der gewonnenen Plasmid-DNA. Die Säulen bestehen aus dem Anionen-Austauscher DEAE (Diethylaminoethanol) an Silica-Kügelchen. DNA bindet an DEAE bei niedriger Salzkonzentration. Verunreinigungen wie RNA, Proteine, Kohlenhydrate und kleine Metabolite werden mit etwas höheren Salzkonzentrationen gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt bei hohen Salzkonzentrationen. Es wurde das Plasmid Midi- bzw. Maxi-Kit von Qiagen verwendet.

25 bzw. 100 ml-Übernachtskultur (Angaben für *high-copy plasmids*) werden für 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 4 bzw. 10 ml Puffer P1 resuspendiert. 4 bzw. 10 ml von Puffer P2 werden vorsichtig zugegeben, 5x langsam gekippt und 5 min bei RT inkubiert. 4 bzw. 10 ml von eisgekühltem Puffer P3 werden zugegeben, gut gemischt und 15 bzw. 20 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wird bei 20.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird nochmals bei 20.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Qiagen-tip 100 bzw. 500 Säulen werden mit 4 bzw. 10 ml QBT-Puffer äquilibriert. Der plasmidhaltige Überstand wird auf die Säule gegeben. Nachdem die Flüssigkeit durch die Säule gelaufen ist, wird die Säule 2x mit 10 bzw. 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die DNA wird mit 5 bzw. 15 ml QF-Puffer eluiert. Es werden 3,5 bzw. 10,5 ml Isopropanol zugegeben, gut gemischt und sofort bei 15.000 g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und verworfen. Das DNA-Pellet wird mit 2 bzw. 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und dann in 200 bzw. 500 µl sterilem H₂O bidest. aufgenommen.

Lösungen für die Plasmid-Midi- und Maxipräparation

Bestandteile des Kits „QIAprep[®] Midiprep-Kit“ von Qiagen:

<i>QBT-Puffer (Äquilibrierungspuffer):</i>	0,75 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7
	15 %	Isopropanol (v/v)
	0,15 %	Triton X-100 (v/v)

<i>QC-Puffer (Waschpuffer):</i>	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7
	15	%	Isopropanol (v/v)
<i>QF-Puffer (Elutionspuffer):</i>	1,25	M	NaCl
	50	mM	Tris-HCl, pH 8,5
	15	%	Isopropanol (v/v)

6.2.4.6 Fällung von DNA

DNA läßt sich sowohl mit Isopropanol (2-Propanol) als auch mit absolutem Ethanol fällen.

Fällung mit Isopropanol: Die DNA-Lösung wird mit 0,7-1 Volumen abs. Isopropanol versetzt, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 15-30 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird mit 0,5-1 ml 70% EtOH gewaschen und nochmals 15-30 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Dann wird das Pellet getrocknet und in sterilem H₂O bidest. aufgenommen.

Fällung mit Ethanol: Die DNA-Lösung wird mit 1/10 Volumen 3 M NaAc und 2,5 Volumen abs. EtOH versetzt, wobei nach jedem Pipettiervorgang gemischt wird. Die Fällung erfolgt entweder 1 min in flüssigem Stickstoff, 1 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C. Danach wird bei 13.000 rpm bei 4°C für 15-30 min zentrifugiert, das DNA-Pellet in 0,5-1 ml 70% EtOH gewaschen und nochmals 15-30 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugiert. Dann wird das Pellet getrocknet und in sterilem H₂O bidest. aufgenommen.

6.2.4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1985]

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die exponentielle Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente (bis zu 20.000 nt lang) in vitro. Dazu benötigt man Oligonucleotide (Primer), welche die zu amplifizierende Sequenz 5' und 3' flankieren. Der 5' gelegene Primer muß in sense-Orientierung vorliegen, der 3' gelegene in Antisense-Orientierung, d.h. revers komplementär zu der codierenden Sequenz. Die Primer sollten 18-22 nt lang sein und einen GC-Anteil von ca. 50% und unter 60% aufweisen. Die Primerpaare sollten in ihren Schmelztemperaturen möglichst nicht stark voneinander abweichen. Außerdem benötigt man thermostabile DNA-Polymerase, welche die Denaturierung doppelsträngiger DNA zu Einzelstrang-DNA ohne große Aktivitätsverluste wiederholte Male übersteht. Die DNA wird zunächst denaturiert (94°C), dann wird die

Temperatur gesenkt und die Primer können ihre Bindungsstellen finden (*annealing temperature*). Im nächsten Schritt verwendet die DNA-Polymerase bei ihrer optimalen Arbeitstemperatur (*elongation temperature*) die 3'-Hydroxyl-Enden der Primer, um an ihnen in 5'-3'-Richtung Nucleotide entsprechend der Paarung mit dem Matrizenstrang anzuhängen. So verdoppelt sich in jedem Zyklus die Anzahl der doppelsträngigen DNA. Nach 22 Zyklen erhält man so 2^{22} Moleküle des amplifizierten DNA-Abschnitts.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit der Pfu-DNA-Polymerase aus dem hyperthermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* durchgeführt. Die Polymerase katalysiert den Einbau von Nucleotiden in doppelsträngige DNA in der 5'-3'-Richtung in der Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen bei 70-80°C, außerdem besitzt sie 3'-5'-Exonuclease-Aktivität (*proofreading*), jedoch keine detektierbare 5'-3'-Exonuclease-Aktivität. Diese Polymerase hat gegenüber der sonst gebräuchlichen Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* den Vorteil, daß sie eine um ca. eine Zehnerpotenz geringere Fehlerrate aufweist. Die mit der Pfu-DNA-Polymerase erzeugten PCR-Produkte besitzen glatte Enden.

Standardmäßig wurden für einen 50 µl-Reaktionsansatz 1,25 U der Pfu-DNA-Polymerase, 10-100 ng der Ausgangs-DNA (cDNA/*copy DNA* oder Plasmid-DNA), je 15 pmol der Primer (0,3 µM), 0,2 mM dNTP-Mix sowie der 10x PCR-Puffer und steriles H₂O bidest. eingesetzt. Die PCR fand im Robo-Cycler Gradient 96 von Stratagene statt. Nach 3-minütiger Denaturierung bei 94°C wurden 25-30 Zyklen folgender Art durchgeführt: 94°C für 15 sec, 60°C (bzw. Werte, die ca. 5°C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer liegen) für 30 sec, 72°C für 2 min. Anschließend wurde nochmals bei 72°C für 10 min inkubiert, um der DNA-Polymerase zu erlauben, die begonnene Synthese zu beenden und so eine möglichst große Einheitlichkeit der PCR-Produkte zu erreichen.

Lösungen für die Polymerase-Ketten-Reaktion

<i>10x PCR-Puffer:</i>	200 mM	Tris-HCl, pH 8,8
	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	100 mM	KCl
	1 %	Triton X-100
	1 mg/ml	BSA
	20 mM	MgSO ₄

6.2.4.8 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen [Brooks, 1987; Smith und Wilcox, 1970]

Bakterien, Phagen, Archaeobakterien und Viren eukaryontischer Algen besitzen als Schutzmechanismus gegen Eindringlinge ein Markierungs- und Restriktionssystem, das die eigene DNA durch Methylierung schützt und fremde DNA, die ein anderes Methylierungsmuster trägt, erkennt und schneidet. Die Enzyme Methylase und Restriktionsendonuclease sind vielfältig und werden standardmäßig als Werkzeuge in der Molekularbiologie eingesetzt. Die meist verwendeten Restriktionsendonucleasen der Klasse II sind gewöhnlich Homodimere, benötigen nur Mg^{2+} und erkennen spezifische Sequenzen, innerhalb derer sie schneiden. Sie hinterlassen ein 5'-Phosphat- und ein 3'-Hydroxyl-Ende. Diese Enzyme erkennen palindromische Nucleotide von 4-8 bp, unterbrochene Palindrome oder auch mehrdeutige Palindrome. Die meisten DNA-Sequenzen werden von mehreren Enzymen erkannt und geschnitten. Je nach Lage der Schnittstelle, produzieren die Restriktionsendonucleasen überhängende oder glatte Enden.

Jedes Enzym hat seine bevorzugten Reaktionsbedingungen, daher kann kein allgemeiner Reaktionspuffer für die Spaltreaktion eingesetzt werden. Die meisten Restriktionsenzyme sind bei 37°C optimal aktiv, andere benötigen jedoch höhere Temperaturen. Die Reaktion sollte durch Hitze gestoppt werden. Die meisten Enzyme werden durch Inkubation bei 65°C für 20 min inaktiviert, manche benötigen etwas höhere Temperaturen.

Für die Restriktionsansätze wurden 1-50 µg DNA mit 0,1-1 U des Restriktionsenzym in entsprechendem Puffer in insgesamt 30 µl Volumen angesetzt und für 1 h bzw. über Nacht bei 37°C oder entsprechenden anderen Temperaturen inkubiert. Der Restriktionsverdau wird anschließend durch DNA-Gelelektrophorese analysiert und die Fragmente werden durch Elution aus präparativen Gelen gereinigt.

