

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Molekularbiologische Methoden

#### 5.1.1. Klonierung des humanen Mdm2 (Hdm2)

Die Klonierung erfolgte mittels RT-PCR aus der RNA von Prostata-Carcinomzellen (5'-Primer: ACGGATCCATATGTGCAATACCAACATG und 3'-Primer: AACTGCAGCTAGGGGAAATAAGTTAG; Schnittstellen für Bam HI und Pst I). Die Reaktion wurde nach Standardprotokollen mit der Taq-Polymerase durchgeführt (200  $\mu$ M dNTP-Mix, 2 U Taq-Polymerase in PCR-Puffer). Es erfolgte eine erste Ligation und Transformation mit Hilfe des TA-cloning Kits (Invitrogen, s.u.). Danach wurde in den pQE-Vektor (pQE32) umkloniert. Die anschließende Sequenzierung ergab zwei Mutationen durch Nukleotidaustausch im Mdm2-Insert: D187G und R207S.

#### 5.1.2. Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämmen

- LB-Medium/LB-Platten: 1% Bacto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 100 mM NaCl, für Kulturplatten zusätzlich 2% Bacto-Agar
- Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O, Endkonzentration: 100  $\mu$ g/ml
- Kanamycin-Stammlösung: 50 mg/ml in 0,9%iger NaCl-Lösung, Endkonzentration: 25  $\mu$ g/ml

Die *E. coli* -Kulturen wurden bei 37°C mit 180 rpm geschüttelt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,5-1,0 inkubiert.

Glycerolkultur: 1 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur wurde 10 min mit 14000 rpm bei RT abzentrifugiert (Tischzentrifuge) und das Pellet wurde in 50%iger Glycerol-haltiger LB-Lösung resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

#### 5.1.3. Die schnelle DNA-Isolierung

0,5 ml Übernacht-Kultur wurden mit 0,5 ml Phenol/Chloroform (Roth) versetzt und 1 min mit dem Vortexer geschüttelt. Das Gemisch wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge). 450  $\mu$ l der oberen Phase wurde abgenommen und dazu 500  $\mu$ l Isopropanol zugegeben (RT). Danach wurde kurz mit dem Vortexer geschüt-

telt und 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde 2× mit 1 ml 70%igem Ethanol versetzt. Anschließend wurde das Pellet an der Luft oder in der Speedvac getrocknet und dann in 20 µl H<sub>2</sub>O oder in 20 µl TE aufgenommen.

- TE-Puffer: 10 mM Tris-Cl (pH=8,0), 1 mM EDTA

#### **5.1.4. Plasmidisolierung**

Die Plasmidisolierung wurde in der Mini- und Maxi-Präparationsmenge nach dem Firmenprotokoll von Qiagen durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch ( $\lambda=260$  nm).

#### **5.1.5. Plasmide**

Die cDNAs von unterschiedlichen Proteinen wurden in Vektoren wie pBluescript (Invitrogen) und pQE-Vektoren (Qiagen) kloniert.

#### **5.1.6. Agarosegele**

- TBE-Puffer: 89 mM Tris-Cl (pH=8,0), 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
- 10×Probenpuffer: 30% Ficoll, 100 mM EDTA, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol, 1% SDS in TBE
- Ethidiumbromid-Stammlösung: 10mg/ml
- DNA-Marker: 1 kb DNA-Leiter (Gibco BRL)

DNA-Fragmente der Größe 500-5000 bp wurden in 0,5 bis 1%igen Agarosegelen elektrophoretisch bei maximal 100 V aufgetrennt. Das Gel enthielt 0,006% Ethidiumbromid.

#### **5.1.7. Gelreinigung von DNA-Fragmenten**

Nach der Auftrennung in Agarosegelen wurden DNA-Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA wurde mit dem Gelaufreinigungskit (Qiagen) nach Firmenvorschrift extrahiert.

### **5.1.8. Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen**

Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurde eine Einheit (U) Enzym in dem entsprechenden Puffersystem nach Firmenvorschrift bei geeigneter Temperatur 1 bis max. 2 h inkubiert (NEB).

