

2.0 Material und Methoden

2.1 Probengewinnung

Seehasen der Art *Aplysia punctata* wurden von der „Station Biologique Roscoff“ in Frankreich bereitgestellt. Die Tiere wurden dem Meerwasserbecken entnommen und kurz mit frischem Meerwasser abgespült, dann wurden die Seitenflächen vorsichtig „beklatscht“. Sobald die beginnende Tintensekretion wahrgenommen wurde (meist begleitet von einem üblen Geruch), wurden die Tiere in kleine Glastiegel gesetzt, in denen etwa 5 ml sterilfiltriertes Seewasser vorgelegt waren. Die Sekretion wurde vom Tier abgespült und dieses zurück ins Meerwasserbecken gebracht. Je nach Farbintensität und Schleimbeimengung wurde die „native Tinte“ dann in 50 ml-Röhrchen getrennt gesammelt und bei -80 °C eingefroren.

Die Sektion der Tiere zur Gewinnung isolierter Gewebe folgte der im Internet beschriebenen Anleitung (<http://www.science.lander.edu/rsfox/310aplysiaLab.html>) für *A. brasiliana*. Dazu wurden die Tiere, je nach Größe, durch Injektion von 5 bis 10 ml einer sterilen 380 mM Magnesiumchlorid-Lösung anaesthetisiert, und der Körper durch einen dorsalen Schnitt längs der Körperachse eröffnet. Sofort wurden alle erkennbaren Ganglien und Nervenbahnen zerstört und Mantelgewebe, Nidamental-, Opalin- und Verdauungsdrüse unter sterilfiltriertem Meerwasser freipräpariert. Die isolierten Gewebe wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2 Bakterien und Agar-Diffusionstest

2.2.1 Bakterienkultur

Für alle Experimente und Klonierungsschritte wurden *E.coli* des Stammes DH5 α eingesetzt. Diese wurden standardmäßig in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Top-Agar bestand aus 0,7 g Bacto-Agar / 100 ml LB-Medium.

2.2.2 Agar-Diffusionstest mit *E.coli*

Die antibiotische Wirkung der nativen Tinte wurde in einem Agar-Diffusionstest festgestellt. Dazu wurden 200 μ l einer *E.coli*-Suspension mit 3 ml auf 45 °C vorgewärmten Top-Agar vermischt und zügig auf einer ebenfalls vorgewärmten, antibiotikafreien LB-Agar-Petrischale verteilt. Auf ausgestanzte Filterpapiere (autoklaviert) wurden jeweils 3 μ l einer Antibiotikaverdünnung (Kanamycin, 50 – 5000 μ g/ml) bzw. nativer Tinte (1:1 = unverdünnt,

bis 1:1000) gegeben und diese auf den erkalteten Agar gelegt. Als Negativkontrolle wurden Filterpapiere nur mit H₂O beträufelt und aufgelegt. Nach einer Über-Nacht-Inkubation bei 37 °C wurden die im Bakterienrasen um die Filterpapiere gebildeten Hemmhöfe fotografisch festgehalten. Da es sich um eine rein qualitative Aussage handelte, wurde auf eine Angabe des Durchmessers verzichtet.

2.3 Zellkultur und Toxizitätsassays

2.3.1 Zellkultur und spezielle Medien

Jurkat-T-Lymphozyten wurden in RPMI-Medium inkl. 10% FKS ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert, die Standardbrutbedingungen von 37 °C und 5% CO₂ wurden eingehalten. Dreimal pro Woche wurde die Zellsuspension auf ein Inoculum von 1x10⁵/ml verdünnt, um eine regelmäßige Proliferation zu gewährleisten. Für Experimente wurde aus dieser Kultur ein Aliquot entnommen, die Zellen wurden abzentrifugiert und mit frischem RPMI auf eine Zelldichte von 5x10⁵/ml eingestellt.

Für Lumineszenzexperimente wurden Zellen zentrifugiert, einmal mit sterilem PBS gewaschen und in einer Dichte von 5x10⁷/ml in sterilem KRG (siehe 2.3.9) resuspendiert. Für die Toxizitätsassays in Lysin/Arginin-freiem Medium wurden Zellen zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in einem selbst zusammengestellten Medium auf eine Konzentration von 5x10⁵ Zellen/ml eingestellt. Lysin/Arginin-freies Medium bestand aus KRG, FKS, Nichtessentiellen Aminosäuren, Vitaminen, Glutamin und den weiteren Aminosäuren Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin entsprechend ihren Konzentrationen in Vollmedium. Das entsprechende Kontrollmedium inkl. Lysin/Arginin enthielt zusätzlich die beiden fehlenden Aminosäuren.

2.3.2 Behandlung der Zellen

Für die Zelltodinduktionsexperimente wurden 5x10⁵ Zellen in 800 µl Medium resuspendiert und durch Zugabe der entsprechenden Vorverdünnungen von nativer Tinte, aufgereinigtem APIT, L-Lysin- α -Oxidase, H₂O₂, Cycloheximid, anti-CD95-Antikörper, Doxorubicin und Catalase in Medium auf 1 ml Endvolumen eingestellt. Die Induktion für eine folgende durchflusszytometrische Analyse fand in 24-Well-Schalen statt. Für eine Quantifizierung des WST-1-Umsatzes wurden 5x10⁴ Zellen in 100 µl Endvolumen in 96-Well-Schalen ausgesät.

2.3.3 Mikroskopie und Trypanblau-Test

Die mikroskopischen Aufnahmen entstanden an einem inversen Leitz DM IRB-Mikroskop. Für die Trypanblaufärbung wurden Zellen 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0,2%) verdünnt und angefärbte Zellen sofort unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.3.4 Propidiumiodidfärbung und Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Membranintegrität nach Inkubation mit nativer Tinte bzw. APIT wurden Zellen wie oben beschrieben (2.3.2) inkubiert. Nach den angezeigten Zeiten wurden sie geerntet, abzentrifugiert und in 190 µl PBS resuspendiert. Nach Überführung in die dazu vorgesehenen Cytometrie-Röhrchen wurden der Zellsuspension noch 10 µl einer 20 µM Propidiumiodidlösung in PBS hinzugefügt, und dieser Ansatz wurde 10 min im Dunklen bei 4 °C inkubiert. Der Farbstoff wurde nun einfach durch weitere Zugabe von 800 µl PBS verdünnt und eine quantitative Analyse der Zellfärbung in einem Durchfluss-Zytometer vorgenommen.

Die Auswertung wurde mit der geräteeigenen Software (FloMax) vorgenommen. Als Grundlage dienen die „Zellzahl/Farbintensität“-Histogramme. Dies ist möglich, da beim Tinten-induzierten Zelltod keine Fragmentierung der Zellen stattfindet, und folglich jedes Zählereignis im Zytometer einer Zelle (Jurkat-T-Lymphozyt) entspricht.

2.3.5 TUNEL-Assay nach DNA-Strangbrüchen

Der „DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)“-Assay wurde entsprechend den Herstellerangaben (Promega, Technical Bulletin No. 235) durchgeführt.