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

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden oder glatten Enden mithilfe einer Ligase wird als Ligation bezeichnet. Die T4-DNA-Ligase stammt aus dem T4-Bakteriophagen. Sie katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden in doppelsträngiger DNA oder RNA. Der Einsatz von Polyethylenglycol erhöht die Effizienz bei der Ligation von glatten Enden enorm (empfohlene Endkonzentration 5% w/v). Die Inaktivierung der

Ligase bei 65°C für 10 min nach erfolgter Reaktion vor der Transformation der Zellen wird als Standardmethode empfohlen und erhöht die Transformationseffizienz beträchtlich.

Für die Ligation von kleinen DNA-Fragmenten in größere linearisierte Plasmide setzt man das kleinere Fragment in mindestens 3-fachem molarem Überschuß zum Plasmid ein. Erfolgt die Linearisierung des Plasmids mit nur einem Restriktionsenzym, müssen die entstandenen Enden vor der Ligation dephosphoryliert werden, um eine Religation des Vektors zu verhindern (siehe 6.2.4.10). Die Ligation erfolgt unter Einsatz der T4-DNA-Ligase (Fermentas) bei vorzugsweise 4°C über Nacht. Der Ansatz besteht gewöhnlich aus 2 µl T4-DNA-Ligase (10 U), 2 µl 10x Ligationspuffer, 100 ng Plasmid und dem 3-fachen molaren Überschuß an Insert, aufgefüllt auf 20 µl mit sterilem H₂O bidest.. Der gesamte Ligationsansatz wird für die Transformation von kompetenten Zellen eingesetzt.

Lösungen für die DNA-Ligation

10x Ligationspuffer:	400 mM	Tris-HCl, pH 7,8
	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	DTT
	5 mM	ATP (Adenosintriphosphat)

6.2.4.10 Dephosphorylierung von DNA

Die Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine alkaline phosphatase* CIAP) katalysiert die Hydrolyse von 5'-Phosphat-Enden von DNA, RNA sowie von Ribo- bzw. Deoxyribonucleosid-Triphosphaten. Man setzt 1 U der CIAP für die Dephosphorylierung von 1-20 DNA-Enden in insgesamt 50 µl Reaktionsvolumen für 30 min bei 37°C an. Die Reaktion kann direkt nach Restriktionsreaktionen durchgeführt werden, sollte jedoch nach der Reaktion durch Inaktivierung des Enzyms bei 85°C für 15 min gestoppt werden.

Lösungen für die Dephosphorylierung von DNA

10x Reaktionspuffer:	0,1 M	Tris-HCl, pH 7,5
	0,1 mM	MgCl ₂

6.2.4.11 Sequenzierung von DNA [Sanger et al., 1992]

Die Sequenzierung der isolierten Plasmide erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger et. al, 1992. Die Primer sind mit Infrarotfluoreszenzfarbstoffen (IRD700

bzw. IRD800) markiert. Die zu sequenzierende DNA dient als Matrize für die Polymerisation eines fluoreszenzmarkierten komplementären Stranges. Es werden vier verschiedene Ansätze gemacht, wobei jeder Ansatz neben den dNTPs (Desoxynucleosidtriphosphat) je eine Sorte von ddNTPs (Didesoxynucleosidtriphosphat) im Unterschuß enthält, die zu einem Abbruch der Polymerisationsreaktion führen. Je ein Aliquot der Reaktionsansätze wurde nach der Polymerase-Ketten-Reaktion in einem 6%igen Polyacrylamidgel getrennt und in einer automatischen Sequenziervorrichtung (Licor 4000 L, MWG-Biotech, München) analysiert.

6.2.5 Proteinchemische Methoden

6.2.5.1 Solubilisierung von Säugerzellen

Zellpellets werden mit Triton X-100 Solubilisierungspuffer, Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500) und PMSF (1 mM) versetzt und für 1 h bei 4°C kräftig geschüttelt. Das im Puffer enthaltene Detergenz solubilisiert dabei die Zellmembranen. Anschließend wird für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand stellt das Solubilisat dar, im Pellet befinden sich Bestandteile des Zytoskeletts und der Zellkerne.

6.2.5.2 Cytosolpräparation von Säugerzellen

Zur Präparation cytosolischer Proteine werden die Zellpellets in 2x Volumen (bezogen auf das Ausgangsvolumen der Zellpellets) hypoosmolarem Puffer (mit 1 mM PMSF und Proteaseinhibitor-Cocktail 1:500) resuspendiert und mit einer Insulinspritze (0,7 mm Durchmesser) lysiert. Diese Behandlung bringt die Zellen zum Platzen. Die Membrantrümmer und unlöslichen Bestandteile werden durch Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 1 h bei 4°C abzentrifugiert.

Lösungen für die Aufarbeitung von Proteinen aus Säugerzellen

<i>Triton X-100 Solubilisierungspuffer</i>			<i>Hypoosmolarer Puffer</i>		
1	%	Triton X-100 (= 16 mM) nicht-ionisches Detergenz	10	mM	Na ₂ HPO ₄ pH 7 (mit HCl einstellen)
150	mM	NaCl			
1	mM	CaCl ₂			
1	mM	MgCl ₂			
50	mM	Hepes, pH 7,5			

6.2.5.3 Solubilisierung von Hefezellen

Um die Expression der Fusionsprotein in der Hefe zu überprüfen, ist das Aufbrechen und Solubilisieren der Hefen notwendig. Die verwendeten Hefen sollten nicht älter als 4 d sein. Man macht eine 5 ml-Übernachtkultur des zu untersuchenden Hefestamms, mischt intensiv und weitet sie auf 50 ml aus. Die Kultur wird weiter bei 30°C, 230-250 rpm inkubiert, bis die OD₆₀₀ 0,4-0,6 erreicht. Man multipliziert das Kulturvolumen mit der OD₆₀₀ und erhält so die OD₆₀₀-Einheiten, die für spätere Schritte wichtig sind. Man überführt die Kultur dann rasch in ein vorgekühltes Zentrifugen-Röhrchen und zentrifugiert in der vorgekühlten Zentrifuge bei 1.000 g für 5 min bei 4°C. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 50 ml eiskaltem H₂O resuspendiert. Man erhält wiederum ein Pellet nach Zentrifugation bei 1.000 g für 5 min bei 4°C. Dieses Zellpellet wird in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert, bis mit der Proteinextraktion fortgefahren wird.

Proteinextraktion mit Trichloressigsäure (TCA-Methode):

Das Zellpellet wird auf Eis aufgetaut. Jedes Zellpellet wird in 100 µl eiskaltem TCA-Puffer pro 7,5 OD₆₀₀-Einheiten aufgenommen. Man transferiert die Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß, das 100 µl Glaskügelchen (425-600 µm, Sigma) und 100 µl eiskalte 20%ige TCA pro 7,5 OD₆₀₀-Einheiten enthält. Dann mischt man diese Lösung intensiv für 10 min bei 4°C bei höchster Geschwindigkeit des Mixers. Der Überstand über den sedimentierten Glaskügelchen wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dies ist der erste Zellextrakt.

Die im vorigen Gefäß verbliebenen Glaskügelchen werden mit 500 µl einer eiskalten 1:1-Mischung aus 20%iger TCA und TCA-Puffer gewaschen. Die Lösung wird für weitere 5 min bei 4°C intensiv gemischt. Dann wird der Überstand über den Glaskügelchen mit dem ersten Zellextrakt vereinigt. Die Proteine in dem gesammelten Zellextrakt werden bei 14.000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und verworfen. Weitere Flüssigkeit wird durch wiederholte kurze Zentrifugation gesammelt und entfernt. Das Proteinpellet wird in 10 µl SDS-Probenpuffer pro OD₆₀₀-Einheit resuspendiert und für 5 min gekocht. Der pH-Wert der Proben wird durch Titration mit NaOH neutralisiert. Die Proben können bei -80°C gelagert werden, bis sie gelelektrophoretisch getrennt und im Immunoblot analysiert werden.

Lösungen für die Proteinextraktion aus Hefen

TCA-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 8
 50 mM Ammoniumacetat

2 mM EDTA
50 µl/ml Proteaseinhibitoren
1 mM PMSF

6.2.5.4 Proteinbestimmung

BCA-Methode [Smith et al., 1985]

Für die Durchführung der Proteinbestimmung wurde der BCA-Test-Kit der Firma Pierce verwendet. Der Kit enthält die Lösung A (BCA) und Lösung B (4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ . Die Bichinin-4-carbonsäure (BCA) reagiert mit Cu^+ , wobei zwei Bichinonsäure-Moleküle einen intensiv purpur gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu^+ -Ion eingehen.

Die Proben werden in 96-Well-Mikrotiterplatten mit je 200 µl der Reaktionslösung, die aus 50 Teilen Lösung A und einem Teil der Lösung B zusammengesetzt wird, versetzt. Nach Inkubation für ca. 45 min bei RT wird die Extinktion bei 570 nm im ELISA-Reader gemessen. Aus BSA-Proben bekannter Konzentrationen kann eine Eichreihe erstellt werden, anhand derer die Konzentration der unbekanntes Probe bestimmt werden kann.