### **5.1.9. Ligation**

Ca. 300ng Vektor wurden mit dem Insert im Verhältnis 1:1 bis 1:3 pro 20  $\mu\text{l}$  Ligationssansatz mit 100 U T4 DNA-Ligase in Ligationsspuffer (NEB) inkubiert. Ligierte wurde nach Firmenvorschrift oder über Nacht im Kühlraum.

### **5.1.10. PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Es wurden 20 ng Matrix-DNA mit je 100 ng Oligonukleotid in 40  $\mu\text{l}$  3 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und mit 10  $\mu\text{l}$  Mix versetzt. Je nach der Schmelztemperatur der Oligonukleotide und der Länge des Inserts variierte das Programm (etwa 25-30 Zyklen).

Mix: 200  $\mu\text{M}$  dNTP-Mix, 2 U Taq-Polymerase in 5 $\times$ PCR-Puffer (NEB)

### **5.1.11. Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (Elektrotransformation)**

250 ml LB wurden mit 3 ml einer Übernachtskultur des *E. coli*-Stamms M15 angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 wachsen gelassen. Die Zellen wurden 30 min auf Eis gestellt und danach bei 3700 rpm (Rotor JA-14, Beckman), 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml kaltem, sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und 20 min lang bei 3700 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 125 ml kaltem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und mit 3700 rpm 20 min abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 5 ml kalter 10%iger Glycerol-Lösung aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 3700 rpm 20 min lang abzentrifugiert und in 1,5 ml 10%iger Glycerol-Lösung resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert (zu 55  $\mu\text{l}$ ) und bei -70°C gelagert.

### 5.1.12. Transformation mittels TA-cloning Kit von Invitrogen

Zu aufgetauten One shot<sup>®</sup>-kompetenten Zellen (auf Eis) wurden 2 µl β-Mercaptoethanol (0,5 mM) gegeben. Dazu wurden 1-2 µl PCR-Ansatz zugesetzt und der Mix auf Eis 30 min lang inkubiert. Danach erfolgte ein 30 sek langer Hitzeschock bei 42°C. Anschließend wurde der Mix 2 min auf Eis abgekühlt und es wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben. Der Transformationsansatz wurde 1 h mit 180 rpm bei 37°C geschüttelt und anschließend auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

### 5.1.13. Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen (XL-1, DH5α)

100 µl der kompetenten Zellen wurden mit 2 bis 5 µl Ligationsansatz (mit oder ohne Insert) 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Die Zellen wurden 2 min auf Eis abgekühlt, mit 1 ml SOC versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

- SOC: 2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose

### 5.1.14. Elektrotransformation

50 µl kompetente Zellen (M15-Stamm) wurden auf Eis aufgetaut und zusammen mit 300 bis 500 ng Vektor oder dem Ligationsansatz in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte mit 200 Ω, 25 mF, 2,5 kV. Es wurde 1 ml kaltes SOC zugegeben und die Kultur 1 h bei 37°C geschüttelt und anschließend ausplattiert.

## 5.2. Proteinbiochemische Methoden

### 5.2.1. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte entweder durch UV-Absorptionsmessung mit der Formel nach Warburg und Christian oder nach Bradford mit dem Protein Assay Kit nach dem Protokoll der Firma Biorad (Bradford, 1976; Warburg & Christian, 1941). Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Als Standard wurde BSA (Stammkonzentration: 1,44 mg/ml) von der Firma Boehringer Mannheim verwendet.

Die Proteinmenge nach Warburg und Christian wurde über folgende Formel bestimmt:  $\text{mg Protein pro ml} = 1,55 \times A_{280}^{1\text{cm}} - 0,76 \times A_{260}^{1\text{cm}}$ , wobei  $A_{280}$  und  $A_{260}$  die Absorptionswerte bei 280 bzw. 260 nm sind und mit einer 1 cm-Küvette gemessen wurde.

