

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Hinweise

Die in der Arbeit verwendeten, geschützten Warenzeichen sind nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen einer Kennzeichnung kann demnach nicht geschlossen werden, dass der entsprechende Produktname frei von den Rechten Dritter ist.

Falls für einzelne Methoden und Inkubationsschritte keine Temperatur angegeben wurde, so ist bei Raumtemperatur gearbeitet worden. Alle Lösungen und Puffer wurden – falls nicht anders angegeben – mit ELIX-Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore hergestellt. Dieses Wasser hat einen Reinheitsgrad, der mit bidestilliertem Wasser vergleichbar ist. Die verwendeten Materialien für die Zellkultur und für die molekularbiologischen Methoden waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder sie wurden vor ihrer Benutzung in einem Autoklaven bei 120 °C für 20 min unter Dampf sterilisiert. Die für Zentrifugationsschritte angegebenen *g*-Zahlen beziehen sich auf den mittleren Radius der verwendeten Rotoren.

2.2 Geräte

2.2.1 Zell- und Bakterienkultur

- Begasungsbrutschrank BB 16; Heraeus-Christ, Hanau
- Brutschrank B 6060; Heraeus-Christ, Hanau
- Durchfluscytometer FACS Calibur; Becton Dickinson, Heidelberg
- Einfrierapparatur Nicool LM10; Air Liquide, Düsseldorf
- Elektroporator Gene Pulse II; Biorad, München
- Homogenisator nach Potter-Elvehjem; Braun, Melsungen
- Lichtmikroskop Axiovert 25; Zeiss, Jena
- Sterile Werkbank Herasafe HS 12; Heraeus-Christ, Hanau
- Stickstofftank zur Lagerung von Zellen M 305 CE; Taylor-Wharton, Hollywood, USA

- Warmlufttrumschüttler G 24 Environmental Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Edison, USA

2.2.2 Elektrophorese und Westernblot

- Entwicklerrmaschine Optimax Typ TR; MS Laborgeräte, Heidelberg
- *Tankblot*-Apparatur, Transblot-Cell SD; Bio-Rad, München
- Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele; CBS, Del Mar, USA

2.2.3 Zentrifugen

- Kühlzentrifuge EvolutionRC (SS 34- und GSA-Rotoren); Sorvall / Du Pont, Bad Homburg
- Tischzentrifuge 5415; Eppendorf, Hamburg
- Tischzentrifuge 5402, temperierbar; Eppendorf, Hamburg
- Ultrazentrifuge Optima L 90 K (70.1 Ti-Rotor); Beckman-Coulter, München
- Vakuumzentrifuge Centrivac; Heraeus-Christ, Hanau
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R; Heraeus-Christ, Hanau

2.2.4 Sonstige Geräte

- Analysenwaage BP 211 D; Sartorius, Göttingen
- Bertholdluminometer; Deelux Labortechnik, Gödendorf
- Feinwaage LC 821; Sartorius, Göttingen
- Mikroplattenschüttler IS 89; Wesbart LTD, GB
- Mikro-*Well*-Waschvorrichtung Nunc-Immuno Wash 8; Nunc, Wiesbaden
- Mikroplattenphotometer SpectraMax 340 PC; Molecular Devices, Sunnyvale, USA
- pH-Meter pH 526 Multical; WTW, Weilheim
- Photometer DU 640; Beckman-Coulter, München
- Quarzküvette; Perkin-Elmer, Weiterstadt
- Sequenzierautomat ABI Prism 310; Perkin Elmer, Weiterstadt
- *Thermocycler* Trio-Thermoblock; Biometra, Göttingen
- Wasseraufbereitungsanlage; Millipore, Neu Isenburg

2.3 Verbrauchsmaterialien

2.3.1 Zell- und Bakterienkultur

- Ampicillin; Sigma, Deisenhofen
- Blastocidin; Invitrogen, Karlsruhe
- Difco Trypton-Pepton; Beckton-Dickinson, Sparks, USA
- DMEM-Medium mit Glutamax (Dulbecco's modified Eagle Medium mit L-Alanyl-L-Glutamin); Gibco BRL, Eggenstein
- Dulbecco-PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ; Gibco BRL, Eggenstein
- Dulbecco-PBS⁺⁺ mit Ca^{2+} (0,9 mM) und Mg^{2+} (0,5 mM); Gibco BRL, Eggenstein
- EDTA (Versen); Biochrom KG, Berlin

- Elektroporationsküvette; Biorad, München
- Fötale Kälberserum (FCS); Biochrom KG, Berlin
- Geneticin (G418); Gibco BRL, Eggenstein
- Hefeextrakt; Roth, Karlsruhe
- Kanamycin; Sigma, Deisenhofen
- Penicillin G-Streptomycin (10 000 U/ml, 10 000 µg/ml); Gibco BRL, Eggenstein
- RPMI 1640-Medium mit Glutamax; Gibco BRL, Eggenstein
- Select-Agar; Gibco BRL, Eggenstein
- Trypsin-EDTA (0,25 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA); Gibco BRL, Eggenstein

2.3.2 Chemikalien

- Acrylamid Rotiphorese GEL 30, 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid; Roth, Karlsruhe
- Agarose NEEO Ultra; Roth, Karlsruhe
- Ammoniumpersulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$); Sigma, Deisenhofen
- ATP (25 mM); Epicentre Technologies, Madison, USA
- Brij 58 (Polyethylenglykolhexadecylether); Fluka, Neu-Ulm
- Bromphenolblau; Serva, Heidelberg
- Desferrioxamin (Deferoxaminmesylat); Sigma, Deisenhofen
- Desoxyribonukleotidtriphosphat Mix (je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Merck, Darmstadt
- EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin; Pierce, Köln
- Magermilchpulver Glücksklee; Nestlé, Frankfurt / Main
- β -Mercaptoethanol (2-Sulfanylethan-1-ol); Merck, Darmstadt
- Nonidet P-40 (NP-40); Sigma, Deisenhofen
- Natriumdodecylsulfat (SDS); Serva, Heidelberg
- 8-POE, Octylpolyoxyethylen; W. Kolb AG, Hedingen, Schweiz
- Ponceau S; Sigma, Deisenhofen
- TEMED (*N,N,N,N'*-Tetramethylethyldiamin); Sigma, Deisenhofen
- TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin); Merck, Darmstadt
- Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol); Merck, Darmstadt
- Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol); Sigma, Deisenhofen
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat); Sigma, Deisenhofen
- Wasserstoffperoxid; Merck, Darmstadt

Alle weiteren, nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden von den Herstellern Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