2.3.6 Laddering-Assay nach DNA-Fragmentierung

Der Nachweis von Apoptose durch Analyse der DNA-Fragmentierung („Leiter“) folgte einem Protokoll von M. Herrmann (Herrmann, 1994). Ein kritischer Schritt besteht in der Abtrennung von intakter genomischer DNA des Zellkerns. Geschieht dies nicht mit der nötigen Sorgfalt, resultiert eine Überlagerung der „Leiter“ durch unspezifischen Schmier.

Lösungen:

Nr.	Name	Substanzbezeichnung	Endkonzentration
1	Lysis-Puffer	NP 40	1%
		EDTA	20 mM
		TRISCl, pH 7.5	50 mM

2	SDS (10%)	SDS H ₂ O	10 g/100 ml 90 ml
3	RNaseA-Lsg. (DNase-frei)	RNaseA in H ₂ O 10 bis 30 min gekocht!	25 mg/ml
4	ProteinaseK-Lsg.	ProteinaseK Glycerol TRIS·Cl, pH 7.5 Calciumacetat	15 mg/ml 40% 10 mM 1 mM
5	Ammoniumacetat-Lsg.	Ammoniumacetat	10 M
6	TE-Puffer	TRIS·Cl, pH 7.5 EDTA pH 8.0	10 mM 1 mM

Materialien:

Eis, kühlbare 1,5 ml-Reaktionsgefäß-Zentrifuge, eiskaltes Ethanol (100%), eiskaltes Ethanol (75%), alle Materialien zur Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA und deren Nachweis mit Ethidiumbromid.

Durchführung:

Jurkat-T-Lymphozyten in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml wurden, wie in 2.3.2 beschrieben, mit CHX (10 µg/ml) oder nativer Tinte (1:600) behandelt und über mehrere Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert (5 min, 2000 U/min, RT °C) und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellpelletts wurden nun auf Eis in 90 µl Lysispuffer (1) resuspendiert, und die Zellkerne wurden sofort abzentrifugiert (5 min, 4000 U/min, 4 °C). Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 10 µl einer 10%-igen SDS-Lsg. (2) hinzugefügt. Einer weiteren Zugabe von 25 µl RNase-Lsg. (3) folgten eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und daran anschließend ein Zusatz von 25 µl Proteinase K-Lsg. (4) und eine weitere Inkubation für 3 h bei 56 °C. Danach wurde ein halbes Volumen Ammoniumacetat (5) hinzugefügt (= 75 µl), gemischt und die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen (= 563 µl) eiskaltem, 100%-igem Ethanol gefällt (Inkubation bei -80 °C für 15 bis 30 min). Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 13.000 U/min, 4 °C) pelletiert und anschließend noch einmal mit eiskaltem 75%-igen Ethanol gewaschen. Nach Trocknung und Lösung in TE-Puffer (6) wurde die isolierte DNA auf einem 1,5%-igen Agarose-Gel elektrophoretisch nach Größe getrennt, und die einzelnen Fragmente durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

2.3.7 Proteomanalyse

Die 2DE-Analysen und die anschließende Identifizierung von Proteinen wurden von Jana Söhlke und Bernd Thiede vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie nach den in der Literatur beschriebenen Protokollen durchgeführt (Thiede, 2000; Thiede, 2001).

2.3.8 WST-1-Assay nach Zellvitalität

Um die Stoffwechselaktivität der Zellen - ein Maß für deren Vitalität - zu bestimmen, wurde ihnen nach dreistündiger Inkubation mit APIT, H₂O₂ oder Anti-CD95 das chromogene Substrat WST-1 in einer den Herstellerangaben (Roche) entsprechenden Konzentration zugesetzt. WST-1 ist ein Tetrazoliumsalz, das als Folge der Aktivität der zellulären Succinatdehydrogenase zu einem Formazan umgesetzt wird. Nach weiterer ein- bis dreistündiger Inkubation wurde die Absorption des umgesetzten Substrates bei 450 nm bestimmt und die Stoffwechselaktivität relativ zur Positivkontrolle mit unbehandelten Zellen angegeben.

Für die zeitliche Bestimmung des Zusammenbruchs von messbarem zellulären Stoffwechsel wurde den Zellen zeitgleich mit APIT auch WST-1 zugegeben und die Zunahme der Absorption bei 450nm in regelmäßigen Abständen aufgenommen.

2.3.9 Chemilumineszenz-Assay nach zellulärer ROS-Produktion

Die Messung der zellulären Produktion von ROS folgte einem Protokoll von Dahlgren (Dahlgren, 1999) mit leichten Veränderungen.

Lösungen:

Nr.	Name	Substanzbezeichnung	Endkonzentration
1	Krebs-Ringer (KRG, 1x)	NaCl KCl HEPES pH7.4 KH ₂ PO ₄ NaHCO ₃ MgSO ₄ CaCl ₂	125 mM 5 mM 25 mM 1,2 mM 5 mM 1,2 mM 1 mM
2	2 M Glucose	Glucose H ₂ O	2 M
3	Meerrettichperoxidase (80 U/ml) (HRP)	Meerrettichperoxidase in KRG	80 U/ml

4	Catalase (200 U/ μ l)	Catalase in KRG	200 000 U/ml
5	Superoxiddismutase	Superoxiddismutase in KRG	5000 U/ml
6	50 mM Luminol	Luminol in 0,1 M NaOH	50 mM
7	1mM Luminol	50 mM Luminol KRG (37 °C)	2 μ l 98 μ l
8	Menadion (Vitamin K ₃) 100 mM	Menadion in 100% Ethanol	100 mM
9	Menadion 2 mM	Menadion 100 mM KRG (37 °C)	2 μ l 98 μ l

Materialien: Lumineszenz-Reader, 96-Well-Schale (weißer Boden und Rand, NUNC Art. – Nr. 136101)

Durchführung:

Zunächst wurde der KRG (1) mit 6 mM Glukose (2) supplementiert. Jurkat T-Lymphozyten wurden dann, wie in 2.3.1 beschrieben, geerntet und in diesem KRG resuspendiert. Das Luminometer wurde auf 37 °C vorgewärmt und der Meßansatz in einer 96-Well-Schale zusammenpipettiert: Zu 162,5 μ l KRG (1) wurden 25 μ l Zellsuspension (bzw. nur KRG als Kontrolle) 25 μ l Luminol (7) und 12,5 μ l HRP (3) gegeben. Dieser Ansatz wurde für 5 min bei 37 °C vorinkubiert und die Reaktion dann durch Zugabe von 25 μ l Stimulus (APIT in KRG, oder Menadione (9)) gestartet. Die Lumineszenz der verschiedenen Ansätze wurde parallel alle 60 sec für 5 sec aufgenommen. Die Messung erstreckte sich insgesamt über 50 min. Auch die Signalproduktion durch den Ruhestoffwechsel der Zellen wurde über 50 min aufgenommen.

2.4 Assays nach enzymatischer Aktivität

2.4.1 HRP/ABTS-Assay

Der “HRP/ABTS”-Assay basiert auf der “Quality Control Test Procedure” für Meerrettichperoxidase von Sigma (Prod.No. P-6782). Es handelt sich um einen Assay für die quantitative Detektion von H₂O₂.