### 5.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(variiert nach (Laemmli, 1970))

- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-Cl (pH=8,8)
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-Cl (pH=6,8)
- Acrylamid: 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
- 10×Laufpuffer: 250 mM Tris, 1,8 M Glycin, 1% (w/v) SDS
- 4×Probenpuffer: 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerol, 240 mM Tris-Cl (pH=6,8), 20% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,04% Bromphenol-Blau
- Molekulargewichtsstandard: Prestained High Molecular Weight Marker. (Molekulargewichte: 14,3/20,1/30/45/66/97/222 kDa, Amersham Biosciences)

Die Proteine wurden entsprechend ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Gelen (7,5%, 10% und 15%) aufgetrennt. Es wurde das Biorad-System verwendet. Je zwei 0,75 mm dicke Gele wurden nach folgendem Schema gegossen:

- Trenngel (10%): 4,1 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml Trenngelpuffer, 3,33 ml 30% Acrylamid, 100  $\mu$ l SDS (10%), 50  $\mu$ l APS (10%), 5  $\mu$ l TEMED

- Sammelgel (5%): 1,7 ml H<sub>2</sub>O, 750 µl Sammelgelpuffer, 500 µl Acrylamid, 30 µl SDS (10%), 15 µl APS, 3 µl TEMED

Die Trennung erfolgte bei einer Spannung von maximal 140 V und dauerte etwa eine Stunde.

### 5.2.3. Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10-30 min gefärbt und etwa eine Stunde entfärbt. Die Gele wurden auf Whatman-Filterpapier bei 80-90°C für 60-90 min getrocknet.

- Färbelösung: 0,25% (w/v) Coomassie Brillant Blue R250 in Methanol (40% Endkonzentration) mehrere Stunden lösen, Eisessig (10% Endkonzentration) in H<sub>2</sub>O zugegeben.
- Entfärbelösung: 10% Eisessig, 40% Methanol in H<sub>2</sub>O

### 5.2.4. Westernblot und Immunodetektion

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld auf Nitrocellulose überführt. Der Westernblot wurde zwischen vier Lagen Whatman-Filterpapier bei konstanter Stromstärke von 200-250 mA für 2 h bei RT oder 100-120 mA im Kühlraum über Nacht durchgeführt. Die Membran wurde nach dem Transfer mit Ponceau S für ca. 1 min gefärbt (s.u.). Danach wurde die Membran mit 5% Milch-PBST 1 h bei RT blockiert. Die Inkubation mit Primärantikörper (in 5% Milch-PBST bzw. in PBST) erfolgte über Nacht im Kühlraum oder für 1-2 h bei RT. Überschüssige Antikörper wurden durch Waschen mit PBST (3× 10 min) entfernt und der Blot wurde mit Sekundärantikörper (Peroxidase gekoppelt) 1 h bei RT inkubiert. Überschüssige Antikörperlösung wurde abermals durch Waschen mit PBST (3× 10 min) entfernt. Die Detektion erfolgte mittels ECL- oder ECL<sup>Plus</sup>-Technik nach Firmenvorschrift (Amersham Biosciences) mit X-Omat DS Filmen (Kodak).

- Blotpuffer: 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,02% SDS, 10% Methanol
- PBST: 1× PBS mit 0,1% Tween-20

### 5.2.5. Ponceau S-Färbung von Nitrocellulose-Membranen

Die Färbung von Nitrocellulose-Membranen erfolgte mit 2% Ponceau S (AppliChem) in 3% TCA-Lösung für 1 min. Die Entfärbung wurde mit H<sub>2</sub>O durchgeführt.

### 5.2.6. Präparation des COP9 Signalosoms

Die Aufreinigung des Komplexes wurde nach Seeger et al. aus humanen Erythrocyten durchgeführt (Seeger et al., 1998). Folgenden Schritte wurden modifiziert:

Die Lyse erfolgte mit 1 Vol. 2×Tris-NP-40 (Enkonzentration: 20 mM Tris-Cl (pH=7,2), 0,1% NP-40, 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) und einer 30- bis max. 60-minütigen Inkubation auf Eis.

Während der FPLC wurde nach der ResourceQ-Säule die MonoQ-Säule benutzt (KCl-Gradienten: ResQ: 10-40%, entspricht 145-430 mM; MonoQ: 22-40%, entspricht 260-430 mM).

#### 5.2.6.1. Erythrocyten-Lyse

Als Ausgangsmaterial wurden ausdatierte Erythrozytenkonzentrate verwendet. Zuerst wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 6000 rpm für 10 min bei 4°C; Rotor JLA 10500, Beckman). Die Lyse erfolgte unter starkem Rühren für 30 bis maximal 60 min im Kühlraum. Danach wurden die Zellmembranen bei 14000 rpm (Rotor JA-14, Beckman) für 1 h bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig von den Membranen dekantiert und im weiteren für die DEAE-Ionenaustauschchromatographie verwendet.