2.3.3 Antikörper

Primärantikörper

- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (OKT9) gegen humanen Transferrinrezeptor, gereinigt aus Zellkulturüberständen der Hybridomazelllinie OKT9; American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

- Monoklonaler Antikörper aus der Maus (H68.4) gegen die cytoplasmatische Domäne des humanen TfR; I. S. Trowbridge, Department of Cancer Biology, Salk Institute, San Diego, California, USA und Zymed, Bad Homburg
- Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (RAFL) gegen *firefly*-Luciferase; Sigma, Deisenhofen
- Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (pAB063) gegen den humanen TfR; R. Geßner, Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, Charité, Berlin
- Polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Biotin (Anti-Biotin); Sigma, Deisenhofen

Sekundärantikörper

- Kaninchen-IgG gegen Maus-IgG, HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiert (RAM*); DAKO, Hamburg
- Kaninchen-IgG gegen Ziegen-IgG, HRP konjugiert (RAG*); DAKO, Hamburg
- Schwein-IgG gegen Kaninchen-IgG, HRP konjugiert (SAR*); DAKO, Hamburg
- Ziegen-IgG gegen Mäuse-IgG, Rhodamin konjugiert (Rhodamin konjugierter GAM); Sigma, Deisenhofen

2.3.4 Enzyme

- Pwo-DNA-Polymerase (5 U/μl); Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim
- T4-Polynukleotidkinase (PNK, 10 U/μl); Epicentre Technologies, Madison, USA
- T4-DNA-Ligase (2 U/μl); Epicentre Technologies, Madison, USA
- Taq-DNA-Polymerase (1 U/μl); Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche-Diagnostics GmbH (Mannheim) oder New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

2.3.5 Proteaseinhibitoren

- 1,10-Phenanthrolin; Merck, Darmstadt
- Antipain; Sigma, Deisenhofen
- Chymostatin; Sigma, Deisenhofen
- EDTA; Merck, Darmstadt
- Elastatinal; Sigma, Deisenhofen
- FCI, Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlormethylketon; Alexis Biochemical's, Grünberg
- Humanes rekombinantes TIMP3; Calbiochem, Schwalbach
- Humanes TIMP1 isoliert aus Neutrophilen; Alexis Biochemicals, Grünberg
- Humanes TIMP2 isoliert aus Fibroblasten; Alexis Biochemicals, Grünberg
- Leupeptin; Sigma, Deisenhofen
- MMP-Inhibitor1; Calbiochem, Schwalbach
- MMP-Inhibitor2; Calbiochem, Schwalbach
- PefablocSC (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonsäurefluorid); Boehringer, Mannheim
- Pepstatin A; Sigma, Deisenhofen
- Phosphoramidon; Sigma, Deisenhofen
- TAPI2; Calbiochem, Schwalbach

2.3.6 Weitere Proteine

- Apo-Transferrin (apo-Tf), human; Sigma, Deisenhofen
- BSA; Sigma, Deisenhofen
- Ferri-Transferrin (ferri-Tf), human; Sigma, Deisenhofen
- Cyanbromid aktivierte Sepharose 4 *fast flow*; Amersham Biosciences, Freiburg
- Protein G-Sepharose CL-4B; Amersham Biosciences, Freiburg
- Streptavidin-Sepharose; Amersham Biosciences, Freiburg

2.3.7 Sonstiges Verbrauchsmaterial

- Filterpapier Whatman 3 MM; Whatman International Ltd., Maidstone, GB
- Module für Mikroplatten MaxiSorb U 16; Nunc, Wiesbaden
- Nitrocellulosemembranen 0,2 µm Porengröße; Sartorius, Göttingen
- Röntgenfilme Biomax MR-1; Kodak, Stuttgart
- Sterilfilter Minisart, Porengröße 0,2 µm; Sartorius, Göttingen

Sterile Einwegwaren, wie Pipetten, Schraubdeckelröhrchen und Gefäße für die Zell- und Bakterienkultur, wurden von den Firmen Falcon / Beckton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner (Nürtingen) bezogen.

2.4 Reagenziensätze und Molekulargewichtsmarker

- 100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker (bp: Basenpaare); Invitrogen, Karlsruhe
- 1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker (1 kb: 1 000 Basenpaare); Invitrogen, Karlsruhe
- ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und Template Suppression Reagenz; Perkin Elmer, Weiterstadt
- BCA- (2,2'-Bicinchoninsäure-) Proteinbestimmungsreagenz; Pierce, Köln
- Benchmark Protein-Molekulargewichtsmarker; Invitrogen, Karlsruhe
- Benchmark vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (*prestained*); Invitrogen, Karlsruhe
- Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System; Promega, Madison, USA
- Fugene Transfektionsreagenz; Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim
- Qiagen Plasmid Mini Kit; Qiagen, Hilden
- Qiaquick Gelextraktionskit; Qiagen, Hilden
- QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit; Stratagene, La Jolla, USA
- Renaissance Plus Chemolumineszenzreagenz; NEN Life Science Products, Boston, USA

2.5 Nukleotide und Primer

Synthetische Oligonukleotide für DNA-Sequenzierungen und PCR-Reaktionen wurden bei Metabion (Martinsried) oder BIG Biotech (Freiburg) bezogen (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Verwendete Oligonukleotide und Primer.