Bradford-Methode [Bradford, 1976]

Bei Lösungen ohne Detergenz wurde die Proteinbestimmung auch nach der Methode von Bradford durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Tatsache, daß sich das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliant-Blue G 250 von 465 nm nach 595 nm verschiebt, wenn es in saurer Lösung an Proteine (hauptsächlich über Arginin-Reste) bindet. Diese Bestimmung ist schnell durchführbar. 100 µl einer Proteinprobe werden mit 900 µl Bradford-Reagenz gemischt. Die Lösung wird innerhalb von 15 min photometrisch bei 595 nm gemessen. Zur Proteinbestimmung dient auch hier eine Proteineichreihe, die mit verschiedenen BSA-Konzentrationen erstellt wird.

Lösungen für die Proteinbestimmung

Bradford-Reagenz-Lösung: 100 mg Coomassie-Brilliant-Blue
 50 ml Ethanol
 100 ml H_3PO_4 konz.
 ad 1 l H_2O
(Lösung vor Gebrauch filtrieren)

6.2.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) [Laemmli, 1970]

Für die vertikale Elektrophorese von Proteinen wurde das Mini-Protean-System II der Firma Biorad verwendet. Grundsätzlich kamen diskontinuierliche Gelsysteme mit Trenn- und Sammelgel zum Einsatz.

Die Lösungen werden gemischt und nacheinander, d.h. Sammelgellösung erst nach Polymerisation des Trenngels, zwischen die zusammengebauten Glasplatten gegossen.

Die SDS-PAGE wird unter denaturierenden und reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Proben werden im Verhältnis 5:1 mit 5-fach konzentriertem Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C gekocht.

Die Elektrophorese erfolgte zum Einlaufen der Proben ins Sammelgel bei konstanter Spannung von 120 V und zur Auftrennung im Trenngel bei konstanter Spannung von 170-200 V.

Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen

Lösung A

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

Lösung B

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

Lösung C

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

10x Laufpuffer

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

*kein HCl zum Titrieren einsetzen

X%ige Trenngellösung

X/30*9 ml Lösung A
2,25 ml Lösung B
9-(LsgA+LsgB) ml H₂O bidest.
45 µl APS (10%)
4,5 µl TEMED

4%ige Sammelgellösung

0,4 ml Lösung A
0,75 ml Lösung C
1,85 ml H₂O bidest.
12 µl APS (10%)
3 µl TEMED

5x Probenpuffer nicht reduzierend

12,5	%	SDS (w/v)
0,3	M	Tris-HCl, pH 6,8
50	%	Glycerin (v/v)
0,015	%	Bromphenolblau (w/v)

5x Probenpuffer reduzierend

Wie nicht reduzierender Probenpuffer mit Zusatz von entweder 25% 2-Mercapto-propandiol oder 50 mM Dithiothreitol.

6.2.5.6 Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese [Schagger und von Jagow, 1987]

Mit Hilfe des Tris-Tricin-Systems können Proteine in einem Molekularbereich von 1-100 kDa in einem Gellauf analysiert werden. Durch das Glycerin im Trenngelpuffer ist es möglich, das Sammelgel sofort nach dem Einfüllen des Trenngels einzufüllen und beide Gele zusammen polymerisieren zu lassen. Die Trennung erfolgt während des Einlaufens der Proben ins Sammelgel bei 60-90 V und im Trenngel bei 130-160 V.

Lösungen für Tricin-Gelsysteme

Anoden-Puffer: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9

(+, unten)

Kathoden-Puffer: 0,1 M Tricin

(-, oben) 0,1 % SDS

0,1 M Tris-HCl, pH 8,3

Gel-Puffer: 0,3 % SDS

3,0 M Tris-HCl, pH 8,45

Acrylamid-Bisacrylamid- 48 % (w/v) Acrylamid, 1,5 % (w/v) Bisacrylamid,

Stammlösung: (49,5 % T, 3 % C)

Ansatz für 4 Minigele :

	Trenngel (10 % T, 3 % C)		Sammelgel (4 % T, 3 % C)	
Acryl/Bisacryl-	3,1	ml	1,0	ml
Stammlösung				
Gel-Puffer	5,0	ml	3,1	ml
Glycerin	1,5	ml	--	
H ₂ O bidest.	ad 15	ml	ad 12,5	ml
APS 10%	75	µl	100	µl
TEMED	7,5	µl	10	µl

6.2.5.7 Färbung von Gelen

Coomassie-Blau-Färbung

Proteine lassen sich im Gel mit Coomassie-Blau G250 (*Coomassie brilliant blue CBB*) färben. Die Empfindlichkeit der Färbung ist nur mäßig: die untere Detektionsgröße liegt bei 200-400 ng pro Bande. Unterschiede bei der Anfärbbarkeit verschiedener Proteine treten wie für die Silberfärbung weiter unten beschrieben zwar auch bei der Färbung mit Coomassie Blau auf, sie sind jedoch weit weniger häufig und ausgeprägt. In erster Näherung kann man bei der CBB-Färbung davon ausgehen, daß die Signalintensität für alle Proteinspezies auf die gleiche Weise mit der Proteinmenge korreliert und entsprechende Färbeverfahren daher für eine Quantifizierung heranziehen.

Nach der Elektrophorese wird das Gel für 30 min in der Färbelösung und anschließend für 2-3 h in der Entfärbelösung geschwenkt. Die Entfärbelösung wird während der Inkubation mehrmals erneuert.

CBB-Gel-Färbelösungen

<i>CB</i>)-Färbelösung:	40	%	Ethanol (v/v)
	10	%	Essigsäure (v/v)
	1	%	Serva Brilliant Blue G-250 (w/v)
<i>CB</i>)-Entfärbelösung:	5	%	Ethanol (v/v)
	7,5	%	Essigsäure (v/v)

Silberfärbung

Bei der Silberfärbung bilden Ag⁺-Ionen Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Die Ag⁺-Komplexe werden durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert. Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Methode zur Detektion von geringen

Proteinmengen: die untere Grenze liegt bei 5 ng pro Bande. Allerdings ist die Silberfärbung nicht quantifizierbar und es werden außer Proteinen auch Nucleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide angefärbt. Bei der Silberfärbung treten für verschiedene Proteine extrem starke Unterschiede in der Signalintensität auf, so daß die Intensität der Färbung kaum einen Rückschluß auf die tatsächlich vorhandene Proteinmenge zuläßt.

Die Färbung erfolgt nach einer Abwandlung der Methode von Heukeshoven und Dernick [Heukeshoven und Dernick, 1988]. Das Gel wird mindestens 20 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend 3x für 5 min in Ethanol/H₂O bidest. (1:2) gewaschen. Das Gel wird 1 min in der Thiosulfatlösung inkubiert, 3x für 20 sec mit H₂O bidest. gewaschen und für 20 min in Silbernitratlösung inkubiert. Es wird 2x für 20 sec mit H₂O bidest. gewaschen und in der Entwicklerlösung so lange inkubiert, bis die gewünschte Färbeintensität erreicht ist. Anschließend wird das Gel nochmals mit H₂O bidest. gewaschen und kann in diesem auch gelagert werden.

Silber-Gel-Färbelösungen

Fixierer

50 % Methanol
12 % Essigsäure

Silbernitratlösung

0,08 g AgNO₃
0,02 % Formaldehyd
ad 50 ml mit H₂O bidest.

Thiosulfatlösung

0,02 % Natriumthiosulfat

Entwickler

3 % Natriumcarbonat
0,05 % Formaldehyd
0,0005 % Natriumthiosulfat

6.2.5.8 Western-Blotting [Towbin et al., 1979]

Es wurde nach dem Semi-Dry-Verfahren in Blotapparaturen der Firma Biorad gebロットet. Direkt nach der Elektrophorese wird der Sandwich-Blot luftblasenfrei zusammengebaut, so daß die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigt. Der Transfer wird bei 4°C mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 60 min in Transfer-Puffer durchgeführt.

Die Kontrolle des Transfers erfolgt durch Färbung der Proteine auf der Membran mit dem Farbstoff Ponceau-Rot. Nach ca. 1-minütiger Färbung in Ponceau-Lösung wird mit 1%iger Essiglösung wieder entfärbt, bis die Proteinbanden sichtbar werden. Die

Positionen des Molekulargewichtsstandards werden markiert, dann wird die Membran in PBS wieder komplett entfärbt.

Lösungen für den Immunoblot (Western-Blot)

Transferpuffer

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

Ponceau-Färbelösung

2	%	Ponceau-Rot (w/v)
30	%	TCA (v/v)
30	%	Sulfosalicylsäure (w/v)

vor Gebrauch 1:4 mit H₂O bidest. verdünnen

Ponceau-Entfärbelösung

1	%	Essigsäure (v/v)
---	---	------------------

Waschpuffer

PBS-Puffer

140	mM	NaCl, pH 7,8
8,1	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	NaH ₂ PO ₄

PBS-T

PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20

6.2.5.9 Immunchemischer Nachweis von Proteinen auf Blotmembranen

Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgt die Blockierung in 10% Magermilchpulver in PBS für 1 h bei RT. Alle anschließenden Inkubations- und Waschschrte werden in PBS bzw. PBS-T (PBS-Tween), pH 7,8 durchgeführt. Die Membran wird 2x gewaschen, anschließend erfolgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C. Die Membran wird 5x 5 min gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper, z.B. einem mit Peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Antikörper, für 1 h bei RT inkubiert. Nach gründlichem Waschen (mindestens 5x 10 min) kann der Blot mittels Luminol entwickelt werden.