In der hier dargestellten Form geht dem eigentlichen Assay eine Enzym-Substrat-Reaktion voraus, die zur Produktion von H₂O₂ führt (Oxidase-Reaktion). Diese kann in einem

Ringer/Puffer bzw. in Zellkulturmedium stattfinden. Wegen des störenden Einflusses von Glutathion und anderen freien Thiolen muß letzteres aber vor dem Assay alkyliert werden.

Lösungen:

Nr.	Name	Substanzbezeichnung	Endkonzentration
1	Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 5.0	KH ₂ PO ₄ (1 M) H ₂ O pH mit KOH/Phosphorsäure einstellen	100 ml/l 900 ml/l
2	Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 7.4	K ₂ HPO ₄ (1 M) KH ₂ PO ₄ (1 M) H ₂ O	80,2 ml/l 19,8 ml/l 900 ml/l
3	Orthophosphorsäure 1 M	Orthophosphorsäure 10 M H ₂ O	100 ml/l 900 ml/l
4	Orthophosphorsäure 10 M	85 % Orthophosphorsäure H ₂ O	616,6 ml/l 383,4 ml/l
5	Substrat 100 x	Substrat (z.B. Lysin oder Glucose) in H ₂ O	100 mM
6	Substratmix 1 x (99 µl/Ansatz)	Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 7.4 Substrat (100 x)	98 µl/99 µl 1 µl/99 µl
7	ABTS 10 x	2,2-Azino-bis (3-Ethylbenz-Thiazoline-6-Sulfonsäure) Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 5.0	5,5 mg/ml auf 1 ml
8	Meerrettichperoxidase (1 U/µl), pH 6.8 (HRP)	Meerrettichperoxidase K ₂ HPO ₄ (1 M) KH ₂ PO ₄ (1 M) BSA Triton-X-100	1000 U/ml 19,9 µl/ml 20,1 µl/ml 0,25% 0,5%
9	ABTS-Mix 1,1 x (225 µl/Ansatz)	Kaliumphosphatpuffer 100 mM, pH 5.0 ABTS-Lsg. (10 x) Meerrettichperoxidase (1 U/µl)	199 µl/225 µl 25 µl/225 µl 1 µl/225 µl
10	H ₂ O ₂ -Standard 10 mM	H ₂ O ₂ -Lösung (30%) Kaliumphosphatpuffer 100m M, pH 7.4	1,14 µl auf 1 ml
11	NEM-Lösung	N-Ethylmaleimid Natriumacetat pH 5.8	20 mM 200 mM

Materialien: 96-Well-Flachboden-Schale, ELISA-Reader

Durchführung:

Im Ringer/Puffer: Pro Ansatz wurden 1 μl Probe (Oxidase-Präparation: APIT oder Glucose Oxidase) zu 99 μl Substratmix (6) gegeben und sofort gemischt. Nach 10 min (quantitatives Ergebnis) bzw. 1 h (qualitatives Ergebnis) Inkubation bei RT °C wurde die Reaktion mit 1 μl 10 M Orthophosphorsäure (4) gestoppt und wieder sofort gemischt.

In einer 96-Well-Flachboden-Schale wurden entsprechend viele Wells mit 225 μl 1,1 x ABTS-Mix (9) befüllt. Nun wurden jeweils 25 μl des gestoppten Reaktionsansatzes dazugegeben und mit der Pipette gemischt. Die chromogene Reaktion erfolgte unmittelbar nach Zugabe und ließ sich anschließend in einem Elisa-Reader bei einer Absorption von 405 nm bestimmen. Die Referenz-Wellenlänge betrug 492 nm. Als interner Standard wurde eine 10 M H_2O_2 -Lösung in Puffer (10) mit Kaliumphosphatpuffer (2) auf 500, 100, 50, 25 und 12,5 μM verdünnt, und jeweils 100 μl davon wurden entsprechend dem Oxidase-Substrat-Mix behandelt.

Im Zellkulturmedium: Zu 250 μl Vollmedium (RPMI inkl. 10% FKS) bzw. Zellsuspension (5×10^5 Jurkat-T-Lymphozyten/ml Vollmedium) wurde APIT bis zu einer Endkonzentration von 200 ng/ml gegeben bzw. eine H_2O_2 -Konzentration von 200 μM eingestellt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 Stunden) unter Zellkultur-Standardbedingungen (siehe 2.3.1) wurden die Zellen abzentrifugiert und 100 μl des Überstandes in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von 1 μl 10 M Orthophosphorsäure (4) und sofortiger Mischung folgte die Zugabe von 40 μl NEM-Lösung (11) und eine zehnminütige Inkubation bei RT °C. 25 μl dieses Ansatzes wurden dann entsprechend dem obige Vorgehen zu 225 μl 1,1 x ABTS-Mix (9) gegeben und die Absorption bei 405 nm bestimmt.

Als interner Standard diente die oben aufgeführte Verdünnungsreihe von H_2O_2 in Vollmedium, die ebenfalls mit Orthophosphorsäure und NEM-Lösung behandelt wurde.

2.4.2 MBTH-Assay

Der MBTH-Assay dient der quantitativen Detektion von α -keto-Säuren bzw. aliphatischen Aldehyden (also Oxidationsprodukten). Das Protokoll wurde bereits 1968 von Soda vorgeschlagen (Soda, 1968). Auch diesem Assay geht eine Enzym-Substrat-Reaktion voraus,

die in diesem Fall aber nicht zur Produktion von H_2O_2 führt (wird durch Catalase abgebaut), sondern von α -keto-Säure. Die Anwesenheit von Catalase ist unbedingt erforderlich!

Lösungen:

Nr.	Name	Substanzbezeichnung	Endkonzentration
1	0,1 M Pyrophosphat, pH 8.5	Pyrophosphat (Dinatriumsalz) H_2O pH mit NaOH-Plättchen einstellen	22,2 g/l
2	0,1 M Lysin	Lysin · HCl in H_2O	18,26 g/l
3	12,5% TCA	TriChlorEssigsäure in H_2O	125 g/l
4	1 M Natriumacetat, pH 5.0	Natriumacetat Eisessig (zum Einstellen des pH-Wertes) H_2O	82 g/l ~ 100 ml/l auf 1 l
5	0,1% MBTH-Lsg.	3-Methyl-2-Benzothiazolonhydrazon Hydrochlorid in H_2O	1 g/l
6	Catalase-Lsg.	Catalase in PBS	200 000 U/ml
7	Oxidase-Lsg.	Oxidase (z.B. APIT) in Puffer	variabel
8	Standard 10 mM	α -keto-Isocaprooesäure in H_2O	1,521 mg/ml

Materialien: 1,5 ml-Reaktionsgefäß-Zentrifuge (kühlbar), Heizblock (50 °C), Photometer (Absorption bzw. Extinktion 320 nm)

Durchführung:

Zunächst wurden 73 μ l H_2O , 50 μ l Phosphatpuffer (1), 25 μ l Substrat (100 mM, z.B. L-Lysin) und 2 μ l Catalase-Lsg. (6) in einem Reaktionsgefäß zusammenpipettiert. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 50 μ l Oxidase-Lsg. (7) gestartet und bei RT °C für 1, 2, 5, 10, 15 und 20 min inkubiert. Durch Zugabe von 20 μ l TCA (3) und sofortigem Mischen wurde der Oxidationsprozeß gestoppt, und die ausgefallenen Proteine wurden 20 min bei 13.000 U/min und 4 °C abzentrifugiert.