Bezeichnung	Sequenz
fTfR(+4)NcoI	GC GCC ATG GAT CAA GCT AGA TCA GC
rTfR(+431)NcoI	G CGC CAT GGT GCT GGT GAA GTC TGT
rTfR(+2272)XbaI, BstXI	GCT CTA GAC CAC GGT GGT GGG GTC AAT GTC CCA AAC GTC ACC
fTfR R100G	T AAA ACT GAG TGT GAG GAA CTG GCA GGA ACC GAG TCA
rTfR R100G	C CGG TGA CTC GGT TCC TGC CAG TTC CTC ACA CTC AGT
fTfR R100E	T AAA ACT GAG TGT GAG GGA CTG GCA GGA ACC GAG TCA
rTfR R100E	C CGG TGA CTC GGT TCC TGC CAG TCC CTC ACA CTC AGT
fTfR L101D	T AAA ACT GAG TGT GAG AGA GAC GCA GGA ACC GAG TCA
rTfR L101D	C CGG TGA CTC GGT TCC TGC GTC TCT CTC ACA CTC AGT
fTfR L101G	T AAA ACT GAG TGT GAG AGA GGT GCA GGA ACC GAG TCA
rTfR L101G	C CGG TGA CTC GGT TCC TGC ACC TCT CTC ACA CTC AGT
fTfR V108G	CCG GGG AGG GAG GAG CCA GGA GAG GAC TTC CCT GCA GCA C
rTfR V108G	G TGC TGC AGG GAA GTC CTC TCC TGG CTC CTC CCT CC
fTfR R109G	CCG GTG GGG GAG GAG CCA GGA GAG GAC TTC CCT GCA GCA C
rTfR R109G	G TGC TGC AGG GAA GTC CTC TCC TGG CTC CTC CCC CA
fT α (+292)Bsu36I, AgeI	T AAG AGC CCT CTG GCC CAG GCA GTC AGA TCA TCT TCT CGA
rT α (+327)Bsu36I, AgeI	C CGG TCG AGA AGA TGA TCT GAC TGC CTG GGC CAG AGG GCT C
fIR(+1491)Bsu36I, AgeI	T AAG ACA AGC CTC CCA GTG CAA GAT TCT TCT TCA GTA CCA
rIR(+1526)Bsu36I, AgeI	C CGG TGG TAC TGA AGA AGA ATC TTG CAC TGG GAG GCT TGT C
fTfR(+1918)cgt1936aaa	CAG TGG CTG TAT TCT GCT AAA GGA GAC TTC TTC CGT GCT AC
rTfR(+1958) cgt1936aaa	GT AGC ACG GAA GAA GTC TCC TTT AGC AGA ATA CAG CCA CTG
fTfR(+1923)g1940c	G CTG TAT TCT GCT CGT GCA GAC TTC TTC CGT GC
rTfR(+1955) g1940C	GC ACG GAA GAA GTC TGC ACG AGC AGA ATA CAG C
fTfR(+1926)c1944g	G TAT TCT GCT CGT GGA GAG TTC TTC CGT GCT ACT TC
rTfR(+1961) c1944g	GA AGT AGC ACG GAA GAA CTC TGC ACG AGC AGA ATA C

2.6 Vektoren

- pcDNA3, eukaryontischer Expressionsvektor; Invitrogen, Karlsruhe
- pcDNA6/V5-His B, eukaryontischer Expressionsvektor; Invitrogen, Karlsruhe
- pGEM-TR, eukaryontischer Expressionsvektor mit der cDNA des humanen TfR; M. Zerial, Max Planck Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden
- pGL3c, eukaryontischer Expressionsvektor mit der cDNA von *firefly*-Luciferase; Promega, Madison, USA
- pRLTK, eukaryontischer Expressionsvektor mit der cDNA von *renilla*-Luciferase; Promega, Madison, USA

2.7 Bakterienstämme

- *E. coli* DH5 α (Genotyp: F⁻ Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZY A-argF)U169 *endA1 recA1 hsdR17*(r_K⁻m_K⁺) *deoR thi-1 supE44 λ ⁻ gyrA96 relA1*)
- *E. coli* TOP 10 (Genotyp: F⁻ *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*)
- *E. coli* XL-1 blue (Genotyp: *supE44 hsdR17 recAI endAI gyrA96 thi relAI lac⁻ F' [proAB⁺ lacI^q lacZ Δ M15 Tn10 (tet^R)]*)

2.8 Zelllinien

- 697 (humane B-Zell-Vorläufer-Leukämiezelllinie); American Type Culture Collection (ATCC)
- BONNA-12 (humane lymphoblastäre Leukämiezelllinie); ATCC
- CEM (humane T-Zell-Leukämiezelllinie); ATCC
- HepG2 (humane Hepatokarzinomzellen); ATCC
- HL60 (humane promyeloische Leukämiezelllinie); ATCC
- Jurkat (humane T-Zell-Leukämiezelllinie); ATCC
- K562 (humane myeloische Leukämiezelllinie); ATCC
- LOUCY (humane T-Zell-Leukämiezelllinie); ATCC
- NC-NC (humane B-lymphoblastoide Leukämiezelllinie); ATCC
- TRVb-Zellen, CHO-Zelllinie (*chinese hamster ovary*) ohne endogene Transferrinrezeptoraktivität; Dr. T. E. McGraw, Cornell University, New York
- U937 (humane histiocytäre Leukämiezelllinie); ATCC

2.9 Pufferlösungen und Bakterienmedien

An dieser Stelle wird nur auf Puffer und Medien hingewiesen, die sehr häufig Verwendung finden. Alle anderen Puffer sind ausführlich in Verbindung mit der entsprechenden Methode beschrieben.

PBS: 150 mM NaCl; 8,33 mM Na₂HPO₄; 1,67 mM KH₂PO₄, pH 7,4

LB-Medium: 1 % (w/v) Difco Trypton-Pepton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt;
1 % (w/v) NaCl, pH 7,0
Antibiotikazusätze: Ampicillin 100 µg/ml
Kanamycin 50 µg/ml

LB-Agar: 1,5 % (w/v) Select-Agar in LB-Medium
Antibiotikazusätze: Ampicillin 50 µg/ml
Kanamycin 25 µg/ml

2.10 Zellbiologische Methoden

Alle Zelllinien wurden im Begasungsbrutschrank unter 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank mit steril verpackten Einwegartikeln oder mit bei 120 °C in Wasserdampf autoklavierten Materialien. Fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch durch Hitze inaktiviert (30 min, 56 °C).

2.10.1 Kultivierung von HepG2-Zellen und TRVb-Zellen

Kulturmedium A: DMEM-Medium mit Glutamax; 100 U/ml Penicillin G (Natriumsalz);
100 µg/ml Streptomycinsulfat; 10 % (v/v) FCS

Collagenlösung: Collagen A-Lösung (1 mg/ml),
1:10 verdünnt mit Dulbecco-PBS⁺⁺

EDTA-Lösung: EDTA für Zellkultur, 1:20 verdünnt mit Dulbecco-PBS⁺⁺

Die Kultivierung der adhärenenten Zelllinien erfolgte auf Gewebekulturplatten. Für HepG2-Zellen wurden diese zuvor Collagen beschichtet (Inkubation mit Collagenlösung für 10 min, anschließendes Waschen mit Dulbecco-PBS⁺⁺). Zum Umsetzen oder für weitere Versuche wurden die Zellen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen, mit Trypsin-EDTA oder, falls Trypsin störend wirkt wie bei der Färbung von Oberflächen-TfR, mit EDTA-Lösung inkubiert, durch leichtes Klopfen abgelöst und für die Weiterkultivierung in frischem Kulturmedium aufgenommen und dabei in der Regel 1:10 verdünnt. Sollte eine definierte Anzahl Zellen ausgesät werden, wurde die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

2.10.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Kulturmedium S: RPMI 1640-Medium mit Glutamax; 100 U/ml Penicillin G (Natriumsalz); 100 µg/ml Streptomycinsulfat; 10 % (v/v) FCS

Die leukämischen Zelllinien 697, BONNA-12, CEM, HL60, Jurkat; K562, LOUCY, NC-NC und U937 wachsen in Suspension. Die Kultivierung erfolgte in Kulturmedium S in Zellkulturflaschen. Das Medium wurde in der Regel alle drei Tage erneuert, wobei die Zellen auf eine Zelldichte von 1×10^5 /ml verdünnt wurden.