Die Inkubation mit dem mAb M2 anti-Flag-Antikörper erfordert die folgenden Schritte: die Blockierung erfolgt für 30 min bei RT in 5% Magermilchpulver in TBS (*Tris-buffered saline*), der primäre Antikörper wird für 1 h bei RT in 2% Magermilch in TBS inkubiert, der sekundäre Antikörper für 1 h bei RT in 5% Magermilch in TBS. Die Waschschrte erfolgen mit TBS-Tween (TBS-T).

Für die Entwicklung des Blots mit Luminol wird die Membran mit Whatman-Papier getrocknet und anschließend mit einer Mischung aus 10 µl Lösung A, 1 ml Lösung B und 3 µl Lösung C für 1 min inkubiert. Der Blot wird mit Whatman-Papier getrocknet

und in Folie gelegt. Die Signale werden mit dem digitalen Imaging-System (Fujifilm) erfaßt. Bei schwachen Blotsignalen wird ein Röntgenfilm (Kodak) für 5 sec bis 30 min belichtet und anschließend in Entwickler- und Fixiererlösung (Kodak) entwickelt.

Lösungen für den Immunoblot (Western-Blot)

Waschpuffer

PBS-Puffer

140	mM	NaCl, pH 7,8	<i>PBS-T</i>
8,1	mM	Na ₂ HPO ₄	PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20
1,5	mM	NaH ₂ PO ₄	

TBS-Puffer

140	mM	NaCl	<i>TBS-T</i>
10	mM	Tris-HCl, pH 7,6	PBS-Puffer + 0,1 % Tween 20

Peroxidase-Reaktion

Lösung A: 6,8 mM p-Cumarsäure
in DMSO

Lösung B: 1,25 mM Luminol
in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

Lösung C: 3 % H₂O₂ (v/v)

Entwickler: Kodak GBX Entwicklerkonzentrat, 1:5 zu verdünnen

Fixierer: Kodak GBX Fixiererkonzentrat, 1:5 zu verdünnen

6.2.5.10 Reinigung und Anreicherung von Antikörpern

Durch die Reinigung und Anreicherung von Antikörpern läßt sich der unspezifische Hintergrund beim Einsatz des Antikörpers für Immunoblot und Immunfluoreszenz minimieren. Man kann Protein-G-Sepharose verwenden, wenn der monoklonale Antikörper in serumfreiem Medium vorliegt. Bei polyklonalen peptidspezifischen Antikörpern können die Peptide an Sepharose gekoppelt werden. Wenn die Peptide mit einem zusätzlich N- oder C-terminalen Cystein vorliegen, lassen sich die Peptide kovalent z.B. an aktivierte Thiolsepharose koppeln (6.2.5.20 Kopplung von Peptiden an aktivierte Thiolsepharose). Sonst müssen je nach Zusammensetzung des Peptids andere Reaktionen mit Aminosäuren ausgewählt werden (z.B. Reaktion von Aminogruppen mit CNBr-aktivierter Sepharose).

Für die Reinigung des peptidspezifischen polyklonalen Antikörpers aus Kaninchen-serum wurden die beiden Peptide, die mit einem zusätzlichen Cystein am C-Terminus

vorliegen, an aktivierter Thiolsepharose immobilisiert (siehe 6.2.5.20). Für 0,5 ml Antiserum wurde 1 ml Peptid-Sepharose (2 μ mol Peptid) eingesetzt. Das Antiserum wird 1:10 verdünnt und für 2 h bei RT drehend mit der Peptid-Sepharose inkubiert. Die Sepharose wird durch Zentrifugation bei 1.000 rpm für 3 min präzipitiert. Der Überstand wird abgenommen und später im Gel bzw. im Immunoblot auf noch verbleibende spezifische Antikörper untersucht. Die Sepharose wird 3x mit PBS gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgt mit 1 ml 0,05 M Citrat (pH 2,5) und anschließend mit 1 ml 0,1 M Citrat (pH 2,3). Die Elution kann entweder im Batch-Verfahren oder im Säulen-Verfahren durchgeführt werden. Für die Aufreinigung größerer Mengen an Antiserum empfiehlt sich die Durchführung im Säulen-Verfahren. Das Eluat wird sofort schrittweise mit 1 M Na_2CO_3 neutralisiert und für weitere Analysen (Proteinbestimmung, SDS-PAGE, Immunoblot, Immunfluoreszenz etc.) bei 4°C gelagert. Die Lagerung über lange Zeiträume sollte bei -80°C erfolgen. Außerdem sind auch Glycerinstocks (50% Glycerin) für die Lagerung bei -20°C sinnvoll, wenn wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermieden werden soll.

Die Peptidsepharose wird noch weiter mit Citrat eluiert, mit PBS mehrmals gewaschen, bis wieder ein neutraler pH-Wert erreicht wird und kann dann bei 4°C in PBS/0,02% NaN_3 gelagert werden.

Lösungen für die Reinigung und Anreicherung von Antikörpern

Elutionspuffer 1: 0,05 M Citrat, pH 2,5

Elutionspuffer 2: 0,1 M Citrat, pH 2,3

Neutralisationspuffer: 1 M Na_2CO_3

6.2.5.11 Inhibition von Antikörper-Antigen-Bindung durch immunogene Peptide

Um die Spezifität polyklonaler Antikörper zu überprüfen, die durch die Injektion von Peptiden in Tiere generiert wurden, kann man die zur Immunisierung eingesetzten Peptide dazu verwenden, die Antikörper zu blockieren. Ist diese Inhibition erfolgreich, erhält man Rückschlüsse über die Spezifität des Antikörpers bzw. darüber, welche Signale einer spezifischen Antikörper-Antigen-Interaktion zuzuordnen sind. Dazu inkubiert man die Antikörper in geringem Volumen (5-faches Volumen des konz. Antikörpers) mit einem 5- bzw. 10-fachen mengenmäßigen Überschuss an Peptid für 2 h bei RT. Danach wird 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in der gewohnten Antikörper-Verdünnung für die Applikation (Immunoblot oder Immunfluoreszenz) eingesetzt.

6.2.5.12 Aufschluß von Bakterienzellen nach Expression von poly-His-Tag-markierten Fusionsproteinen

Aufarbeitung unter nativen Bedingungen

Die in nativem Bindungspuffer resuspendierten Zellpellets der Expression des Kontroll-Fusionsproteins werden in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und 5x in flüssigem Stickstoff rasch gefroren und mit Hilfe eines lauwarmen Wasserbades aufgetaut. Die Zellmembranen werden beim Einfrieren durch Eiskristalle und Risse durch das Ausdehnen des Eises zerstört. Alle weiteren Arbeiten erfolgen bei 4°C. Zur löslichen Fraktion werden DNase und RNase (Endkonzentration: 10 µg/ml), PMSF (Endkonzentration: 1 mM) und Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500) zugegeben. Nach mehrstündiger Inkubation auf Eis und gelegentlichem Schütteln wird für 1 h bei 17.000 g bei 4°C zentrifugiert. Man erhält ein klares Lysat, das über die Ni²⁺-NTA-Agarose weiter gereinigt wird.

Aufarbeitung unter denaturierenden Bedingungen

Die in denaturierendem Lysispuffer resuspendierten Zellpellets der Expression des Fusionsproteins α3/cyto werden aufgetaut, mit Ultraschall (3 Impulse mittlerer Intensität, je 10 sec, SonicatorTM W-375, Heat Systems-Ultrasonics, Inc.) wird die DNA zerstört. Nach Zentrifugation bei 10.000 g bei 4°C für 30 min erhält man ein klares Lysat, das über die Ni²⁺-NTA-Agarose weiter gereinigt werden kann.

6.2.5.13 Reinigung überexprimierter poly-Histidin-markierter Fusionsproteine [Janknecht et al., 1991]

Die Reinigung von Poly-Histidin fusionierten Proteinen erfolgte in Anlehnung an die Vorschriften über den Umgang mit Ni²⁺-NTA-Matrix von Qiagen und Invitrogen. Es wurde die Ni²⁺-NTA-Agarose von Qiagen verwendet.

Die sechs Histidine am N-Terminus der überexprimierten Fusionsproteine können immobilisierte zweiwertige Kationen komplexieren. Zweiseitige Nickelionen können durch Kopplung von Nitrilotriessigsäure (NTA), eines 4-zähligen Liganden, an die Agarose-Matrix komplexiert werden. Nickel besitzt insgesamt 6 Ligandenbindungsstellen, so können die verbleibenden zwei Bindungsstellen durch die hochaffine Bindung von zwei Histidinen besetzt werden. Gebundene Proteine können mit Imidazol eluiert werden. Imidazol ist dem Histidin strukturell ähnlich, besitzt aber keine Seitenkette. Aufgrund der ähnlichen Struktur und höheren Affinität kompetiert Imidazol

mit Histidinen um die Ni²⁺-Bindungsstellen und verdrängt die Histidine, wodurch die Proteine eluiert werden. Die Bindung der Histidine an die Ni²⁺-NTA-Agarose kann auch über pH-Wertsenkung gestört werden, da die Histidinreste bei einem pH-Wert unterhalb von 5,3 protoniert werden und nicht mehr an die Nickelionen binden können.