100 μ l des Überstandes wurden abgenommen und in ein Reaktionsgefäß pipettiert, in dem bereits 200 μ l Acetatpuffer (4) und 80 μ l MBTH-Lsg. (5) vorgelegt waren. Einem kurzen Mischen folgte eine 30-minütige Inkubation bei 50 °C. Schließlich wurde die Absorption eines Aliquots bei 320 nm photometrisch bestimmt. Als interner Standard wurde die 10 mM Lösung (8) mit H_2O auf 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 und 0,3125 mM verdünnt, und 25 μ l davon

wurden statt dem Substrat zur Enzym-Substrat-Reaktion gegeben (Achtung: 1:8-Verdünnung!).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Isolierung des zytolytischen Proteins aus der nativen Tinte

Die Isolierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Servicegruppe Biochemie/Proteinanalytik des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie, Berlin (MPIIB).

Zunächst wurde die native Tinte durch ein Papierrundfilter (Whatman, No. 4) filtriert, um grobe Verunreinigungen abzutrennen. 40 ml wurden nun mittels einer Säulenzentrifugation (1890 g, 8 °C) durch „Ultrafree“ 15 Ultrafiltrationseinheiten (Celluloseacetatmembran) mit einem Molekularausschlussgewicht von 30 kD auf 5 ml konzentriert und anschließend zwei Stunden lang bei 4 °C gegen 20 mM Tris, pH 8,2 dialysiert.

Es folgte ein letzter Filtrierschritt durch 0,45 µm Spritzenfilter (Schleicher&Schuell) und dann die erste säulenchromatographische Auftrennung über eine „Source Q15“-Ionenaustauschsäule (HR 10/10, Material von Pharmacia). Als Laufpuffer dienten Puffer A (20 mM TrisHCl, pH 8,2, autoklaviert) und Puffer B (20 mM TrisHCl, pH 8,2, 1 M NaCl, autoklaviert). Die Flussrate betrug 2 ml/min, der Anteil von Puffer B zu Beginn 0%, zum Ende 80%. Das Volumen der aufgefangenen Fraktionen betrug 2 ml, ihr Proteingehalt wurde durch die 280 nm-Absorption bestimmt. Um die Proteinzusammensetzung der erhaltenen Fraktionen zu bestimmen, wurde mit jeweils 10 µl eine SDS-PAGE-Analyse und anschließend eine Silberfärbung durchgeführt. Für die Ermittlung des zytotoxischen Effektes wurden die Fraktionen mit Medium verdünnt (1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300, 1:72900, 1:218700 Endverdünnung) und zu Jurkat T-Lymphozyten gegeben. Nach drei Stunden Inkubation wurde der WST-1-Umsatz der Zellen in der beschriebenen Weise aufgenommen, außerdem wurde die Zellmorphologie mikroskopisch überprüft. Fraktionen, die eine zytotoxische Aktivität aufwiesen, wurden gepoolt und erneut über Säulenzentrifugation in der oben beschriebenen Weise eingeeengt.

Es folgte eine Gelfiltration an „Superose 12“ (HR 10/30, Material von Pharmacia). Bei dieser wurden 2 „HR 10/30-Superose 12“-Säulen über einen kurzen Schlauch verbunden, so dass sich eine Trennstrecke von 60 cm ergab. Der Laufpuffer bestand aus 100 mM Kaliumphosphat, pH 7,2 (autoklaviert), die Flussrate betrug 0,4 ml/min, der Maximaldruck 30 bar. Nach Applikation von 400-500 µl Probe wurden diesmal 1 ml-Fraktionen gesammelt und deren Proteingehalt wieder als 280 nm-Absorption bestimmt. Wie bei der zuvor

vorgenommenen Chromatographie wurden auch diesmal Proteinzusammensetzung und zytotoxischer Effekt ermittelt. Erneut wurden die aktiven Fraktionen gepoolt und über eine Säulenzentrifugation eingeeengt.

Die nun folgende Ionenaustauschchromatographie (Waters HPLC) auf einer „AEX“-Säule (BioRad) diente der weiteren Aufreinigung und der Aufnahme eines Absorptionsspektrums der Probe. Als Laufpuffer dienten Puffer A und B der ersten Ionenaustauschchromatographie. Die Flussrate betrug 1 ml/min, ein 80%-iger Anteil von Puffer B wurde in 45 min erreicht. Von allen Fraktionen (1 ml) wurde mit Hilfe des „Photodiode Array Detectors“ (Waters 996) ein komplettes Absorptionsspektrum aufgenommen. Auch eine Analyse von Proteinzusammensetzung und Zytotoxizität fand wie oben beschrieben statt.

2.5.2 SDS-PAGE und Silberfärbung

Die Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach Sambrook (1989), die anschließende schnelle Silberfärbung nach einem Protokoll der „Current Protocols in Molecular Biology“.

2.5.3 Westernblot

Lösungen:

Nr.	Name	Substanzbezeichnung	Endkonzentration
1	Transferpuffer	Tris·Cl Glycin Methanol	6 g 28,8 g 400 ml mit H ₂ O auf 2 l
2	TBST, pH 7.5	Tris·Cl NaCl Tween 20	20 mM 140 mM 0,05%

Materialien: PVDF-Membran (9 x 6 cm), 3MM-Whatman-Papier (9 x 6 cm), Methanol, Transferkammer, Stromversorgung, Rührfisch, Schüttler, “Enhanced Chemilumineszenz – System” (z.B. von NEN), Röntgenfilme, Fotolabor

Durchführung:

Für eine Immunfärbung der aufgetrennten Proteine wurden sie nach SDS-PAGE im Nassblottverfahren (Biorad) auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran überführt. Diese wurde zuvor mit Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau für den

Transfer vollzog sich in folgender Reihenfolge: Kathode, Schaumstoff, 2x 3MM Whatman Papiere, SDS-PAGE (ohne Sammelgel), PVDF-Membran, 2x 3MM Whatman Papiere, Schaumstoff, Anode. Luftblasen wurden vorsichtig mit einer Glaspipette hinausgeschoben, die Transferkammer zusammengesetzt und mit Transferpuffer (1) gefüllt. Der Transfer erfolgte bei 150 mA und 4 °C über Nacht. Nach Abbau der Transferanordnung wurde die Membran am nächsten Tag zunächst für ca. zwei Stunden in 3% BSA (Sigma) in TBST (2) blockiert. Erstantikörper war der Anti-Myc (9E10, Santa Cruz) in einer Verdünnung von 1:1000 in der vorherigen Blockierlösung. Die Inkubation mit ihm wurde für zwei Stunden vorgenommen, dann wurde die Membran intensiv mit TBST (2) gewaschen und anschließend für eine weitere Stunde mit Sekundärantikörper - Anti-Maus gekoppelt mit Meerrettichperoxidase (Pharmingen) - behandelt. Nach erneutem intensiven Waschen wurde der gebundene Sekundärantikörper über die mit ihm konjugierte Meerrettichperoxidase-Reaktivität detektiert (ECL-System von NEN).