2.10.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfriermedium (2 ×): 40 % Kulturmedium; 40 % FCS; 20 % DMSO (Dimethylsulfoxid)

Zum Einfrieren wurden 5×10^6 Zellen in 0,5 ml Medium aufgenommen, mit 0,5 ml 2 × Einfriermedium gemischt und in Kryoröhrchen überführt, die in der Einfrierapparatur Nicool (30 min auf Stufe 3, 10 min auf Stufe 10) langsam abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen zügig in einem Wasserbad aufgetaut, in Medium (20 ml, 37 °C) resuspendiert, zentrifugiert ($200 \times g$, 5 min) und schließlich in Kulturmedium aufgenommen.

2.10.4 Transfektion von HepG2- und TRVb-Zellen

Die Transfektion von HepG2- und TRVb-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Fugene. Hierzu wurden 2×10^5 Zellen in eine 30 mm Kulturschale ausgesät. Das Transfektionsreagenz wurde nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. In der Regel sind 3 µl Fugene in 100 µl serumfreies Medium pipettiert worden. Nach 5 min Inkubation wurde dieser Ansatz zu 1 µg Pasmid-DNA gegeben, die zuvor über Anionenaustauscher-Chromatographie gereinigt wurde, anschließend weitere 15 min inkubiert und die gesamte Lösung in das Kulturmedium der Zelle getropft. Die Transfektion wurde nach 48 h im Immunoblot von Zelllysaten überprüft.

2.10.5 Transfektion von HL60-Zellen

HL60-Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert. Je Ansatz wurden 5×10^6 Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, mit frischem Kulturmedium gewaschen und in 330 µl Kulturmedium (vorgewärmt auf 37 °C) aufgenommen. In eine Elektroporationsküvette wurden 30 µg über Anionenaustauscherchromatographie gereinigte DNA (1 µg/µl) vorgelegt, die Zellsuspension zugegeben, 1 min sanft geschüttelt und 4,6 µl DMSO (1,25 % Endkonzentration) zugesetzt. Die Elektroporation erfolgte anschließend bei 290 V und 950 µF. Die Zellen wurden danach sofort in vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen, dem ebenfalls 1,25 % DMSO zugesetzt wurden. Nach 24 h wurde das DMSO durch Mediumwechsel entfernt und nach weiteren 24 h die Expression der Proteine im Immunoblot von Zelllysaten überprüft.

2.10.6 Selektion von transfizierten Zellen

Zur Selektion der transfizierten Zellen wurden Geneticin für Transfektion mit pcDNA3 und Blastocidin für pcDNA6 verwendet. Die optimale Konzentration des jeweiligen Antibiotikums wurde für jede Zelllinie austitriert (HepG2-Zellen 0,8 mg/ml Geneticin, 5 µg/ml Blastocidin; HL60 1,5 mg/ml Geneticin, 10 µg/ml Blastocidin; TRVb 10 µg/ml Blastocidin). Die Zellen wurden in Kulturmedium mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen kultiviert, jeden zweiten Tag mit frischem Medium versetzt und umgesetzt bevor sie konfluentes Wachstum erreichten. Für Geneticin war die Selektion nach 2 bis 3 Wochen beendet, für Blastocidin nach 7 bis 10 Tagen.

2.10.7 Immunfluoreszenz von HepG2- und TRVb-Zellen

Block-FS: 3 % (v/v) FCS; 1 % (v/v) Ziegen Serum in Dulbecco-PBS⁺⁺

Auf Deckgläschen ausgesäte HepG2- oder TRVb-Zellen wurden mit 3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert und anschließend mit 100 mM Glycin in PBS für 10 min inkubiert. In Versuchen, bei denen die Zellen permeabilisiert wurden, erfolgte die Fixierung der Zellen mit Methanol für 10 min bei -20 °C. Nach Blockierung mittels Block-FS für 30 min wurde zunächst OKT9 (80 ng in 100 µl Block-FS, 30 min) zugegeben, dann nach mehrfachem Waschen mit Block-FS mit Rhodamin konjugiertem Ziegen-anti-Maus-IgG (1:80 in Block-FS, 30 min) inkubiert und schließlich gründlich mit Block-FS, Wasser (zum Entsalzen) und Ethanol (zum Entwässern) gewaschen, bevor die Präparate auf Objektträgern fixiert wurden.

Für die Färbung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiertem ferri-Tf wurden die Zellen nicht fixiert und gleich nach der Blockierung statt mit erstem und zweitem Antikörper für 1 h mit ferri-Tf-FITC (0,4 µg in Block-FS) inkubiert.

2.10.8 Fluoreszenzdurchflusscytometrie

Block-FS: 3 % (v/v) FCS; 1 % (v/v) Ziegen Serum in Dulbecco-PBS⁺⁺

Die adhärenenten TRVb-Zellen (3×10^6 pro Ansatz) wurden mit 0,1 % EDTA in Dulbecco-PBS in Suspension gebracht (2.10.1). Anschließend erfolgte bei 4 °C die Blockierung der Zellen mit Block-FS für 30 min, sodann die Inkubation mit entweder OKT9-Antikörper (80 ng in 100 µl Block-FS, 30 min) oder als Kontrolle mit IgG1-Isotyp-Antikörper (80 ng in 100 µl Block-FS, 30 min), ein Waschschriff mit Block-FS und die Färbung mit FITC konjugiertem Ziegen-anti-Maus-IgG (1:80 in Block-FS, 30 min). Alternativ wurde mit ferri-Tf-FITC (0,4 µg in 100 µl Block-FS für 1 h) gefärbt. Schließlich wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen in Dulbecco-PBS im Durchflusscytometer analysiert und die Ergebnisse mit CellQuest-Software von Becton Dickinson ausgewertet.