Reinigung des Kontroll-Fusionsproteins

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, werden die *E.coli*-Lysate auf 20 mM Imidazol eingestellt. Je 12 ml Lysat werden mit 2 ml Ni²⁺-NTA-Agarose, die mit nativem Bindungspuffer äquilibriert wurde, für 1 h im Kühlraum auf einem Über-Kopf-Drehspieß inkubiert. Der Überstand wird dekantiert und die Matrix im Batch-Verfahren mit 20x 5 ml Waschpuffer pH 7,8. Anschließend wird im Säulenverfahren weiter gearbeitet. Mit einem steigenden Imidazolgradienten werden Verunreinigungen, die an die Matrix binden, entfernt. Die His₆-fusionierten Proteine werden in einem Stufengradienten von 3x 5 ml 50 mM, 2x 5 ml 75 mM, 3x 1 ml 100 mM, je 2x 1ml 150, 200, 250, 350 und 6x 1ml 500 mM Imidazol eluiert. Alle Wasch- und Elutions-Fractionen werden gesammelt und bei -20°C aufbewahrt. Aliquots wurden durch SDS-PAGE auf Proteingehalt und Verunreinigungen hin untersucht. Proteinhaltige, reine Fraktionen werden gepoolt und gegen nativen Bindungspuffer dialysiert.

Reinigung des α3/cyto-Fusionsproteins

Je 14 ml Lysat werden mit 2 ml Ni²⁺-NTA-Agarose, die mit denaturierendem Bindungspuffer äquilibriert wurde, für 1 h im Kühlraum auf einem Über-Kopf-Drehspieß inkubiert. Der Überstand wird dekantiert und die Matrix im Batch-Verfahren gewaschen. Die Elution erfolgt durch Absenkung des pH-Wertes. Es wird mit 2x 4 ml denaturierendem Bindungspuffer pH 7,8, 2x 4 ml denaturierendem Waschpuffer pH 6 und 2x 4 ml denaturierendem Waschpuffer pH 5,3 gewaschen. Die Elution erfolgt im Säulenverfahren mit je 10x 1 ml denaturierendem Elutionspuffer pH 4. Die Eluate werden in der SDS-PAGE analysiert und Fraktionen, die hauptsächlich Fusionsprotein enthalten wurden gepoolt, verdünnt und der pH-Wert wird wieder auf 7,8 eingestellt. Die so gereinigten Fusionsproteine wurden zur Kopplung an Ni²⁺-NTA für die Protein-affinitätschromatographie eingesetzt.

Lösungen für die Proteinisolierung und Reinigung von poly-His-Tag-Fusionsproteinen

Nativer Lysis- und Bindungspuffer

20 mM Phosphat (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄)
500 mM NaCl, pH 7,8

Nativer Waschpuffer

20 mM Phosphat (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄)
500 mM NaCl
20 mM Imidazol, pH 7,8

Nativer Elutionspuffer

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
 500 mM NaCl
 50-500 mM Imidazol (Stufengradient), pH 7,8
 Imidazolkonzentrationen im Stufengradient in
 mM : 50, 75, 100, 150, 200, 250, 350, 500

 Ni^{2+} -NTA-Äquilibriumspuffer (nativ)

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
 500 mM NaCl
 20 mM Imidazol, pH 7,8

Denaturierender Lysispuffer

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
 500 mM NaCl
 6 M Guanidinium•HCl, pH 7,8

Denaturierender Bindungspuffer

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
 500 mM NaCl
 8 M Harnstoff, pH 7,8

Denaturierende Waschpuffer

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
 500 mM NaCl
 8 M Harnstoff, pH 6 bzw. pH 5,3

Denaturierende Elutionspuffer

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
 500 mM NaCl
 8 M Harnstoff, pH 4

Renaturierender Bindungspuffer

20 mM Phosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$)
 500 mM NaCl, pH 7,8
 7-0,5 M Harnstoff in sinkenden Konzen-
 trationen (7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5)

6.2.5.14 Aufschluß von Bakterienzellen nach Expression von Fusionsproteinen mit GST-Anteil

Die Bakterienzellen aus 30 ml Kultur wurden in 3 ml Lysispuffer augenommen und schockgefroren. Nach dem Auftauen wird das Lysat durch eine dünne Kanüle (0,7 mm Durchmesser) gezogen und weitere 4x rasch eingefroren und aufgetaut. Das Bakterienlysat wird bei 18.000 rpm für 30 min unter Zusatz von 100 µl Sepharose als Pelletierhilfe zentrifugiert, der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, bei Bedarf eventuell nochmals zentrifugiert und auf 4% Triton X-100 eingestellt. Dieses Lysat kann zur Reinigung und Kopplung an Glutathion-Sepharose eingesetzt werden.

6.2.5.15 Reinigung überexprimierter Proteine mit GST-Anteil

Das klare Bakterienlysats aus 15 ml Bakterienkultur wird mit 150 µl Glutathion-Sepharose versetzt, die mit Waschpuffer 1 äquilibriert wurde und für 1 h bei 4°C drehend inkubiert. Die Sepharose wird bei 1.000 rpm für 3 min pelletiert, 3x mit Waschpuffer 2 gewaschen und mit Elutionspuffer bei RT für 10 min eluiert. Die Sepharose wird bei 1.000 rpm für 3 min pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und weiter analysiert (SDS-PAGE, Proteinbestimmung). Das gereinigte Fusionsprotein kann gegen 50 mM Tris-HCl, pH 8 über Nacht bei 4°C dialysiert werden und nach Zugabe von Glycerin und NaN₃ (Endkonzentration 10% und 0,02%) bei -80°C gelagert werden. Für den *pull down* wird das Protein nicht eluiert, sondern nach dem Waschen an der Glutathion-Sepharose belassen und so für weitere Experimente eingesetzt.

Lösungen für die Proteinisolierung und Reinigung von Fusionsproteinen mit GST-Anteil

Waschpuffer 1

50 mM Tris-HCl, pH 8
200 mM NaCl
1 mM EDTA

Waschpuffer 2

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

Lysispuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8
200 mM NaCl
1 mM EDTA
5 mM DTT
1 mM PMSF

Elutionspuffer

50 mM Tris-HCl, pH 8
10 mM Glutathion

Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500)

6.2.5.16 Proteinaffinitätschromatographie

Bei der Proteinaffinitätschromatographie werden die zu untersuchenden Proteine an einer Matrix immobilisiert. Im Säulenverfahren werden Proteinlösungen über die Säule gegeben, wobei Interaktionspartner durch nicht kovalente Wechselwirkungen an das immobilisierte Protein binden können. Nach Waschen der Säule können Bindungs-

partner durch einen Salzgradienten eluiert werden. Dabei werden ionische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen zerstört.

Für die Proteinaffinitätschromatographie wurden drei Säulen mit je 500 μl Ni^{2+} -NTA-Agarose eingesetzt. Eine ungekoppelte Säule wurde als Leersäule zur Kontrolle mitgeführt. Die beiden anderen Protein-gekoppelten Säulen wurden mit je 5 mg des Kontroll-Fusionsproteins bzw. des $\alpha 3/\text{cyto}$ -Fusionsproteins beladen.

Kopplung des Kontroll-Fusionsproteins:

Die gepoolten und dialysierten Eluate, die insgesamt 5 mg Kontroll-Fusionsprotein enthalten, werden in einem Säulendurchlauf an 500 μl Ni^{2+} -NTA-Agarose gekoppelt, die zuvor 2x mit 2 ml H_2O bidest. gewaschen und mit 2x 2ml nativem Bindungspuffer äquilibriert wurde. Die mit Protein beladene Säule wird mit 2x 1,5 ml hypoosmolarem Puffer, der 1 mM PMSF, Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500), 1 mM Vanadat und 15 mM Imidazol enthält, äquilibriert.

Kopplung des $\alpha 3/\text{cyto}$ -Fusionsproteins:

Das Fusionsprotein (5 mg) wird an 500 μl Säulenmaterial gekoppelt, das mit 2x 2 ml H_2O bidest. und 2x 2 ml denaturierendem Bindungspuffer äquilibriert wurde. Der Harnstoff wird mit renaturierendem Bindungspuffer sinkender Harnstoffkonzentrationen sukzessive ausgewaschen. Anschließend wird die Säule mit je 2x 1,5 ml hypoosmolarem Puffer, der 1 mM PMSF, Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500), 1 mM Vanadat und 15 mM Imidazol enthält, äquilibriert.

Für die Proteinaffinitätschromatographie wurden cytosolische Proteine aus PC12-Zellen, die auf Kollagen-IV mit 250 ng/ml NGF für 72 h differenzierten, präpariert. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und mit einem Zelllifter von der Schale abgelöst und pelletiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellpellets bei -20°C eingefroren. Das geklärte Cytosol wird auf 1 mg Protein/ml verdünnt, mit 1 mM PMSF, Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500), 1 mM Vanadat und 15 mM Imidazol versetzt. Der pH-Wert wird auf 7 eingestellt. Das Cytosolpräparat wird 1 h drehend bei 4°C mit 3 ml Ni^{2+} -NTA-Agarose inkubiert, um unspezifische Bindung an das Säulenmaterial zu minimieren. Dieses präadsorbierte Cytosol wird für die Proteinaffinitätschromatographie eingesetzt.