#### 5.2.6.2. DEAE-Ionenaustauschchromatographie

- Puffer A: 10 mM Tris-Cl (pH=7,6), 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 50 mM KCl
- Puffer B: 10 mM Tris-Cl (pH=7,6), 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 400 mM KCl

Etwa 150-180 ml DEAE-(Diethylaminoethan)-Sephacel-Gelmaterial wurden in Puffer A bei RT äquilibriert und 3× mit je 200-300 ml Puffer A gewaschen. Durch Dekantieren wurde das Gelmaterial vom überschüssigen Puffer A getrennt. Anschließend

wurde das Zelllysate zum Gelmaterial gegeben und über Nacht im Kühlraum auf Rollen inkubiert. Danach wurde das Gelmaterial in eine Säule gefüllt und die nichtgebundenen Proteine und Membranen mit 2-3 Säulenvolumina Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 50 bis 400 mM KCl. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 8 ml gesammelt und mittels Westernblot mit unterschiedlichen Antikörpern gegen Untereinheiten der CSN- und Lid-Komplexe getestet. Zusätzlich wurde je 1  $\mu$ l der Fraktionen für den Proteaseaktivitätstest mit dem Substrat (Suc-LLVY-AMC, Bachem) eingesetzt. Mit diesem fluogenen Substrat kann die Chymotrypsin-ähnliche Proteaseaktivität des Proteasoms gemessen werden.

#### **5.2.6.3. Suc-LLVY-AMC-Spaltungs-Assay (Proteaseaktivitätstest)**

- 10×Puffer: 300 mM Tris-Cl (pH=7,8), 100 mM KCl, 5 mM DTT
- ATP-Stammlösung: 100 mM, Endkonzentration: 2 mM
- MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung: 100 mM, Endkonzentration: 5 mM
- Suc-LLVY-AMC (N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-amido-4-methylcumarin: Stammlösung: 4 mM, in DMSO gelöst

Die Proben (jeweils 1  $\mu$ l) wurden zusammen mit dem Puffer (mit oder ohne ATP + MgCl<sub>2</sub>) und dem fluogenen Substrat auf eine schwarze Mikrotiterplatte pipettiert ( $V_g=100 \mu$ l) und bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden die Signale am Fluoreszenzmessgerät (Fluostar) aufgezeichnet (Extinktion: 390 nm, Emission: 460 nm).

#### **5.2.6.4. Ammoniumsulfatfällung**

Die immunoaktiven Fraktionen wurden gepoolt und mit Ammoniumsulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gefällt. Durch langsame Zugabe des festen Ammoniumsulfats bis zu der maximalen Konzentration von 40% (w/v) und unter Rühren wurden die Proteine im Kühlraum gefällt. Nach Zugabe des Ammoniumsulfats wurde das Gemisch für weitere 30 min gerührt und danach bei 14000 rpm 10 min lang bei 4°C zentrifugiert (Rotor JA-14, Beckman). Das Pellet wurde in etwa 5 ml Puffer A gelöst und gegen 2 Liter Puffer A im Dialyseschlauch über Nacht dialysiert.

#### **5.2.6.5. Dichtegradientenzentrifugation I**

Nach der Dialyse erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation. Mit einem Gradientenmischer wurde ein kontinuierlicher Gradient von 10-40% Glycerol (Puffer A) in Zentrifugenröhrchen gegossen ( $V_g=38$  ml). Die zuvor aufkonzentrierten Proben (Centricon<sup>®</sup> Plus-20, Amicon) wurden auf den Gradienten geschichtet und bei 27000 rpm für 24 h bei 4°C zentrifugiert (Rotor SW28, Beckman). Der Gradient wurde von unten nach oben in Fraktionen zu 2 ml gesammelt und mit Antikörpern gegen CSN-, 20S Proteasom- und Lid-Untereinheiten sowie gegen die Kinasen getestet.