2.10.9 Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Biotin

Biotin-Lösung: 0,5 mg/ml EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin in Dulbecco-PBS⁺⁺

Die Markierung von Zelloberflächenproteinen erfolgte in Anlehnung an die Methode von Altin *et al.* [8]. Eine Kulturplatte mit 1×10^7 Zellen wurde dreimal mit eiskaltem Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen, bei 4 °C für 30 min mit 5 ml frisch zubereiteter Biotin-Lösung inkubiert, erneut dreimal gewaschen und die auf ihr befindlichen Zellen, wie in 2.11.1 beschrieben, lysiert.

2.11 Proteinchemische Methoden

2.11.1 Lyse von Zellen

Lysepuffer PBSX: 1 % Triton X-100 in PBS

PefablocSC-Stammlösung: 100 mM PefablocSC

PIC-Mix: je 1 mg/ml Antipain, Leupeptin, Pepstatin, Chymostatin

Je nach Bedarf wurde dem Lysepuffer PefablocSC-Stammlösung (1:100) und PIC-Mix (1:200) zugesetzt. Die zu solubilisierenden Zellen wurden zweimal mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen, anschließend bei 4 °C in PBSX (500 µl für 1×10^7 Zellen) abgelöst und für mindestens 30 min bei 4 °C geschüttelt. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei $20\,000 \times g$, 20 min, 4 °C. Der Überstand wurde als Lysat für die Experimente verwendet.

2.11.2 Luciferaseassay

Der Luciferasetest wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen ($1,5 \times 10^6$) mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen, in 500 µl Passivem Lysepuffer (im Reagenziensatz enthalten) für 30 min lysiert und ihre unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation bei $20\,000 \times g$, 30 s entfernt. Die Messung der Luciferaseaktivität in den Lysaten (10 µl) erfolgte mit dem Luminometer. Nach Injektion des Substratmixes (50 µl) und 10 s Messzeit für *firefly*-Luciferaseaktivität wurde die Stop & Glo-Lösung (50 µl) injiziert und erneut 10 s zur Bestimmung der *renilla*-Luciferaseaktivität gemessen. Zwischen Injektion und Messung wurde eine Verzögerungszeit von 2 s festgelegt. Für die Messung der Luciferaseaktivität im Zellüberstand wurde zur Kultivierung der Zellen Medium ohne Phenolrot verwendet, welches die Messung beeinträchtigt hätte. Die Aktivität kann so direkt aus dem Kulturmedium bestimmt werden.

2.11.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte mit Hilfe der BCA-Methode [188]. Auf einer Mikroplatte wurden in Doppelbestimmung jeweils 10 µl proteinhaltige Probe mit 200 µl, nach Herstellerangaben frisch zubereitetem Reagenz versetzt. Nach 30 min Inkubation

bei 37 °C wurde die Absorption bei 562 nm im Mikroplattenphotometer SpectraMax 340 PC vermessen und die Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve mit BSA bestimmt.

2.11.4 Denaturierende Proteinfällung mit Aceton

Zur Proteinlösung wurde das 4fache Volumen Aceton zugesetzt, nach Inkubation für 30 min bei –20 °C zentrifugiert (20 000 × g, 10 min) und das gefällte Protein schließlich in einer der Proteinmenge entsprechenden Menge Puffer oder Wasser aufgenommen.

2.11.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- 4 × SDS-Probenpuffer: 250 mM Tris / HCl, pH 6,8; 8 % (w/v) SDS;
 40 % (v/v) Glycerol; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau;
 8 % (v/v) β-Mercaptoethanol (nur bei reduzierendem Auftrag)
- Elektrophoresepuffer: 20 mM Tris / HCl, pH 8,8; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris / HCl, pH 8,8; 0,4 % (w/v) SDS
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris / HCl, pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
- APS: 10 % (w/v) (NH₄)₂S₂O₈

Alle SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurden mit dem Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele modifiziert nach der Methode von Laemmli durchgeführt [111]. Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen für das 4,5 % Sammelgel und das 7,5 % oder 12 % Trenngel ist im folgenden Pipettierschema dargestellt (Tabelle 2-2). Die Proben wurden mit einem Drittel ihres Volumens 4 × SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min im Wasserbad gekocht. Zusätzlich zu den Proben wurde Benchmark Proteinmolekulargewichtsmarker zur Molekulargewichtsbestimmung aufgetragen. Die Trennung der Proteingemische erfolgte in Elektrophoresepuffer für 70 min bei einer Stromstärke von 18 mA pro Gel und einer Spannung von maximal 180 V.

Tabelle 2-2: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgele.

Lösungen	Sammelgel (4,5 %)	Trenngel (7,5 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamid	360 µl	2,50 ml	4,00 ml
Sammelgelpuffer	600 µl	—	—
Trenngelpuffer	—	2,50 ml	2,50 ml
TEMED	4 µl	5 µl	5 µl
APS	12 µl	50 µl	50 µl
Wasser	1,4 ml	5,00 ml	3,50 ml

2.11.6 Immunoblot

Blotpuffer:	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 10 % Ethanol
Ponceau S-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S; 1 % (v/v) Essigsäure
Blockierlösung:	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS
PBSB:	0,2 % (w/v) Brij 58 in PBS
PBSB-Block:	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBSB
<i>Stripping</i> -Puffer:	62,5 mM Tris / HCl, pH 6,7; 2 % (w/v) SDS; 100 mM β -Mercaptoethanol

Nach Äquilibrierung des ungefärbten Polyacrylamidgeles in Blotpuffer für 10 min erfolgte der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran im Nassverfahren mit Hilfe einer *Tankblot*-Apparatur für 45 min (bei kleinen Proteinen unter 30 kD 30 min) bei 80 V. Anschließend konnte die Nitrocellulosemembran für 1 min mit der Ponceau S-Färbelösung inkubiert und mehrfach mit Wasser gewaschen werden, um gleichmäßigen Proteinauftrag zu überprüfen.

Für die spezifische Immunfärbung wurde die Membran mit den fixierten Proteinen 30 min in Blockierlösung, 1 h mit dem ersten Antikörper in PBSB-Block und 30 min mit einem HRP konjugiertem Sekundärantikörper in PBSB-Block inkubiert (Tabelle 2-1). Nach jeder Antikörperbehandlung wurde die Blotmembran intensiv gewaschen (mindestens 4×10 min) und schließlich für 1 min mit Chemolumineszenzreagenz inkubiert, kurz mit Filterpapier getrocknet und in eine Filmkassette gelegt. Auf Röntgenfilmen konnten nun die so spezifisch gefärbten Proteine nachgewiesen werden. Falls auf der Membran erneut Proteine mit einer anderen Antikörperkombination nachgewiesen werden sollten, so wurden die vorhandenen Antikörper durch Inkubation mit *Stripping*-Puffer von der Membran gelöst (50 °C, 30 min) und nach mehrfachem Waschen mit PBSB eine zweite Immundetektion begonnen.