Über jede der drei Säulen werden je 10 ml (Proteingehalt 10 mg) der PC12-Cytosolpräparation in einer Endlosschleife über Nacht über die Matrix gegeben. Anschließend werden die gesamten 10 ml langsam abgelassen. Die Säulen werden mit hypoosmolarem Puffer (+ 15 mM Imidazol) gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm nach

ca. 10 ml den Nullwert erreicht (Referenz: hypoosmolarer Puffer + 15 mM Imidazol). Interaktionspartner werden durch einen KCl-Stufengradienten eluiert. Der hypoosmolare Puffer wird auf 150, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 mM KCl eingestellt und je zwei 500 μ l Aliquots werden über die Säulen gegeben. Die Fraktionen werden gesammelt und bei -20°C aufbewahrt. 20 μ l Aliquots werden mit reduzierendem 5x Probenpuffer aufgekocht und in einem 10%igen Tris/Tricin-Gelsystem analysiert. Die Gele werden mit CBB und anschließend mit Silber gefärbt.

Lösungen für die Proteinaffinitätschromatographie

<i>Äquilibrierungs- und Waschpuffer</i>			<i>Elutionspuffer</i>	
10	mM	Na_2HPO_4 , pH 7	10	mM Na_2HPO_4 , pH 7
15	mM	Imidazol	15	mM Imidazol
		Zusatz von Proteaseinhibitor-Cocktail (1:500)	0,15-2	M KCl in steigenden Konzentrationen
		PMSF (1 mM)		(0,15; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2)
		Na_3VO_4 (1 mM)		

6.2.5.17 Protein-Identifizierung

Tryptischer Verdau von Proteinen in Polyacrylamidgelen [Shevchenko et al., 1996]

Nach dem Färben mit CBB und Entfärben wird das Gel gewässert, dann werden die betreffenden Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Würfel von etwa 1 mm^3 zerteilt und in 0,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Proben werden 2x kurz in H_2O (HPLC-Reinheitsgrad) inkubiert, anschließend wird das Wasser abgenommen und durch Verdauopuffer ersetzt (circa 20 μ l für eine Bande aus einem Minigel).

Entfernung von Coomassie-Blau und SDS: Nach 15 min Schütteln wird Acetonitril/Wasser im Verhältnis 1:1 hinzugegeben, dann wird wieder für 15 min unter Schütteln inkubiert. Bei diesem Schritt schrumpfen die Gelstücke und Farbe tritt aus. Der Überstand wird abgenommen und durch 20 μ l 100% Acetonitril ersetzt. Die Inkubation wird fortgesetzt, bis die Gelstücke milchig trüb sind.

Reduktion/Carbamidomethylierung: Die Gelstücke werden nach dem letzten Acetonitrilschritt lyophilisiert. Anschließend wird Reduktionslösung zugesetzt und für 30 min bei 56°C inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und die Gelstücke werden durch erneute Zugabe von Acetonitril wieder geschrumpft. Nach Entfernung des Acetonitrils werden die Gelstücke für 20 min bei RT im Dunkeln mit Iodacetamidlösung inkubiert. Die Lösung wird anschließend abgenommen und durch

Verdaupuffer ersetzt. Die Gelstücke werden wieder 15 min geschüttelt, dann wird der Verdaupuffer abgenommen. Schließlich werden die Gelstücke in reinem Acetonitril 15 min geschrumpft und erneut lyophilisiert. Die Überstände werden jeweils verworfen. *Tryptische Spaltung*: Die Gelstücke werden zunächst für 30 min auf Eis in Trypsinlösung rehydratisiert. Überschüssige Flüssigkeit wird danach entfernt und durch genau so viel Verdaupuffer ersetzt, daß die Gelstücke gerade mit Puffer bedeckt sind. Der Verdau wird über Nacht unter mildem Schütteln bei 37°C durchgeführt. Nach 12 h werden 1 µl-Aliquots aus den Verdauüberständen entnommen und mit MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry*) unter Verwendung einer *fast-evaporation/nitrocellulose* (FENC)-Matrixpräparation vermessen.

Lösungen für den tryptischen Verdau von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Reduktionslösung: 100 mM DTT in
100 mM NH₄HCO₃

Carbamidomethylierung: 55 mM Iodacetamid in
100 mM NH₄HCO₃

Verdaupuffer: 25 mM NH₄HCO₃

Trypsinlösung: 12,5 µg/ml Trypsin (bovin, Sequenzierungs-Reinheitsgrad)
in 25 mM NH₄HCO₃

Alle Lösungen werden in H₂O mit HPLC-Reinheitsgrad (dies entspricht H₂O aus der Milli-Q[®] Wasserfilteranlage) angesetzt.

Peptide-mass fingerprinting [Pappin, 1997]

Die Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie eignet sich für Proteine, die N-terminal blockiert sind oder nur in geringen Mengen vorliegen. Mit MALDI-TOF-MS können Peptide noch im unteren picomol-Bereich analysiert werden. Die zu untersuchenden Proteine werden nach gelelektrophoretischer Trennung im Gel durch spezifische Proteasen in kleine Peptide gespalten. Die Fragmente werden eluiert, in eine Matrix eingebettet, mittels eines Laserstrahls aus der Matrix herausgelöst und ionisiert. Über die Flugzeit der ionisierten Peptide können die Massen bestimmt werden. Anhand der charakteristischen Fragmentlängen, die nach Spaltung eines

jeden Proteins entstehen, können Proteine identifiziert werden, sofern sie bereits bekannt sind und ihre vollständige Sequenz ermittelt ist.

Die Überstände der Verdauansätze wurden von P. Franke und C. Weise (AG Hucho) mit einem Bruker Reflex Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) im Reflektor-Modus analysiert. Die Proben wurden nach der Dünnschichtmethode (*fast evaporation technique*) auf den Probenhalter des Massenspektrometers gebracht. Dazu werden 4 Teile CCA (α -Cyano-Zimtsäure, *α -cyano cinnamonic acid*) in gesättigtem Aceton mit einem Teil 10 mg/ml Nitrozellulose in Aceton/Isopropanol oder Aceton/Acetonitril 1:1 gemischt [Vorm und Roepstorff, 1994]. 0,4 μ l dieser Mischung werden auf den Probenhalter aufgetragen, trocknen sofort und bilden einen dünnen Film (Dünnschicht). Darauf werden 0,5 μ l 10%ige Ameisensäure aufgetragen und in diese werden 0,3 μ l Probe (z.B. Verdauüberstand) pipettiert. Vorteil dieser Technik ist, daß der Probenplatz noch einmal zur Anreicherung von Salzen gewaschen werden kann: erst mit 5 μ l 5% Ameisensäure, dann mit 5 μ l Wasser; die Flüssigkeit, die das Salz mitnimmt, wird jeweils abgeblasen oder abgeschlagen.

Das Massenspektrometer wurde mit den Massenpeaks 805,42 und 2163,06 der autoproteolytischen Trypsinpeptide (interner Standard) kalibriert. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mit Hilfe der über das Internet nutzbaren Suchmaschine Mascot [Perkins et al., 1999]. Für die Suche wurden bis zu 2 Fehlschnittstellen und eine Abweichung der Massen von $\pm 0,1$ Da bzw. ± 50 ppm erlaubt. Als Modifikationen wurde die Carbamidomethylierung als feste Modifikation und die Oxidation von Methioninresten als variable Modifikation angegeben. Es wurde ohne Einschränkung auf Spezies in der nicht redundanten (nr) NCBI-nr-Datenbank gesucht.

6.2.5.18 GST pull-down assay

Mit GST-Fusionsproteinen können interagierende Proteine aus Proteinlösungen wie z.B. Zellsolubilisat präzipitiert werden, indem man die Fusionsproteine über Glutathion-Sepharose präzipitiert. Für den *pull down* mit GST bzw. GST-Lanp wird Fusionsprotein aus 15 ml Bakterienkultur an 150 μ l Glutathion-Sepharose gekoppelt und für 1 h bei 4°C drehend mit 1 mg Gesamtprotein aus PC12-Solubilisat inkubiert. Die Sepharose wird bei 1.000 rpm für 3 min pelletiert, 5x mit Waschpuffer gewaschen und dann durch Abkochen in 50 μ l 2x reduzierendem Probenpuffer eluiert. Je 25 μ l der eluierten Proteine wurden in der SDS-PAGE getrennt und im Immunoblot analysiert.

Lösungen für pull-down assays

Solubilisierungspuffer:

50	mM Hepes, pH 7,5
150	mM NaCl
1	mM MgCl ₂
1	mM CaCl ₂
1	% Triton X-100

Waschpuffer:

50	mM Hepes, pH 7,5
150	mM NaCl
1	mM MgCl ₂
1	mM CaCl ₂
0,02	% Triton X-100

6.2.5.19 Immunpräzipitation

Mit spezifischen Antikörpern können gezielt Proteine aus einem Proteingemisch angereichert bzw. präzipitiert werden. Dazu wird der Antikörper an Protein-A- bzw. Protein-G-Sepharose gekoppelt und mit dem Proteingemisch inkubiert.