#### **5.2.6.6. FPLC: ResourceQ-Säule**

- FPLC-Puffer A: 10 mM Tris-Cl (pH=7,6), 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 50 mM KCl
- FPLC-Puffer B: 10 mM Tris-Cl (pH=7,6), 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 1 M KCl

Die immunoaktiven Fraktionen des Dichtegradienten wurden mittels FPLC-System über eine ResourceQ-Säule aufgetrennt. Vor dem Auftragen wurde die Probe 1:3 mit FPLC-Puffer A verdünnt. Mit dem Superloop wurde die Probe mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/min auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 145 bis 430 mM KCl (10-40% Puffer B). Das Eluat wurde in Fraktionen zu 1 ml gesammelt. Diese wurden anschließend mit Antikörpern gegen CSN-, 20S Proteasom- und Lid-Untereinheiten sowie gegen die Kinasen getestet. Die immunoaktiven Fraktionen wurden gepoolt und für weitere Reinigungsschritte verwendet.

#### **5.2.6.7. FPLC: MonoQ-Säule**

Durch die MonoQ-Säule können die Proben aufgrund der hohen Partikelhomogenität des Säulenmaterials und der besonders kleinen Partikelgröße besser (feiner) aufgetrennt werden. Nach Umpufferung auf Puffer A (Centricon<sup>®</sup> Plus-20, Amicon) wurden die Proben in einem linearen Gradienten von 260 bis 430 mM KCl an einer MonoQ-Säule getrennt (22-40% Puffer B). Es wurden Fraktionen zu 1 ml gesammelt. Anschließend wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE, Westernblot und nativen Gelen getestet. Durch die SDS-PAGE, den Westernblot und die nativen Gele wurde die Reinheit des CSN-Komplexes überprüft. Normalerweise erhält man aus den Fraktionen 10 bis 12 den aufgereinigten Komplex.

#### **5.2.6.8. Dichtegradientenzentrifugation II („Kleiner Gradient“)**

Unreine CSN-Fractionen aus der MonoQ-Säule wurden letztmalig gepoolt und nach Aufkonzentrierung (Centricon<sup>®</sup> Plus-20, Amicon) auf einen kleineren kontinuierlichen Gradienten von 10-30% Glycerol geschichtet und bei 27000 rpm und 4°C für 24 h zentrifugiert (Rotor SW40, Beckman). Danach wurde der Gradient von unten nach oben in 600 µl-Fractionen aliquotiert. Die CSN-haltigen Fractionen wurden auf ihre Reinheit überprüft (s.o.).

#### **5.2.7. Kinase-Assay (in vitro)**

In den Kinase-Assays wurde entweder der gereinigte CSN-Komplex (ca. 1 µg) oder es wurden die rekombinanten Kinasen (CK2 ( $\alpha_2\beta_2$ ) und PKD, beide von Calbiochem) mit Substrat (rekombinantes c-Jun, p53 und CSN6 sowie I $\kappa$ B $\alpha$  (Santa Cruz)) und 10 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (ICN) für 1h bei 37°C in 20 µl Endvolumen inkubiert. Die Kinase-Inhibitoren DRB, Emodin und Resveratrol wurden von Calbiochem bezogen, das Curcumin von Sigma. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 µl 4× SDS-PAGE-Probenpuffer gestoppt und 3 min gekocht. Die Proben wurden in der SDS-PAGE getrennt, anschließend mit Coomassie gefärbt und getrocknet. Die Gele wurden mittels Autoradiographie unter Verwendung von Biomax XR-Filmen (Kodak) ausgewertet.

Die Detektion der Phosphorylierung der CSN-Untereinheiten erfolgte in 50 µl Reticulocyten-Lysat (Promega) durch Zugabe von 40 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (ICN) und Inkubation für 30 min bei 37°C. Anschließend wurde der CSN-Komplex präzipitiert (s.u.) und nach SDS-PAGE wurde die Phosphorylierung anhand der Autoradiographie bestimmt.