2.5.4 Nachweis der Glykosilierung

Zur Bestätigung einer Glykosilierung von APIT wurde das „DIG Glycan/Protein Double Labelling Kit“ (Boehringer Mannheim) eingesetzt. Da beim herstellereitig vorgeschlagenen Protokoll viel unspezifischer Hintergrund entstand, wurde eine Optimierung vorgenommen, die zum folgenden Protokoll führte.

Lösungen: „vial“-Angaben kennzeichnen Bestandteile, die im Boehringer Mannheim-Kit enthalten sind. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen wurden das mitgelieferte Fetuin (vial 12) und die Creatinase (vial 11) eingesetzt.

Nr.	Name	Substanzbezeichnung	Endkonzentration
1	0,1 M Essigsäure pH 2,9	Eisessig (100%) pH mit NaOH einstellen	5,72 ml/l
2	0,1 M Natriumacetat pH 5,5	Natriumacetat pH mit Eisessig (100 %) /NaOH einstellen	8,2 g/l
3	0,1 M Natriumacetat pH 5,5 inkl. TWEEN	0,1 M Natriumacetat pH 5,5 TWEEN-20	99,95% 0,05%
4	Periodat-Lsg.	Natrium-Metaperiodat (vial 1b) in 0,1 M Essigsäure pH 2,9	2,14 mg/ml
5	DIG-Hydrazid-Lsg.	DIG Hydrazid (vial 3) in 0,1 M Natriumacetat pH 5,5 inkl. TWEEN	0,2 µl /ml

6	0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,5 inkl. TWEEN	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ TWEEN-20 pH mit KOH/Orthophosphorsäure einstellen	11,41 g/l 0,05%
7	FLUOS-Lsg.	FLUOS (vial 4) in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 8,5 inkl. TWEEN	0,5 µl/ml
8	TBST	TRIS HCl pH 7,5 NaCl TWEEN-20	50 mM 150 mM 0,05 %
9	Blockierlsg.	Blockierreagenz (vial 10) in TBST (1 h, 50-60 °C)	0,5%
10	Antikörperlsg.	Anti-Digoxigenin-POD (vial 5) Anti-Fluorescein-AP (vial 6) in TBST	2 µl/ml 2 µl/ml
11	TRIS Puffer pH 7,5	TRIS HCl pH 7,5 MgCl ₂ NaCl	0,1 M 0,05 M 0,1 M
12	TRIS Puffer pH 9,5	TRIS HCl pH 9,5 MgCl ₂ NaCl	0,1 M 0,05 M 0,1 M
13	POD-Farb-Lsg.	TETON (vial 9) H ₂ O ₂ (30%) in TRIS Puffer pH 7,5	5 µl/ml 0,6 µl/ml
14	AP-Farb-Lsg.	INT (vial 8) X-Phosphat (vial 7) in TRIS Puffer pH 9,5	5 µl/ml 5 µl/ml

Materialien: Cellulosenitrat-Membran (z.B. Schleicher & Schuell, PROTRAN BA83, Ref.-No.: 40 13 91), 10x10 cm Plastikschalen oder 50 ml Falcon-Tubes, Schwenker, Roller, Scanner.

Durchführung:

Zunächst wurden die native Tinte und die Postiv- (Fetuin) bzw. Negativkontrolle (Creatinase) durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.5.2) und auf die Cellulosenitrat-Membran geblottet (siehe 2.5.2). War die Membran zwischendurch getrocknet, wurde sie vor den folgenden Schritten noch mit H₂O reaktiviert.

Alle Inkubationen wurden in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen bei RT °C auf einem Roll-Inkubator vorgenommen.

Zuerst wurde die Membran für 10 min in 5 ml Essigsäure (1) äquilibriert und dann 20 min lang im Dunklen mit Periodat-Lsg. (4) behandelt. Es folgte ein zweimaliges Waschen über 10 min mit 25 ml Natriumacetat (2) und eines mit 25 ml Natriumacetat inkl. TWEEN (3). Nun wurde die Membran für eine Stunde in 5 ml DIG-Hydrazid-Lsg. (5) inkubiert und danach dreimal 5 min lang mit 25 ml Kaliumphosphatpuffer inkl. TWEEN (6) gespült. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation in 5 ml FLUOS-Lsg. an und ein abermaliger Waschschrift, diesmal dreimal 10 min mit jeweils 25 ml TBST (8). Nun wurde die Membran zunächst eine Stunde lang blockiert (9) und dann eine weitere Stunde mit 5 ml Antikörper-Lsg. (10) behandelt. Anschließend wurden über 60 min mehrere Spülschritte mit jeweils 25 ml TBST durchgeführt. Die nun folgenden Farbreaktionen mit den antikörperkonjugierten Enzymen fanden getrennt statt, um jeweils optimale Bedingungen einstellen zu können. Zunächst wurde die Membran mit 2 ml POD-Farb-Lsg. (13) ohne Schütteln inkubiert, bis sich Glykosilierungen deutlich anhand blaugefärbter Banden erkennen ließen. Durch vorsichtiges Spülen mit H₂O wurde die Farbreaktion beendet und auf einem Scanner dokumentiert. Die Entwicklung mit der AP-Farb-Lsg. (14) fand in derselben Weise statt. Auch ihr Ergebnis wurde nach Stoppen der Reaktion mit H₂O auf einem Scanner dokumentiert.

2.5.5 Periodatoxidation

Für die Periodatoxidation von APIT wurde auf Bestandteile des oben benutzten Kits (2.5.4) zurückgegriffen. Zunächst wurde aufgereinigtes APIT mit H₂O auf 50 ng/μl und dann 1:2 mit Natriumacetat-Puffer (0.2 M, pH 5.5) verdünnt. Nun wurde ein halbes Volumen Natrium-Metaperiodat-Lsg. (5 mg/1,5 ml H₂O) hinzugefügt und der Ansatz für 20 min bei RT °C im Dunkeln inkubiert. Das Periodat wurde durch Zugabe der gleichen Menge Natrium-Disulfit-Lsg. (3.75 mg/ml H₂O) und Inkubation für 5 min bei RT °C zerstört und ein quantitativer HRP/ABTS-Assay mit einem Aliquot der Reaktion (~60 ng) durchgeführt. Der Rest der Reaktion wurde mit einem achteil Volumen DIG-Hydrazid-Lsg. (5) für 60 min bei RT °C behandelt, dann mit SDS-Probenpuffer (2 x) für 2 min bei 100 °C gekocht und eine erfolgreiche Oxidation der Zuckerseitenketten über einen Westernblot gegen den Digoxigeninlabel nachgewiesen. Nur nach erfolgreicher Oxidation konnte dieses ja mit APIT verbunden werden. Zur Kontrolle der Oxidationsbedingungen wurden Metaperiodat- und Disulfit-Lsg. bereits vor Zugabe 1:1 gemischt und für 5 min bei RT °C inkubiert, um Periodat unwirksam zu machen.