Tabelle 2-3: Antikörperverdünnungen für die Immundetektion.

Antikörper	Verdünnung	Antikörper	Verdünnung
RAFL	1:1000	SAR*	1:2000
Anti-Biotin	1:10000	RAG*	1:2000
H68.4	1:3000	RAM*	1:2000
OKT9	1:3000		

2.11.7 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Blockierlösung: 3 % (v/v) FCS; 10 % (w/v) BSA in PBS

PBST: 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS

Citratpuffer: 40 mM Natriumcitrat / NaOH, pH 3,95

TMB-Lösung: 2 % (w/v) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Ethanol / DMSO (je ein Volumenteil)

Färbelösung: vor Gebrauch ansetzen und filtrieren: 100 µl TMB-Lösung,
3 µl H₂O₂ (30 %) in 10 ml Citratpuffer

Stopplösung: 2 M H₂SO₄

Für den ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) wird ein spezifischer Bindungspartner des zu quantifizierenden Proteins an eine feste Phase gebunden (Beschichtung) und über Antikörper sensitiv nachgewiesen. In dieser Arbeit erfolgte die Beschichtung auf MaxiSorb Modulen entweder mit OKT9-Antikörper oder mit ferri-Tf. Nach Blockierung der Moduloberfläche und Inkubation der TfR-haltigen Probe wurde gebundener TfR mit pAB063-Antikörper und HRP konjugiertem SAR* markiert. Jedem Inkubationsschritt folgte eine Waschprozedur mit PBST (3 × waschen mit Nunc-Waschkamm, 5 min Inkubation, erneut 3 × waschen). Die Peroxidase des Sekundärantikörpers wurde durch eine Farbreaktion mit TMB detektiert, die durch Schwefelsäure gestoppt wurde. Der entstandene Farbstoff ist bei einer Absorption von 450 nm (Referenz 492 nm) im Mikroplattenphotometer SpectraMax 340 PC vermessen worden. Die Quantifizierung erfolgte anhand von gereinigtem TfR aus Plazenta. Alle Bestimmungen wurden in der Regel in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die einzelnen Inkubationsschritte und Verdünnungen sind in Tabelle 2-4 aufgeführt, wobei sich die Volumina und Mengen auf jeweils eine Vertiefung beziehen.

Tabelle 2-4: ELISA-Standardschema.

Inkubation	Zeit	Volumen	Substanz	Verdünnung
Beschichtung	120 min	100 µl	OKT9 oder ferri-Tf	250 ng bzw. 500 ng
Blockierung	30 min	150 µl	Blockierungslösung	
Ligand	150 min	100 µl	Probe	
1. Antikörper	60 min	100 µl	pAB063	1:1000
2. Antikörper	60 min	100 µl	SAR*	1:2000
Färbelösung	nach Sicht	100 µl	TMB-Färbelösung	
Stopplösung		+ 50 µl	Stopplösung	

2.11.8 Liliom-Plot

Die Erstellung des Liliom-Plot erfolgte in Anlehnung an die Studien von Liliom *et al.* [122]. Mittels Ligand-Rezeptor-ELISA (2.11.7) wurde die Bindung des TfR an ferri-Tf anhand der Absorption A im Gleichgewicht für TfR-Konzentrationen c_{TfR} von 17 pM bis 56 nM bestimmt. Die maximal mögliche Bindung entsprechend der Absorption A_{max} wurde mathematisch durch Erstellen einer Regressionskurve ermittelt. Für die Bindung des TfR an ferri-Tf kann nach der Gleichung:

$$1 / (1 - A / A_{\text{max}}) = 1/K_D \cdot c_{\text{TfR}} \cdot A_{\text{max}}/A + n \quad (n, \text{ Schnittpunkt mit Y-Achse})$$

die Dissoziationskonstante K_D anhand des Anstiegs berechnet werden, indem $c_{\text{TfR}} \cdot A_{\text{max}}/A$ gegen $1 / (1 - A / A_{\text{max}})$ geplottet wird.

2.11.9 Darstellung von Transferrin-Sepharose

Kopplungspuffer: 100 mM NaHCO₃, pH 8,3; 500 mM NaCl

Blockierlösung: 1 M 2-Aminoethanol / HCl, pH 8,0

PBS / Fe: 1 mg/ml Eisenammoniumcitrat in PBS, pH 7,5; 1 mM NaHCO₃

In 1 mM HCl vorgequollene Cyanbromid aktivierte Sepharose 4B (900 mg in 40 ml, 15 min) wurde mit 200 ml Kopplungspuffer gewaschen und mit 50 mg apo-Tf inkubiert (5 ml, 2 h, über Kopf geschüttelt). Nach Entfernung der Transferrinlösung wurde erneut mit 200 ml Kopplungspuffer gewaschen und restliche Bindungsstellen mit Blockierlösung abgesättigt (10 ml, 2 h über Kopf geschüttelt). Die Beladung mit Eisen erfolgte nach drei Waschschritten mit 500 ml Kopplungspuffer, 200 ml Wasser und 200 ml PBS in PBS / Fe (10 ml, 1 h, über Kopf geschüttelt). Schließlich wurde mit 200 ml PBS gewaschen und das Gelmaterial in 5 ml PBS suspendiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

2.11.10 Immunpräzipitation

Kopplungspuffer: 1 % (v/v) NP-40; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % (w/v) BSA in 10 mM Tris / HCl, pH 8,0

Waschpuffer A: 500 mM NaCl; 1 mM EDTA;
1 % NP-40 in 50 mM Tris / HCl, pH 8,0

Waschpuffer B: 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % NP-40;
0,1 % SDS in 50 mM Tris / HCl, pH 8,0

Waschpuffer C: 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % NP-40;
0,5 % SDS in 50 mM Tris / HCl, pH 8,0

Alle Inkubationen erfolgten auf einem Überkopfschüttler. Nach Inkubationen und zum Waschen wurde die verwendete Sepharose bei 1000 × g für 1 min abzentrifugiert und der Überstand entfernt.

Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml Kopplungspuffer wurden je Ansatz 15 µl Protein A- (für RAFL) oder Protein G-Sepharose (für OKT9) mit 5 µl Antikörper für 1 h inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Die Präzipitation der Zielproteine (in der Regel Zellysate oder Zellkulturüberstand) erfolgte nun durch Zugabe der Antikörper-Sepharose und Inkubation bei 4 °C für mindestens 1 h. Anschließend wurde die Sepharose in mehreren Schritten mit jeweils 1 ml Puffer gewaschen: einmal mit Waschpuffer A, zweimal mit Waschpuffer B, einmal mit Waschpuffer C und einmal mit PBS. Durch Zugabe von 2 × konzentriertem SDS-Probenpuffer (siehe 2.11.5) und 5 min Kochen wurden die Immunkomplexe von der Sepharose gelöst, danach in der SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich im Immunoblot analysiert.

2.11.11 Fällung des Serumtransferrinrezeptors mittels Transferrinpräzipitation

Waschpuffer PBSX: 1 % Triton X-100 in PBS

Alle Inkubationen erfolgten auf einem Überkopfschüttler. Nach jeder Inkubation und zum Waschen wurde die verwendete Sepharose bei $1000 \times g$ für 1 min abzentrifugiert und der Überstand entfernt.

Je Ansatz wurden 20 µl Transferrinsepaharose (siehe 2.11.8) zweimal in 1 ml PBSX gewaschen und der Probe zugesetzt. Nach Inkubation über Nacht wurde die Transferrinsepaharose dreimal mit PBSX und einmal mit PBS gewaschen. Die Ablösung des sTfR erfolgte durch 5 min Kochen der Probe in 2 × Probenpuffer. Anschließend wurde in der SDS-PAGE aufgetrennt und der sTfR mittels OKT9 im Immunoblot analysiert.

2.11.12 Membranpräparation durch differentielle Zentrifugation

Homogenisierungspuffer: 1:10 (v/v) Dulbecco-PBS⁺⁺

Solubilisierungspuffer PBSX: 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS

Zur Isolierung von Membranfraktionen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Homogenisierungspuffer inkubiert (2×10^6 Zellen/ml, 10 min). Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Schritte bei 4 °C durchgeführt. Der Homogenisierungspuffer wurde entfernt und die Zellen in 500 µl frischem Homogenisierungspuffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Zellsuspension in einem Teflon-Glas-Homogenisator für 3 min bei 1500 rpm und ein Waschschrift mit weiteren 500 µl Homogenisierungspuffer. Die homogenisierte Suspension (1000 µl) wurde zentrifugiert ($500 \times g$, 15 min), und der Überstand 1 erneut zentrifugiert ($2600 \times g$, 15 min). Die Zentrifugation des Überstands 2 erfolgte in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge ($100\,000 \times g$, 30 min). Das gebildete Pellet, die mikrosomale Membranfraktion, wurde mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert ($100\,000 \times g$, 10 min) und entweder in Solubilisierungspuffer aufgenommen oder in PBS resuspendiert. Der Überstand 3 des Hochgeschwindigkeitszentrifugationsschrittes entspricht der Cytosolfraktion. Die Proteine dieser Fraktion wurden durch Acetonfällung (2.11.4) aufkonzentriert.

2.12 Molekularbiologische Methoden

2.12.1 Agarosegelelektrophorese

TAE: 40 mM Tris / Essigsäure; 1 mM EDTA

6 × DNA-Probenpuffer: 60 % (w/v) Saccharose; 20 mM EDTA;
0,02 % (w/v) Bromphenolblau

EtBr-Lösung: 1 % (w/v) Ethidiumbromid

Die Agarose (1–2 % (w/v) je nach Größe der DNA-Fragmente) wurde durch Erhitzen in 50 ml TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf ca. 55 °C mit 1 µl EtBr-Lösung versetzt. Nach Gießen und Erkalten des Geles erfolgte der Probenauftrag in der Gelapparatur des Mini Sub Cell GT-Systems. Dazu wurden die Proben mit einem fünftel ihres Volumens an DNA-Probenpuffer versetzt und in die Gelvertiefungen überführt. Zur Größenbestimmung wurde zusätzlich ein DNA-Molekulargewichtsmarker (100 bp oder 1 kb) aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Gemische erfolgte bei einer Spannung von 80 V über ca. 45 min in TAE-Puffer.

2.12.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mittels Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gelextraktionskit nach Herstellerangaben aus der Agarose isoliert und durch Silikasäulchen aufgereinigt. Die Elution von den Säulchen erfolgte mit 25 µl Qiagen-Elutionspuffer.

2.12.3 Restriktionsverdau

DNA-Spaltungen mittels Restriktionsendonukleasen erfolgten in der Regel in 20 µl Ansätzen in vom Hersteller mitgelieferten, enzymespezifischen Puffern, denen stets BSA (Endkonzentration 100 µg/ml) zugesetzt wurde. Pro µg DNA wurde 1 U Enzym je Schnittstelle verwendet. Die Inkubation erfolgte bei den empfohlenen Temperaturen für 1–16 h.

Im Falle einer anschließenden Klonierung wurde die verdaute DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Gelextraktion isoliert (siehe 2.12.2). Für weitere Verdauschritte reichte eine Hitzeinaktivierung der im ersten Schritt eingesetzten Enzyme entsprechend den Herstellerangaben.

2.12.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligasepuffer (10 ×): 330 mM Tris / Essigsäure, pH 7,8; 660 mM Kaliumacetat; 100 mM Magnesiumacetat; 5 mM DTT

Zur Ligation wurden linearisierter Vektor (20–50 ng) und DNA-Fragment (Insert, 3–10fach molekularer Überschuss gegenüber dem Vektor) auf Eis gemischt. Nach Zusatz von Wasser (Endvolumen 10 µl), ATP (Endkonzentration 2,5 mM für Ligation von Überhängen, 0,5 mM

für Ligation ohne Überhänge), Ligasepuffer (1 ×) und T4-DNA-Ligase (2 U) erfolgte die Ligation durch Inkubation bei 16 °C (4–16 h).

Der Erfolg einer Ligation wurde nach Transformation in Bakterienzellen durch Minipräparation von Plasmid-DNA und anschließender Restriktionsanalyse überprüft.