- Kinase-Assay-Puffer: 30 mM Tris-Cl (pH=7,8), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,5 mM DTT

### **5.2.8. Berechnung der spezifischen Curcumin-sensitiven Kinaseaktivität**

Die spezifische Curcumin-sensitive Kinaseaktivität wurde im Erythrocyten-Lysat und in den nachfolgend gepoolten Fraktionen aus den verschiedenen CSN-Präparationsschritten bestimmt. Hierbei wurde rekombinantes c-Jun (1  $\mu$ g) als Substrat benutzt und die Reaktion mit und ohne Curcumin (50  $\mu$ M) durchgeführt. Nach der SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie wurden die Ergebnisse densitometrisch ausgewertet (IPLab Gel, Signal Analytics). Die Kinaseaktivität in Gegenwart von Curcumin wurde von der Aktivität ohne Inhibitor subtrahiert. Diese Differenz wurde auf die Proteinmenge (Bradford-Reagenz, Biorad) normiert und als die spezifische Curcumin-sensitive Kinaseaktivität bezeichnet. Zur Veranschaulichung wurde die Aktivität im Erythrocyten-Lysat auf den Wert eins festgelegt und darauf basierend die Werte der nachfolgenden Schritte berechnet. So konnten die Aufreinigungsfaktoren der spezifischen Curcumin-sensitiven Kinaseaktivität dokumentiert werden.

### **5.2.9. Berechnung der Kinase-Inhibition ( $IC_{50}$ -Werte)**

Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte der Kinase-Inhibitoren DRB, Emodin, Resveratrol und Curcumin erfolgte im Kinase-Assay mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen (0,10, 20, 50 und 100  $\mu$ M) und c-Jun als Substrat. Die Ergebnisse wurden ebenfalls densitometrisch ausgewertet (IPLab Gel, Signal Analytics). Mit Hilfe der Solver-Optimierung (Excel, Microsoft) konnten aus den experimentellen Daten die  $IC_{50}$ -Werte berechnet werden.

### **5.2.10. Peptidsynthese**

Die Peptidsynthese der verschiedenen p53-Peptide  $\Delta$ p53(145-164) wurde mit Hilfe der FMOC-Strategie an einem 433A Peptidsynthesizer (ABI) durchgeführt. Phosphoryliertes Serin und Threonin wurden von Novabiochem bezogen.

### **5.2.11. Phosphopeptid-Analyse**

Die durch den CSN-Komplex im Kinase-Assay phosphorylierten Proteine (etwa 6  $\mu$ g) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie gefärbt (siehe 5.2.7). Die

entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die Gelstücke zur Phosphopeptid-Analyse verwendet. In eine In-situ-Spaltung wurden die Proteine mit Chymotrypsin (Boehringer-Mannheim) verdaut. Die vom Gel eluierten Peptide wurden durch RP-HPLC aufgetrennt und in Fraktionen gesammelt. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde mittels Szintillationszähler ermittelt. Die Phosphopeptide der radioaktiven Fraktionen wurden anschließend durch Peptid-Sequenzierung und Massenspektrometrie identifiziert.

### **5.2.12. Elektronenmikroskopische Untersuchung des aufgereinigten CSN-Komplexes**

Die Elektronenmikroskopie wurde von Dr. Barbara Kapelari am MPI für Biochemie in Martinsried durchgeführt. Für die Bindungsstudien wurde ein 2 µl-Tropfen des aufgereinigten CSN-Komplexes mit 1 µl des goldmarkierten AMP-PCP (ATP-Analogon) für 7 min inkubiert und anschließend für die elektronenmikroskopische Analyse aufbereitet. Es wurde ein CM12-Transmissionen-Elektronenmikroskop benutzt (Philips), mit einer Beschleunigungsspannung von 120kV. Die Bilder wurden digital aufgezeichnet (Photometrix slow scan CCD, 1024×1024 pixel). Die Gesamtvergrößerung betrug 45.700 mit einer Defokussierung von 2 µm.

### **5.2.13. Präparation rekombinanter Proteine**

Die cDNAs der humanen Proteine wurden in pQE-Vektoren (Qiagen) kloniert, die für einen 6×His-Tag am N-Terminus der Proteine kodieren. Die Herstellung der rekombinanten Proteine wurde nach der Vorschrift von Qiagen durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden die Substrate c-Jun und p53, sowie das Mdm2 als vollständige Proteine rekombinant im *E.-coli*-System hergestellt. Die Reinigung der 6×His-markierten Proteine erfolgte mittels Ni-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen. Anschließend wurde die Rückfaltung der Proteine durch Dialyse eingeleitet. Die Reinheit der Proteine wurde anhand der SDS-PAGE überprüft und die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (Bradford-Reagenz, Biorad) ermittelt.