2.5.6 Saure Ammoniumsulfatfällung zur Ablösung des Flavin-Kofaktors

Die saure Ammoniumsulfatfällung zur Ablösung des Flavin-Kofaktors vom Apoenzym folgte im Wesentlichen einem Protokoll von Swoboda (Swoboda, 1969). Eine 100% gesättigte Ammoniumsulfat-Lsg. wurde mit konzentrierter Schwefelsäure auf pH 1.4 eingestellt. Zu 1,5 ml dieser Lösung wurden bei 0°C auf einem Schüttler 150 µl einer Glucose Oxidase-Lsg. (8 mg Protein/ml) tropfenweise hinzugegeben. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13000 U/min und 4 °C wurde das Pellet mit ca. 70 µl Kalium-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.2) auf 150 µl Volumen gebracht und die Fällung noch zweimal wiederholt. Das farblose Apoenzym wurde anschließend zweimal mit Kalium-Phosphatpuffer (100 mM, pH 7.2) auf einer „Microcon“-Säule (30 kD) gewaschen und die Proteinkonzentration schließlich mittels der Amidoschwarztechnik bestimmt.

2.5.7 Quantitative Proteinbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Amidoschwarztechnik eingesetzt (Dieckmann-Schuppert, 1997).

Lösungen: (alle kalt und dunkel aufbewahren, Kühlraum!)

Nr.	Name	Substanzbezeichnung	Endkonzentration
1	Färbelösung	Amidoschwarz	0,5%
		Methanol	45%
		H ₂ O	45%
		Eisessig (100%)	10%
2	Entfärbelösung	Methanol	47,5%
		H ₂ O	47,5%
		Eisessig (100%)	5%
3	Auflöselösung	Ameisensäure	80%
		Eisessig (100%)	10%
		TriChlorEssigsäure	10%
4	BSA-Standards (in gleichem Puffer wie Probe)	0 – 0,125 – 0,25 – 0,5 –	
		1 – 2 – 4 mg/ml z.B. in PBS	

Materialien: Celluloseacetat-Folien 2,5 x 15 cm (Eltest GmbH, Bonn, Artikelnr:15 52 48), große Schale (10 x 17 cm), zwei Klammern, Laborgebläse, temperierbarer Schüttler (auf 50 °C), 96-Well-Schale (Flachboden), Absorptionsmessgerät (620 nm), Handschuhe, Kittel, Schutzbrille.

Durchführung:

Die CA-Folie wurde mit Bleistift und Lineal in 1,25 x 1.0 cm große Felder unterteilt, zwischen die Klammern geklemmt und über die Schale gehängt. Pro Feld wurden jeweils 5 µl Nullwert bzw. Standard (4) bzw. Probe aufgetragen und kurz mit dem Laborgebläse getrocknet. Die Klammern wurden entfernt, die CA-Folie in die Schale gelegt und letztere auf einen Schwenker gestellt. Nun wurde die CA-Folie mit Färbelösung (1) bedeckt und 10 min geschwenkt. Die gebrauchte Färbelösung wurde durch Filterpapier in die Vorratsflasche zurückgegeben, und Folie und Schale wurden einmal kurz mit H₂O gespült. Nun wurde die CA-Folie 3x 5 min mit Entfärbelösung (2) entfärbt, anschließend zwischen die Klammern geklemmt und zum Trocknen über die Schale gehängt. Die Probenfelder wurden ausgeschnitten, einzeln in 1,5 ml-Reaktionsgefäße gesteckt, und unter dem Abzug wurde jeweils 0,5 ml Auflöselösung (3) dazu pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf einem Schüttler bei 50 °C wurden jeweils 250 µl der Ansätze in eine 96-Well-Flachbodenschale gegeben und die Absorption bei 620 nm bestimmt. Schließlich wurde die BSA-Standardgerade ermittelt und daraus die absoluten Probenwerte abgeleitet.

2.5.8 Reaktivierung des ApoEnzyms mit Kofaktor

Um den Flavinkofaktor vollständig von APIT abzulösen, wurde eine reine Präparation (100 µg/ml) 5 min auf 95 °C erhitzt. 10 µl dieser Präparation wurden eine Stunde lang mit 10 µl des Apoenzym der Glukose Oxidase (100 µg/ml) bei RT °C inkubiert und anschließend ein HRP/ABTS-Aktivitätsassay mit Glukose als Substrat durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde das Apoenzym der Glukose Oxidase mit unterschiedlichen Mengen reinem FAD reaktiviert.

2.5.9 Behandlung mit proteolytischen Enzymen, Hitze, Säure und Urea

Um die pH-Sensitivität von aufgereinigtem APIT festzustellen, wurden Aliquots 10 Minuten lang in einer Mischung von mono- (KH₂PO₄, 100 mM) und dibasischem (K₂HPO₄, 100 mM) Kaliumphosphat bzw. Phosphorsäure (10 mM) bei unterschiedlichen pH-Werten und RT °C inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze durch Zugabe der entsprechenden Mengen von mono- (KH₂PO₄, 100 mM) und dibasischem (K₂HPO₄, 100m M) Kaliumphosphat auf pH 7.4 eingestellt und die verbleibende Aktivität von APIT in einem HRP/ABTS-Assay quantifiziert.

Für den proteolytische Verdau von APIT wurden dialysierte Präparationen der Tinte zwei Stunden lang bei 37 °C mit Trypsin (0,5 mg/ml Endkonzentration) oder Proteinase K (0,05 mg/ml Endkonzentration) inkubiert und der Verdau anschließend durch Zugabe der

spezifischen Inhibitoren Aprotinin (1 µg/ml Endkonzentration) und PEFA (0,25 mg/ml Endkonzentration) gestoppt. Die verbleibende Aktivität von APIT wurde wieder in einem HRP/ABTS-Assay quantifiziert, als Substrate wurden verschiedene Aminosäuren in einer Konzentration von 1 mM getestet.

Die Feststellung der Temperatur- und der Ureasensitivität fand ebenfalls mit gegen PBS dialysierter Tinte statt. Bei ersterem wurde die verbleibende Aktivität nach 10-minütiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen mit einem anschließenden HRP/ABTS-Assay bestimmt. Die Behandlung mit Urea in den genannten Konzentrationen wurde für 30 Minuten bei RT °C durchgeführt und die verbliebene Aktivität anschließend mit einem MBTH-Assay bestimmt. Um einen störenden Einfluss von Urea auf den Assay ausschließen zu können, wurde dieser parallel mit einer Positivkontrolle (α -keto-Isocaproat) bei den unterschiedlichen Ureakonzentrationen aufgenommen.

2.5.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung des aufgereinigten zytotoxischen 60 kD-Proteins und einzelner tryptischer Peptide wurde von der Gruppe „Apoptose-Proteomics“ des MPIIB durchgeführt (siehe Ergebnisse).

2.6 Klonierung und heterologe Expression der cDNA von APIT

Die folgenden Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit der technischen Angestellten Dominique Gritscher vom MPIIB durchgeführt.