2.12.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

TSS: 85 % (v/v) LB-Medium; 10 % (w/v) PEG 8000; 5 % (v/v) DMSO; 50 mM MgCl₂

Eine Übernachtskultur der Bakterien in LB-Medium (4 ml, Inkubation bei 37 °C, 220 rpm für 12 bis 16 h) wurde in 500 ml LB-Medium überführt und weiter inkubiert (37 °C, 170 rpm) bis eine OD₅₇₈ = 0,4 erreicht war. Das Bakterienpellet (3 300 × g, 10 min, 4 °C) wurde in TSS (10 ml) aufgenommen, gut suspendiert und mit Glycerol (2 ml) versetzt. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

2.12.6 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Kompetente Bakterienzellen (75 µl) wurden entweder mit gereinigter Plasmid-DNA (ca. 20 ng) oder mit Ligationsansatz (5 µl) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 s, 42 °C) erfolgte erneut eine Inkubation auf Eis (5 min). Nach Zugabe von vorgewärmten LB-Medium (750 µl) wurde unter Schütteln inkubiert (1 h, 170 rpm, 37 °C), bevor 100 µl des Transformationsansatzes oder die gesamte durch Zentrifugation (1 000 × g, 5 min) aufkonzentrierte Bakterienmenge auf LB-Agarplatten ausgestrichen wurde.

Zur Selektion transformierter Bakterien enthielten die Agarplatten das Antibiotikum, dessen Resistenzgen im Plasmid integriert war (Ampicillinkonzentration 50 µg/ml, Kanamycin 25 µg/ml).

2.12.7 Gefrierkulturen von *E. coli*

Zur Herstellung einer Gefrierkultur wurde eine frische Übernachtskultur (750 µl, kultiviert in LB-Medium) mit Glycerol (250 µl) versetzt und bei –80 °C eingefroren.

Die Reaktivierung erfolgte durch Übertragung kleiner Mengen an Bakterien in 4 ml LB-Medium (antibiotikahaltig) mittels steriler Pipettenspitze und nachfolgende Kultivierung dieser Bakterienlösung bei 37 °C.

2.12.8 Präparation von Plasmid-DNA

Puffer P 1: 50 mM Tris / HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A

Puffer P 2: 200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS

Puffer P 3: 3 M Kaliumacetat, pH 5.5

Trispuffer: 10 mM Tris HCl, pH 8,0

Für die Aufreinigung kleiner DNA-Mengen zur weiteren Klonierung wurden Minipräparationen durchgeführt. Transfektionen in eukaryontische Zellen erforderten größere DNA-Mengen mit hohem Reinheitsgrad. Hierfür wurden Midipräparationen durchgeführt.

Die Plasmidpräparation durch alkalische Lyse [27] erfolgte in Anlehnung an das Qiagen Plasmid Kit-Protokoll. Die Puffer P 1 bis P 3 (Qiagen) wurden nach Herstellerangaben verwendet, anschließend erfolgte für Midipräparationen die Reinigung der DNA über Anionenaustauschersäulen und eine anschließende Fällung mit Isopropanol nach Herstellerangaben. Nach einem Waschschrift mit 70 % Ethanol wurde das Pellet in 100 µl Trispuffer gelöst. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte durch photometrische Analyse.

Konzentration: $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg dsDNA} / \text{ml Lösungsmittel}$

Reinheit: $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} = 1,8 \text{ bis } 2,0$ [126]

Bei Minipräparationen erfolgte nach Anwendung der Puffer P1 bis P3 eine Ethanol-fällung. Dazu wurde die DNA zunächst aus dem Überstand (450 µl) durch Zusatz von Ethanol gefällt (900 µl) und abzentrifugiert ($20\,000 \times g$, 10 min, 4 °C), anschließend das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen ($20\,000 \times g$, 5 min, 4 °C), bei 37 °C getrocknet und in 30 µl Trispuffer resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

2.12.9 Vorbereitung von Oligonukleotiden zur Klonierung

5'-Phosphorylierung: Die Oligonukleotide (2 µl, 10 µM) wurden mit ATP (1 mM Endkonzentration), PNK-Puffer (2 µl, entspricht Ligasepuffer, siehe Abschnitt 2.12.4), T4-Polynukleotidkinase (5 U) und Milli Q-Wasser (Endvolumen 20 µl) gemischt. Nach Inkubation (37 °C, 2 h) wurde die T4-Polynukleotidkinase durch Hitze inaktiviert (5 min, 95 °C).

Hybridisieren: Die Phosphorylierungsansätze der zusammengehörigen Oligonukleotide wurden vereinigt, auf 95 °C im Heizblock erhitzt und dort durch Ausschalten der Heizquelle langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die hybridisierten Oligonukleotide konnten anschließend direkt für eine Ligation verwendet werden.

2.12.10 Polymerasekettenreaktion

In der Regel wurden in einem Reaktionsansatz von 20 µl 50 ng bis 200 ng DNA, je 10 pmol sequenzspezifische Primer, je 4 µmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP in dem vom Polymerasehersteller empfohlenem Puffer gemischt und 2 U Pwo-Polymerase zugesetzt. Die Polymerasekettenreaktion erfolgte nach einem Denaturierungsschritt (3 min, 96 °C) in 25 Zyklen mit 30 s 96 °C Denaturierung, 30 s Primeranlagerung bei 55 bis 65 °C je nach Primerlänge und Zusammensetzung und 2 min Strangverlängerung bei 72 °C, im Anschluss wurde noch einmal 5 min bei 72 °C polymerisiert und auf 15 °C abgekühlt.

Für das Einfügen von Mutationen in ein Plasmid mittels QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit wurden der nach Herstellerangaben empfohlene PCR-Ansatz halbiert und auf 95 °C erhitzt. Nach Zugabe der Pfu Turbo-Polymerase erfolgt die Polymerasekettenreaktion nach folgendem Temperaturzyklus: [95 °C, 30 s; 50 °C, 1 min; 68 °C, 12 min] 25 ×; 72 °C, 7 min; 15 °C. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.12.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung folgt der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* [178], wobei zur Detektion Fluoreszenz markierte ddNTPs eingesetzt wurden.

Plasmid-DNA (ca. 1 µg oder 2 µl Plasmid-Minipräparation), der Sequenzierprimer (10 pmol), Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (4 µl) und Milli Q-Wasser (Endvolumen 10 µl) wurden gemischt und anschließend in einem *thermocycler* Trio-Thermoblock folgendem Temperaturzyklus ausgesetzt: 96 °C, 1 min; [96 °C, 10 s; 50 °C, 5 s; 60 °C, 4 min] × 25; 60 °C, 2 min; 16 °C. Die Aufreinigung des Ansatzes erfolgte mittels Zentrifugation durch eine vorzentrifugierte (700 × g, 1 min) Centriflex Gelfiltrationssäule (700 × g, 2 min), Einengung des Durchlaufs auf etwa 1–3 µl (ca. 15 min) in einer Centrivac-Zentrifuge und der Suspendierung in Template Suppression Reagenz (20 µl) mit anschließender Inkubation bei 96 °C für 3 min, sowie der abschließenden Sequenzierung durch einen ABI Prism 310.