Protein-A und Protein-G sind Proteine der bakteriellen Zellwand (Protein-A aus *Staphylococcus aureus* und Protein-G aus *Streptococcus sp.*), die eine hohe Affinität zur Fc-Region vieler Immunglobuline der Säuger besitzen. Diese Proteine bieten sich zur Aufreinigung und Anreicherung von Antikörpern bzw. Immunkomplexen an, da nach der Bindung des Fc-Teils der Fab-Anteil weiterhin für die Antigenbindung verfügbar ist. Protein-G bindet effizienter an Immunglobuline aus Rind, Ziege und Schaf. Das von Amersham Biosciences erhältliche Protein-G wird rekombinant in *E.coli* hergestellt, trägt zwei IgG-Bindungsstellen und hat ein Molekulargewicht von 17 kDa. Außerdem wurde die Albumin-Bindungsstelle deletiert, so daß unerwünschte Reaktionen mit Albuminen ausbleiben.

Pro Immunpräzipitation werden an 30 µl Protein-A- bzw. Protein-G-Sepharose 5-10 µg Antikörper gekoppelt. Dazu wird die Sepharose in PBS äquilibriert, mehrere Male mit PBS gewaschen und jeweils bei 1.000 rpm für 3 min pelletiert. Die Kopplung der Antikörper an die Sepharose erfolgt drehend bei 4°C für mindestens 1 h (bis zu 16 h). Für die Immunpräzipitation sollten Zellen direkt aus der Zellkultur bzw. schockgefrorenem Gewebe verwendet werden. Pro Immunpräzipitation werden 0,5-1 mg Gesamtprotein aus Solubilisat oder Homogenat eingesetzt und für 2-3 h drehend bei

4°C mit der Antikörper-gekoppelten Protein-A- bzw. Protein-G-Sepharose inkubiert. Nach der Immunpräzipitation wird die Sepharose mit 1.000 rpm für 3 min pelletiert, 5x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend für weitere Assays eingesetzt oder in 50 µl 2x SDS-PAGE-Probenpuffer abgekocht. Die abgekochten Proteine werden in der SDS-PAGE getrennt und im Immunoblot analysiert.

Lösungen für die Immunpräzipitation

<i>Solubilisierungspuffer:</i>	50	mM Hepes, pH 7,5
	150	mM NaCl
	1	mM MgCl ₂
	1	mM CaCl ₂
	1	% Triton X-100
<i>Waschpuffer:</i>	50	mM Hepes, pH 7,5
	150	mM NaCl
	1	mM MgCl ₂
	1	mM CaCl ₂
	0,02	% Triton X-100

6.2.5.20 Kopplung von Peptiden an aktivierte Thiolsepharose

Peptide und Proteine, die ein Cystein enthalten bzw. mit einem zusätzlichen Cystein am C- oder N-Terminus synthetisiert wurden, können über dieses an aktivierter Thiolsepharose immobilisiert werden. Dabei wird eine Disulfidbrücke ausgebildet, die durch Reduktionsmittel wieder aufgelöst werden kann.

Es wurde aktivierte Thiolsepharose von Amersham Biosciences verwendet. Pro ml Sepharose werden 2 µmol Peptid zur Kopplung eingesetzt. Die Sepharose (1 g) wird auf einer Glasfritte in 10 ml H₂O bidest. gequollen und anschließend mit 200 ml H₂O bidest. gewaschen, indem man sanftes Vakuum anlegt. Die trockene Sepharose wird von der Fritte in ein Reaktionsgefäß überführt und in Thiolsepharose-Bindungspuffer aufgenommen. Das Peptid/Protein wird im Thiolsepharose-Bindungspuffer entsprechend verdünnt und mit der Sepharose für mindestens 1 h (bis 16 h) bei RT drehend inkubiert. Anschließend wird 2x mit 3x PBS gewaschen. Freie reaktive Gruppen werden mit einem 3-fachen Überschuß (bezogen auf 1 µmol Thiolgruppen/ml Sepharose) an Mercaptoethanol in Acetatpuffer (pH 4,5) für 15 min bei RT abgesättigt (500 µl Absättigungspuffer pro ml Sepharose) [Otey et al., 1990; Schaller et al., 1995] und

anschließend nochmals mit 2 μmol Cystein pro 20 μl Peptidsepharose abgesättigt. Es wird nochmals mit PBS gewaschen. Die Sepharose kann in PBS bei 4°C gelagert werden.

Lösungen für die Kopplung von Peptiden an aktivierte Thiolsepharose

<i>Bindungspuffer:</i>	3x	PBS, pH 7,2
		oder
	0,1 M	Tris-HCl, pH 7,5
	0,5 M	NaCl
	1	mM EDTA
<i>Absättigungspuffer:</i>	100 mM	NaAcetat
	100 mM	Essigsäure, pH 4,5
	6 mM	Mercaptoethanol

6.2.5.21 Kopplung von Peptiden an CNBr-aktivierte Sepharose

Über primäre Aminogruppen können Peptide und Proteine mit der CNBr-aktivierten Sepharose eine kovalente Bindung eingehen.

Es wurde CNBr-aktivierte Sepharose von Amersham Biosciences verwendet. Pro ml Sepharose werden 2 μmol Peptid zur Kopplung eingesetzt. Die Sepharose (1 g) wird auf einer Glasfritte in 1 mM HCl gequollen und gewaschen. Die Sepharose wird in Kopplungspuffer überführt. Die Bindungskapazität der Sepharose liegt bei 5-10 mg Protein pro ml gequollene Sepharose. Das Protein/Peptid wird in Kopplungspuffer gelöst bzw. verdünnt, mit der Sepharosesuspension vermischt und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C drehend inkubiert. Nicht-gebundenes Protein/Peptid wird mit Kopplungspuffer, Waschpuffer und anschließend nochmals mit Kopplungspuffer ausgewaschen. Noch aktive Gruppen werden mit Blockierungspuffer für 2 h bei RT oder 16 h bei 4°C abgesättigt. Anschließend wird wiederum mit Kopplungspuffer gewaschen. Die Sepharose kann bei 4°C aufbewahrt werden.

Lösungen für die Kopplung von

<i>CNBr-Sepharose Kopplungspuffer:</i>	0,1 M NaHCO ₃ , pH 8,3
	0,5 M NaCl
<i>CNBr-Sepharose Waschpuffer:</i>	0,1 M Acetat, pH 4
	0,5 M NaCl
<i>CNBr-Sepharose Blockierungspuffer:</i>	0,1 M Ethanolamin, pH 8
	oder 0,2 M Glycin, pH 8

6.2.5.22 Peptidbindungsstudien

Für die Peptidbindungsstudien können eingefrorene Zellpellets verwendet werden. Die Pellets werden in Acetat-Lysispuffer (mit 1 mM PMSF und Proteaseinhibitor-Cocktail 1:500) solubilisiert (1 h bei 4°C rütteln lassen), anschließend wird das Solubilisat 20 min bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. Vom Überstand wird die Proteinmenge bestimmt und auf 0,2 mg/ml eingestellt. Von dieser Proteinlösung werden je 100 µl mit 20 µl Peptidsepharose für 1h drehend bei 4°C inkubiert.

Die Sepharose wird abzentrifugiert (1.000 rpm, 3min), 3x mit Acetat-Lysispuffer gewaschen und dann mit 50 µl 2x SDS-PAGE Probenpuffer abgekocht.

Lösungen für Peptidbindungsstudien

Acetat-Lysispuffer:

- 1 % Triton X-100
- 50 mM Tris-Acetat, pH 7,6*
- 150 mM NaCl
- 10 mM EGTA
- 2 mM MgCl₂
- *mit Essigsäure

Acetat-Waschpuffer:

- 0,1 % Triton X-100
- 50 mM Tris-Acetat, pH 7,6*
- 150 mM NaCl
- 10 mM EGTA
- 2 mM MgCl₂
- *mit Essigsäure

6.2.5.23 Gelfiltration

PC12-Zellen (2×10^7) werden für 72 h auf Kollagen-IV kultiviert, mit PBS gewaschen und mit Solubilisierungspuffer (mit 1 mM PMSF, Proteaseinhibitor-Cocktail 1:500 und 1 mM Na₃VO₄) lysiert. Das Lysat wird mit 13.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand wird auf eine für die Benutzung mit dem FPLC® System (*fast protein liquid chromatography*) konzipierte Superdex®200-Säule (Amersham Biosciences) aufgetragen, die mit Elutionspuffer äquilibriert wurde. Die Elution erfolgt mit Elutionspuffer (0,2 ml/min). Es werden 0,4 ml-Fraktionen gesammelt. Die Säule wird mit einem externen Standard (Gel Filtration Chromatography Standard von Biorad) in CHAPS-Kalibrierungspuffer kalibriert, da Triton X-100 mit der Absorption bei 280 nm interferiert. Die unter diesen Bedingungen durchgeführte Gelfiltration dient nicht dem

exakten Nachweis von Stokes-Radius oder Molekulargewicht von Proteinkomplexen, sondern allein der Abschätzung der Größe von Proteinkomplexen. Die Fraktionen werden mit SDS-PAGE getrennt und im Immunoblot analysiert.