Folgende **Primer** wurden benutzt:

Nr.	Name	Sequenz
1	Oligo-dT DBuTag1	tcc taa cgt agg tct aga cct gtt gca ttt ttt ttt ttt ttt
2	V-Fey 3 DTS 5'	tc gtg ttc gar tac tci gay cg
3	DBuTag1 DTS 3'	ctg tag gtc tag acc tgt tgc a
4	ATF Race 3' 660	ccg tgt aga tct cac tgc cat a
5	Abrided Anchor Primer	ggc cac gcg tcg act agt acg ggi igg gii ggg iig
6	ATF Race 3' 436	ccg ttg agt tgt aga cct
7	AUAP-EcoRI	aatt ggc cac gcg tcg act agt ac
8	ATF 5'Sign EcoRI GEX/ET	aa ttc tcg tct gct gtg ctt ctc ct
9	ATF 3' XhoI	gac tta gag gaa gta gtc gtt ga

2.6.1 RNA-Präparation und Reverse Transkription

Für die Isolierung von RNA aus Geweben von *A.punctata* wurde das „Trifast“-Reagenz entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Zur reversen Transkription der RNA wurde die „Superscript II“-Polymerase, ebenfalls wie vom Hersteller empfohlen, eingesetzt. Primer hierfür war „Oligo-dT DBuTag1“ (1), der an seinem 5'-Terminus eine „Tag“-Nucleotidsequenz von 27 Basen aufwies (siehe Schema M2.6-1, A, S.20).

2.6.2 PCR

Für die PCR wurde das „Expand Long Template“-System von Roche entsprechend den Herstellerempfehlungen eingesetzt. Primer waren „V-FEY 3 DTS 5'“ ((2) siehe auch 3.5.1: Primerdesign) und ein spezifisch gegen die vom RT-Primer eingeführte „Tag“-Sequenz bindender (DBuTag1 DTS 3') (siehe Schema M2.6-1, B1 und B2, S. 20).

2.6.3 DiTriSEC

Für eine Ligation von PCR-Fragment und gewünschtem Vektor mussten beide entsprechend vorbereitet werden. Die Schritte hierfür wurden mit der DiTriSEC-Technik (Di-Tri-Sticky End Cloning, Dietmaier, 1993) geleistet.

Vektorvorbereitung: Zunächst wurde der Vektor mit den gewünschten Restriktionsenzymen (siehe Machuy, 2001) entsprechend den Herstellerangaben verdaut und die Reaktion anschließend durch Erhitzen für 10 min bei 65 °C gestoppt. Es folgte eine Klenow-Reaktion ohne Wechsel des Puffers. Zum Restriktionsansatz (30 µl) wurden einfach jeweils 4 µl der entsprechenden 10 mM dNTP's (Endkonzentration 1 mM) und 4 U Klenow-Enzym (Endkonzentration 0,4 U/µl) pipettiert und das Ansatzvolumen durch Zugabe von H₂O auf 40 µl gebracht. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT °C wurde die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen bei 75 °C gestoppt und der Vektor anschließend durch zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung aufgereinigt. Schließlich wurde er in H₂O resuspendiert und auf eine Konzentration von 100 ng/µl eingestellt.

Fragmentvorbereitung: Zunächst wurde das PCR-Fragment mit dem „PCR-Purification Kit“ (Quiagen) entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt und mit 40 µl H₂O von der Säule eluiert. Es folgte eine „Trimm“-Reaktion des aufgereinigten Fragments, um die zum präparierten Vektor komplementären 5'-Überhänge zu erzeugen. Dafür wurden dem Ansatz 6 µl eines 10-fach Inkubationspuffers (Roche), 0,6 µl BSA (NEB, 100 x), jeweils 6 µl des entsprechenden (siehe Machuy, 2001) 10 mM dNTP's und 3 U T4-DNA-Polymerase

(Endkonzentration 0,05 U/ μ l) hinzugefügt und das Volumen durch Zugabe von H₂O auf 60 μ l eingestellt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 12 °C wurde die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen auf 75 °C gestoppt und das getrimmte Fragment anschließend durch zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanol-Fällung aufgereinigt.

Ligation: Für eine Ligation wurden 100 ng vorbereiteter Vektor mit einem 8-fachen molaren Überschuss des vorbereiteten PCR-Fragments mit T4-Ligase (0,5 μ l/15 μ l) in einem Ligationspuffer (Life) bei 4 °C über Nacht inkubiert.

2.6.4 5'-RACE

Der fehlende Bereich der APIT-cDNA wurde mit Hilfe des „5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0“ (LIFE) amplifiziert und mittels DiTriSEC (siehe 2.6.3) in den vorbereiteten Vektor pcDNA3 kloniert. Die 5' RACE folgte allen Angaben des Herstellers, Einzelheiten sind im Schema M2.6-2 (S. 21) dargestellt.

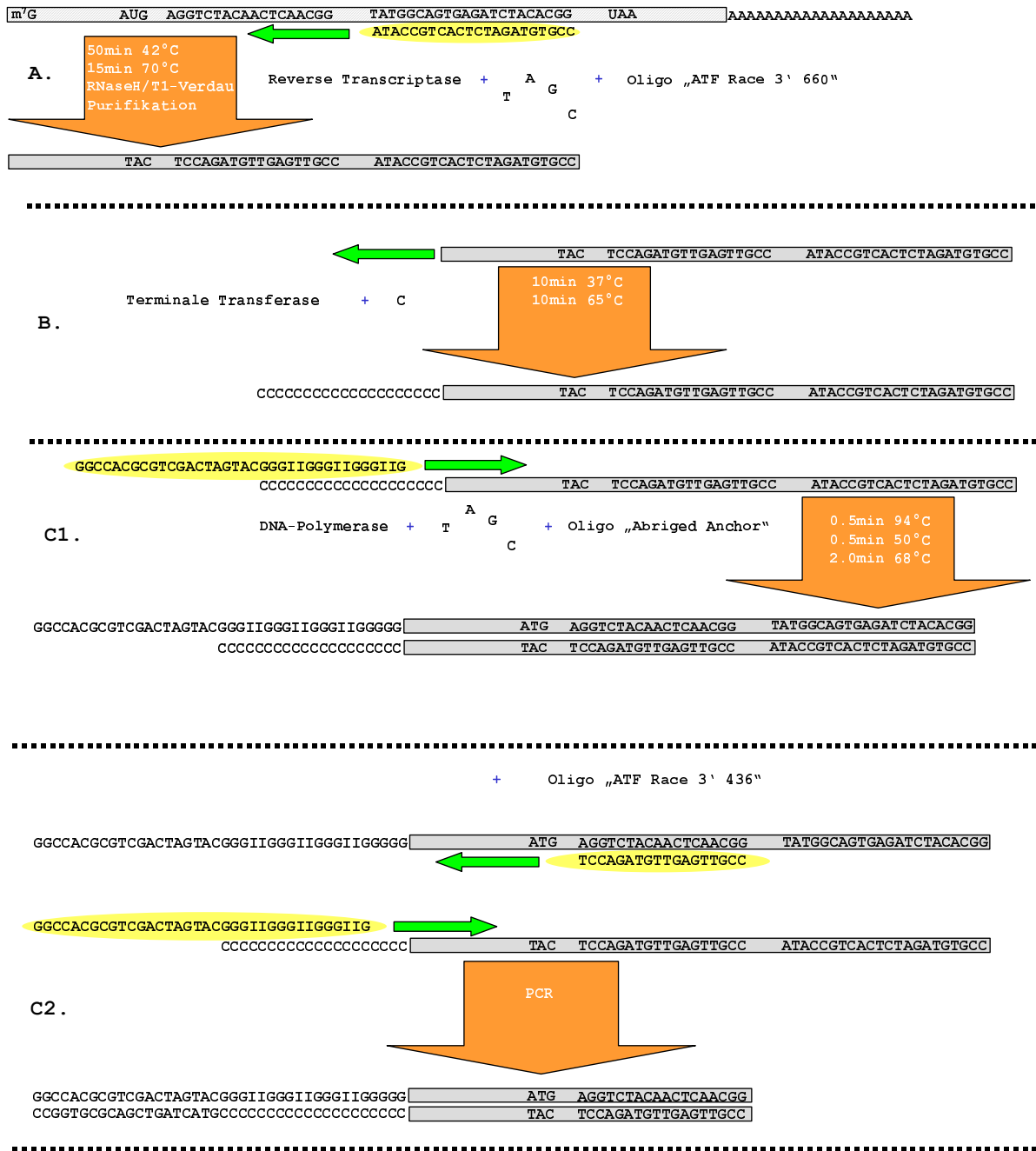
2.6.5 heterologe Expression 293T, CalciumPhosphat