### 5.2.14. Immunofluoreszenzmikroskopie

In 4-well-Platten, in denen sich autoklavierte Objektträger befanden, wurden etwa  $10^6$  MCF-7-Zellen/well ausgesät, und die Zellen wurden über Nacht (üN) im Brutschrank inkubiert. Die Objektträger mit den adhärenierten Zellen wurden  $3\times$  für ca. 3 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung (in PBS) für 10 min bei Raumtemperatur (RT). Danach wurde erneut mit PBS dreimal gewaschen (max. 5 min). Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,1% Triton-X100 in PBS für 10 min bei RT und einer anschließenden Waschung mit PBS ( $3\times$ ).

Die folgenden Schritte wurden in einer Feuchtigkeitskammer durchgeführt. Zuerst wurde mit 5% Serum/PBS für 20-30 min bei RT blockiert. Dabei wurde entweder Ziegen- oder Pferdeserum verwendet. Nun wurde der erste Antikörper (in PBS) auf die Zellen gegeben (Antikörperverdünnung laut Anbieter). Die Inkubation erfolgte entweder bei  $37^\circ\text{C}$  für 1-2 h oder üN bei RT. Es folgte eine dreimalige PBST-Waschung für jeweils 5-10 min. Nun wurde der zweite fluoreszenzmarkierte Antikörper (Molecular Probes, Dianova) zugesetzt und entweder bei  $37^\circ\text{C}$  für 1h oder üN bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine dreimalige PBST-Waschung für je 5-10 min.

Zum Schluss wurden die Zellen mit VECTASHIELD mounting media (Vector Laboratories) benetzt, in das vorher 10-20  $\mu\text{l}$  DAPI (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pipettiert wurden (Farbstoff interkaliert mit DNA). Nach vorsichtiger Platzierung eines Deckgläschens (22 $\times$ 50 mm) und nach Aufsaugen des überschüssigen Mediums, wurden die Deckgläser mit einem Kleber (PANG) versiegelt. Gemessen wurde an Laserscanning-Mikroskopen von Zeiss (z.B. LSM510). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit IPLab (Scanalytics).

### 5.2.15. Immunopräzipitation (IP)

Für die IP wurde der anti-CSN7-Antikörper eingesetzt (5-10  $\mu\text{l}$ ) und in Lysispuffer B (siehe Zellkultur) präzipitiert ( $V_g=0,5$  ml). Die Kontrollen wurden entweder ohne den anti-CSN7-Antikörper oder mit Präimmenserum bzw. einem nichtpräzipitierenden Antikörper durchgeführt. Als Ausgangsmaterial wurde entweder Zelllysat (ca.  $5\times 10^6$ - $1\times 10^7$  Zellen/Ansatz), Reticulocytenlysat (50  $\mu\text{l}$ ), der isolierte CSN-Komplex (ca. 10  $\mu\text{g}$ ) oder es wurden rekombinante Proteine benutzt, wobei im letzten Fall eine 30-minütige Vorinkubation der Proteine mit dem gereinigten CSN-Komplex (ca. 5-10  $\mu\text{g}$ )

bei 37°C erfolgte (Myc-PKD: 0,5 µg, Calbiochem und His<sub>6</sub>-Mdm2: 3 µg). Nach Zugabe des Antikörpers wurde für 2h auf einer Drehplattform bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Inkubation nach Zugabe von je 50 µl Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences) bei 4°C über Nacht fortgesetzt.

Die sich anschließende Waschung (bis zu 5×!) erfolgte mit dem gleichen Puffer. Das Präzipitat wurde nun entweder für den Kinase-Assay eingesetzt oder über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet (Biorad). Die Membranen wurden mit Ponceau-S gefärbt und dann mit 5% Milch-PBS für 1 h bei RT blockiert. Danach wurden die Blots mit den jeweiligen primären Antikörpern für 1-2 h bei RT inkubiert. Nach 10-minütiger Waschung (3×) mit PBST wurden die Blots weiter mit entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert, die (nach erneutem Waschen) mittels ECL- oder ECL<sup>Plus</sup>-Technik nach Firmenvorschrift (Amersham Biosciences) detektiert wurden.