Lösungen für die Gelfiltration

<i>Solubilisierungspuffer:</i>	50	mM Hepes, pH 7,5
	150	mM NaCl
	1	mM MgCl ₂
	1	mM CaCl ₂
	1	% Triton X-100
<i>Elutionspuffer:</i>	50	mM Hepes, pH 7,5
	150	mM NaCl
	1	mM MgCl ₂
	1	mM CaCl ₂
	0,1	% Triton X-100
<i>Kalibrierungspuffer:</i>	50	mM Hepes, pH 7,5
	150	mM NaCl
	1	mM MgCl ₂
	1	mM CaCl ₂
	1	% CHAPS

6.2.5.24 Quervernetzung

Mit bifunktionellen Quervernetzern können benachbarte Proteinen bzw. Proteinbereiche kovalent miteinander verbunden werden und somit strukturelle Hinweise bzw. Hinweise zu existierenden Proteinkomplexen gewonnen werden. Eingesetzt wurde der homobifunktionelle Quervernetzer DSS, der mit Aminogruppen im Abstand von max. 11,4 Å reagiert. Dieser Quervernetzer ist membrangängig und nicht spaltbar.

Es wurden je 10⁷ PC12-Zellen, die 72 h auf Kollagen-IV mit NGF differenzierten, zum einen im adhärenen Zustand quervernetzt und dann solubilisiert und zum anderen zuerst solubilisiert und dann quervernetzt.

Die Zellen werden mit PBS gewaschen und bei 4°C für 30 min mit 300 µg/ml DSS-Lösung (= 0,74 mM) in PBS, pH 8,3-8,5 inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 80 µl/ml Stopplösung und Inkubation für 15 min bei RT gestoppt. Tris ist der Bestandteil der Stopplösung, der über seine primären Amine mit noch unverbrauchtem Quervernetzer reagiert und die Reaktion beendet. Die Zellen werden mit PBS gewaschen

und anschließend solubilisiert (Solubilisierungspuffer mit 1 mM PMSF, Protease-inhibitor-Cocktail 1:500 und 1 mM Na₃VO₄).

Für die Quervernetzung des Solubilisats wird das Solubilisat auf 2 mg/ml eingestellt. Es wird für 10 min unter leichtem Schütteln mit 300 µg/ml DSS (= 0,74 mM) inkubiert. Die Reaktion wird mit 80 µl/ml Stopplösung beendet.

Lösungen für die Quervernetzung von Proteinen

DSS-Stammlösung: 12,5 mg/ml in DMSO (immer frisch ansetzen)

Stopplösung: 100 mM Tris-HCl, pH 8

6.2.5.25 In-vitro Phosphatase-Assay

Mit Phosphopeptiden

Das Kontrollpeptid pK (Upstate Biotechnology) wurde als Positivkontrolle und zur Quantifizierung eingesetzt.

0,01 units PP1 bzw. 0,05 units PP2A wurden in 50 µl Probenvolumen mit 10 nmol von jedem Phosphopeptid für 15 min bei RT in PP1- bzw. PP2A-Reaktionspuffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Biomol-Green-Reagent (Biomol) gestoppt. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wird nach 20-30 min Farbentwicklung bei 620 nm gemessen. Die Ergebnisse werden anhand einer Phosphat-Standardkure quantifiziert. Der Anteil der Dephosphorylierung wird berechnet, indem die freigesetzte Phosphatmenge durch die Menge an eingesetztem Phosphopeptid geteilt wird. Die Ergebnisse wurden auf die Resultate für die Positivkontrolle normiert. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt.

Mit Immunpräzipitat

10⁸ PC12-Zellen werden in Suspension mit 100 nM Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aus dem Samen des Wolfsmilchgewächses *Croton tiglium* für 30 min unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Die Zellen werden 2x mit PBS gewaschen und in Solubilisierungspuffer (mit 1 mM PMSF, Proteaseinhibitor-Cocktail 1:500, 2 mM Na₃VO₄ und 2 mM NaF) solubilisiert. Das Lysat wird mit 13.000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird mit Sepharose 4B (Amersham Biosciences) vorgeklärt und 4 mg Gesamtprotein werden für 1 h mit je 50 µl Protein-G-Sepharose drehend bei 4°C inkubiert, die mit 50 µg anti-α3A-integrin mAb (Ralph3.2) oder Maus-anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt ist. Die Sepharose wird 3x mit Solubilisierungspuffer und 2x mit dem entsprechenden Phosphatase-Reaktionspuffer gewaschen. 0,06 units PP1 bzw. 0,3 units PP2A werden mit je 25 µl Sepharose in 50 µl Reaktions-

volumen für 20 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 100 µl Biomol-Green-Reagent (Biomol) gestoppt. Pro Wert wurden Doppelbestimmungen angesetzt und der Assay wurde für PP2A zweimal und für PP1 fünfmal durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Funktionsfähigkeit der eingesetzten Enzyme wurden 20 nmol des Kontrollpeptids pK (Upstate Biotechnology) eingesetzt.

Lösungen für den in-vitro Phosphatase-Assay

<i>PP1-Reaktionspuffer:</i>	50	mM Tris-HCl, pH 7
	0,1	mM Na ₂ EDTA
	5	mM DTT
	0,01 %	Brij 35
	kurz vor Reaktion Zugabe von 1 mM MnCl ₂	
<i>PP2A-Reaktionspuffer:</i>	20	mM MOPS, pH 7,5
	150	mM NaCl
	60	mM Mercaptoethanol
	1	mM MgCl ₂
	2	mM EGTA
	0,1	mM MnCl ₂

6.2.5.26 β-Galactosidase-Assay aus Flüssigkultur

Man setzt für jede zu untersuchende Hefevariante eine 5 ml-Übernachtskultur in dem entsprechenden Selektionsmedium an. Man mischt die Übernachtskultur 1 min, um Zellklumpen aufzulösen. Sofort werden 2 ml der Übernachtskultur in 8 ml YPDA-Medium überführt. Diese Kultur wird für 3-5 h bei 30°C und 230-250 rpm inkubiert, bis die OD₆₀₀ 0,5-0,8 erreicht. Die genaue OD₆₀₀ zum Zeitpunkt der Zellernte muß notiert werden. Man nimmt 1,5 ml der Kultur und zentrifugiert sie bei 13.000 rpm für 30 sec ab. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellen werden in 1 ml Puffer 1 durch Mischen resuspendiert. Man zentrifugiert wieder bei 13.000 rpm für 30 sec, entfernt den Überstand und resuspendiert die Zellen in 300 µl Puffer 1. 0,1 ml dieser Zellsuspension überführt man in ein neues Reaktionsgefäß und friert dieses in flüssigem Stickstoff ein. Die Lösung wird bei 37°C wieder aufgetaut und weitere 2x eingefroren und aufgetaut. Nach dem letzten Gefriertau-Zyklus werden 0,7 ml Puffer 2 zugegeben und gemischt. Dies ist der Startzeitpunkt der Reaktion. 1 ml des Puffers 2 in einem gesonderten Gefäß dient als Leerwert. Wenn die Farbe der Proben gelb bis rot wird, fügt man 0,5 ml von 3 mM ZnCl₂ zu jedem Ansatz, um die

Farbentwicklung zu stoppen. Dies ist der Endzeitpunkt der Reaktion. Die Proben werden bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand wird in neue Gefäße überführt und die OD₅₇₈ wird gemessen. OD₅₇₈-Werte zwischen 0,25 und 1,8 liegen im linearen Bereich des Assays. Die β -Galactosidase-Einheiten berechnen sich folgendermaßen:

$$\beta\text{-Galactosidase-Einheiten} = \frac{1000 * OD_{578}}{t * V * OD_{600}}$$

t = gesamte Reaktionszeit des Assays

V = 0,1*5(Konzentrationsfaktor aus den Zentrifugations- und Resuspensionsschritten)

OD₆₀₀ = A₆₀₀ von 1 ml Kultur

Eine β -Galactosidase-Einheit (1 unit) ist nach Miller [Miller, 1972; Miller, 1992] als die Menge der β -Galactosidase definiert, die 1 μ mol CPRG zu Chlorphenol-Rot und D-Galactose pro Minute und pro Zelle hydrolysiert.

Lösungen für den β -Galactosidase-Assay mit CPRG als Substrat

- Puffer 1:*
- 2,38 g Hepes
 - 0,9 g NaCl
 - 0,065 g L-Aspartat (hemi-Mg-Salz)
 - 1,0 g BSA
 - 50 μ l Tween 20
- ad 100 ml mit H₂O bidest., pH 7,3, autoklavieren, bis zu 3 Monate bei 4°C lagerbar
- Puffer 2:*
- 27,1 mg CPRG (Chlorphenol-Rot- β -D-Galactopyranosid)
- (Endkonzentration 2,23 mM)
- ad 20 ml mit Puffer 1, sterilfiltrieren, bis zu 3 Monate bei 4°C im Dunkeln lagerbar