Für eine heterologe Expression wurde die APIT-cDNA mittels DiTriSEC-Technik in den eukaryontischen Expressionsvektor pCMV-Tag1 kloniert. Dieser verfügt über ein Myc-Tag, das der immunologischen Detektion des Fusionsproteins dient.

Als heterologes Expressionssystem wurden 293T-Zellen benutzt, eine humane Nierenzelllinie mit epithelialer Morphologie. Von diesen wurden am Vortag jeweils 1×10^6 Zellen in 60 mm Petrischalen ausgesät und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium durch 4 ml frisches RPMI inkl. 25 μ M Chloroquin ersetzt. Nun wurden 500 μ l einer sterilfiltrierten CaCl₂-Lösung (250 mM) in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 2 μ g der jeweiligen DNA gemischt und zu 500 μ l einer sterilfiltrierten zweifach-HBS-Lösung (50 mM HEPES, pH 7; 1,5 mM Na₂HPO₄, 273 mM NaCl) in einem frischen Reaktionsgefäß getropft. Dieses Gemisch wurde 25 Minuten bei RT °C inkubiert und dann vorsichtig auf die 293T-Zellen getropft, so dass das Volumen des Zellüberstandes nun insgesamt 5 ml betrug. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Transfektionsmedium gegen frisches RPMI-Medium ausgetauscht, und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden unter Standardbedingungen kultiviert. Nach dem Ernten der Zellen folgte eine 45-minütige Lyse auf Eis (1% NP40 in PBS, inkl. Proteaseinhibitoren), ein Nachweis der erfolgreichen Expression von APIT durch einen Westernblot nach dem angehängten Myc-Tag und parallel ein Aktivitätsassay mit dem MBTH-Nachweis.



Schema M2.6-1 stellt Einzelheiten der **RT-PCR zur Vervielfältigung eines APIT-cDNA-Fragments** dar. In **A.)** ist die Reverse Transkription der APIT-mRNA mit dem Oligo „dT-DBu-Tag1“ gezeigt, das an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden kann. Horizontale Pfeile geben die Richtung der Polymerisation an, vertikale Pfeile den Ablauf der Reaktion. Start-, Stopcodon und Oligo-bindende Sequenzbereiche von mRNA und cDNA sind durch die entsprechenden Basenfolgen gekennzeichnet, Oligos sind unterlegt. In **B1.)** und **B2.)** sind die Zweitstrangsynthese mit dem Oligo „V-FEY III“ und der erste PCR-Zyklus dargestellt.



D. Es folgt eine weitere PCR auf das Produkt der ersten, um geeignete DiTriSEC-Schnittstellen einzuführen. Oligos sind „AUAP - EcoRI“ und erneut „ATF Race 3' 436“.

In Schema M2.6-2 ist der Ablauf der 5'-RACE zur Vervielfältigung eines N-terminalen APIT-cDNA-Fragments dargestellt. A.) zeigt die Reverse Transkription mit dem Oligo „ATF RACE 3' 660“, B.) zeigt die Terminale Transferase-Reaktion zur Polymerisation eines Poly-C-Schwanzes. In C1.) ist die Zweitstrangsynthese mit dem Oligo „Abridged Anchor“, das an den Poly-C-Schwanz binden kann, und in C2.) der erste PCR-Zyklus dargestellt.

2.7. Materialien und Geräte

	Hersteller
Medien, Seren und Bestandteile	
Bacto-Agar	Difco
Essentielle Aminosäuren	Invitrogen
FKS	Invitrogen
Glutamin	Invitrogen
LB-Medium	Invitrogen
Nichtessentielle Aminosäuren	Invitrogen
PBS	Invitrogen
RPMI-1640	Invitrogen
Vitamine	Invitrogen
Enzyme	
Catalase	Roche
Glukose Oxidase	Sigma
Meerrettichperoxidase	Roche
L-Lysin Oxidase	Sigma
Proteinase K	Roche
Rnase A	Roche
Superoxiddismutase	Roche
Superscript II Polymerase	Invitrogen
T4-DNA-Polymerase	Roche
T4-Ligase	Invitrogen
Trypsin	Boehringer
versch. Restriktionsenzyme	Roche
Vektoren	
pcDNA3	Invitrogen
pCMV-Tag1	Clontech
pET28	Novagen

Antikörper	
anti-CD95 (CH 11)	Immunotech
anti-Maus (Peroxidase-gekoppelt)	Pharmingen
anti-Myc (9 E 10)	Santa Cruz
Feinchemikalien	
ABTS (2,2-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonat))	Sigma
Agarose	BioWhittaker
a-Ketoisocaproat	Sigma
Amidoschwarz	Merck
Chloroquin	Sigma
Cycloheximid	Sigma
dNTP	Life
Doxorubicin	Sigma
Ethidiumbromid	Fluka
FAD	Sigma
Hydrogenperoxid	Sigma
Kanamycin	Fluka
Luminol	Sigma
MBTH (3-Methyl-2-Benzothiazolinhydrazon Hydrochlorid)	Sigma
Menadion	Sigma
N-Ethylmaleimid	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Trifast-Reagenz	Peqlab
Trypanblaulösung	Invitrogen
WST-1	Roche

Geräte:

Zentrifugen: Heraeus *Biofuge fresco* und *Megafuge 1.0 R*

Luminometer: Labsystems *Luminoskan*

Absorptionsmessgeräte: Molecular Devices *Spectra Max 250*; Pharmacia *Ultrospec 3000*

Durchflußzytometer: Dako *Galaxy Flow Cytometer*

Mikroskop: Leica *DMR* in Verbindung mit einer Nikon *Digital Camera DXM 1200*

HPLC: Waters *LC 4000*

Gelfiltration: Perceptive *Biocad sprint*

PCR: Stratagene *RoboCycler 40 Gradient*

Software:

Außer der Standardsoftware (Microsoft *Office*) kam *Clone Manager 5.1 für Windows 95* (Scientific & Educational Software), *Vector NTI* (Invitrogen), *FloMax 1.0* (Partec) und *Prism 3.0* (GraphPad) zum Einsatz.