#### **5.2.16. Far-Westernblot-Analyse (Filterbindungs-Assay)**

Die rekombinanten Untereinheiten (je 0,5 µg) des CSN und der gereinigte Komplex wurden durch die SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Die Membranen wurden mit Ponceau-S gefärbt und anschließend mit 5% Milch-PBS für 1 h bei RT blockiert. Die immobilisierten Untereinheiten wurden mit unterschiedlichen Proteinen (1,5 µg/ml in PBS) für 2 h bei RT inkubiert. Nach 3× Waschen mit PBST wurden die Blots mit den jeweiligen primären Antikörpern für 1-2 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Blots weiter mit entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert, die mittels ECL- oder ECL<sup>Plus</sup>-Technik (s.o.) detektiert wurden. Zur Kontrolle wurden die gebundenen Proteine anschließend durch eine Inkubation der Blots mit Stripping-Puffer (62, 5 mM Tris-Cl (pH=6,7), 2% SDS, 100 mM β-Mercaptoethanol) von den Blots abgewaschen. Danach wurden die Blots erneut mit den gleichen Antikörpern getestet.

#### **5.2.17. Ubiquitylierungs-Assay**

Da für den Assay HeLa-Zelllysate (je 5×10<sup>5</sup>Zellen/Ansatz) als Lieferant für das Ubiquitin-System benutzt wurden, fand die Reaktion (V<sub>g</sub>=75 µl) im Lysispuffer B (mit 0,5

mM DTT) statt. Zusätzlich wurde ein ATP-regenerierendes System hinzugegeben: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ATP, 10 mM Kreatinphosphat und 0,6 U/Ansatz Kreatinkinase. Pro Ansatz wurden 0,6 µg rekombinantes Mdm2 und optional 9 µg Ubiquitin (Sigma) eingesetzt. Curcumin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt. Während der Inkubation bei 37°C für max. 8h wurden zu definierten Zeiten Aliquots abgenommen (jeweils 13,5 µl + 4,5 µl 4×Probenpuffer). Diese wurden auf ein 7,5%iges SDS-PA-Gel aufgetragen und im Westernblot analysiert.

- ATP- u. MgCl<sub>2</sub>-Stammlösung: 100 mM
- Kreatinphosphat-Stammlösung: 500 mM
- Kreatinkinase-Stammlösung: 300 U/ml
- Ubiquitin-Stammlösung: 6 mg/ml
- Curcumin-Stammlösung: 20 mM, in DMSO gelöst
- MG132-Stammlösung: 10 mM, in DMSO gelöst
- Lysispuffer B: siehe Zellkultur

### **5.3. Zellkultur**

- Zelllinien: humane HeLa-Zellen, humane MCF-7-Zellen
- Medium: RPMI 1640 Medium, 10% FCS, 100 U Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin

Die Zelllinien wurden in RPMI-Medium bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Bei den Inhibitor-Studien wurden 10<sup>6</sup> Zellen/well in 6er-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren für 4h im Brutschrank inkubiert. Den Proteasom-Inhibitor MG132 lieferte Affiniti. Die Zellextrakte wurden nach einem Standardverfahren hergestellt. Zu den adhären wachsenden Zellen wurde der eiskalte Lysispuffer direkt in die Kulturschale gegeben und anschließend mittels Zellschaber auf der Kulturschale lysiert. Anschließend erfolgte ein mehrmaliges Aufsaugen durch eine 21-gauge Nadel und eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C mit 15000g. Der Überstand wurde mittels Westernblot untersucht.

- RIPA-Lysis-Puffer (Triple-Lysis-Puffer): 50 mM Tris-Cl (pH=8,0), 150 mM NaCl, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,02% Natriumacid, ergänzt mit 1 µg/ml Aprotinin und 1 mg/ml PMSF
- Lysis-Puffer B: (Mono-Lysis-Puffer): 20 mM Tris-Cl (pH=8,0), 150 mM NaCl, 0,05% Triton X-100, 2 mM EDTA, ergänzt mit 20 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und dem Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche).