

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht gesondert vermerkt, wurden Chemikalien im Reinheitsgrad p.A. von folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz) und Merck (Frankfurt). Restriktionsenzyme wurden von Roche (Basel) bzw. New England Biolabs (Frankfurt) erworben, T4-DNA-Ligase, T4-Polynukleotidkinase und T4-DNA-Polymerase stammten von Roche (Basel), Taq-Polymerase und Desoxyribonukleotide von Invitrogen (Karlsruhe). Pfu-Polymerase stammte von Stratagene (La Jolla, CA, USA). Mit den beschriebenen Enzymen verwendete Puffer wurden vom jeweils gleichen Hersteller bezogen. Die verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze wurden, falls nicht gesondert angeführt, von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

5.1.2 Lösungen und Medien

Für alle Medien und Puffer wurde deionisiertes Wasser (ddH₂O, membraPure, Bodenheim) verwendet. Wo angegeben, wurde der pH-Wert mittels NaOH oder HCl eingestellt. Zur Sterilisierung wurden Lösungen und Medien 20 min bei 121°C/2x10⁵ Pa autoklaviert. Wo nicht anders angegeben wurden die Lösungen nach [SAMBROOK et al. 1989] hergestellt.

Tabelle 5.1: Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
b-Hexosaminidase-Lösung	10mM para-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-b-D-glucopyranosid in 0,1M Na-Zitrat pH 4,6; 0,04% Azid; 0,2% BSA
DEPC-Wasser	900µl Diethylpyrocarbonat auf 450ml H ₂ O; schütteln, über Nacht bei 37°C inkubieren, autoklavieren
DNA-Ladepuffer (10x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 30% (w/v) Glycerol

Fortsetzung auf der folgenden Seite...

5 Material und Methoden

Tabelle 5.1 – Fortsetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfriermedium	10% DMSO im jeweiligen Zellkulturmedium (sofort einfrieren oder verbrauchen, da oxidiertes DMSO als Zellgift wirkt)
Fixierlösung	4% PFA in PBS
Homogenisationspuffer	HBS, pH 7.4 + 1x Complete (Roche), 1mM Pefabloc (Roche)
Hot Shot Lysis-Puffer	25mM NaOH ; 0,2mM EDTA ; pH 12
Hot Shot Neutralisierungs-Puffer	40mM Tris-Cl ; pH 5
Immunfluoreszenz Blocklösung	3% BSA; 0,01% Saponin in PBS
Ketamin-Rompun	120µl Ketamin10; 80µl 2%Rompun; 800µl PBS
Niedrig-TE-Puffer	10mM Tris pH 7,5; 0,1M EDTA pH 8; pH 7,1 mit HCl
Ringerlösung (ohne Bicarbonat)	145mM NaCl; 0,4mM KH ₂ PO ₄ ; 1,6mM K ₂ HPO ₄ ; 5mM Glukose; 1mM MgCl ₂ x6H ₂ O; 1,3mM Ca-Gluconat; pH 7,4
Sammelgelpuffer	0,5M Tris; 0,4% SDS; pH 6,8
Schwanzlysepuffer	100mM NaCl, 1%SDS, 50mM Tris pH 8, 100mM EDTA pH 8; 0,5mg/ml Proteinase K
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	250mM Tris; 2M Glycin; 1%SDS
SDS-PAGE-Probenpuffer (5x)	250mM Tris; 10% SDS; 0,5% Bromphenolblau; 50% Glycerol; bei 50°C lösen
Stopplösung	0,2M Glycin/NaOH; pH 10,8
TAE-Puffer (50x)	0,2M Tris-Acetat; 10mM EDTA pH 7,4
TBE-Puffer (10x)	1M Tris-HCl, 1M Borsäure, 20mM EDTA, pH 8
TBS-Puffer (10x)	1,37M NaCl; 27mM KCl; 250mM Tris; pH 7,4 mit HCl
Trenngelpuffer (4x)	1,5M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8 mit HCl
Trypsin/EDTA	0,25% Trypsin; 0,02% EDTA in PBS
WB-Blockpuffer	3% Magermilchpulver; 0,2% NP-40 in PBS
Zitratpuffer (0,01M)	9ml 0,1M Zitratsäure; 41ml 0,1M Na-Zitrat; 450ml H ₂ O; pH 6

5.1.3 Antikörper

In Tabelle 5.2 sind die verwendeten Primärantikörper aufgelistet. Für die Detektion im Western Blot wurden mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelte Sekundärantikörper und für die Immunfluoreszenz Alexa Fluor-farbstoffgekoppelte Sekundärantikörper, wie in Tabelle 5.3 angegeben, verwendet

Tabelle 5.2: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung für Western Blot (WB), Immunpräzipitation (IP) und Immunfluoreszenzfärbung (IF). Kaninchen (Kan.), Meerschweinchen (Mrs.)

Name	Zielepitop	Spezies	Verdünnung			Referenz
			WB	IP	IF	
7N4B	GRDRDDEEGAPLL[C]	Kan.	1:500	1:50	1:200	[KORNAK et al. 2001]
7C3	RFPPIQSIHVSQDEREC-NH ₂	Kan.			1:100	AG Jentsch
6N2	INDPYLEVLETMDNK[C]	Kan.	1:500	1:50		AG Jentsch
5A1	KSRDTRHRKITSK	Kan.	1:500		1:250	AG Jentsch
3A4	CKDRERHRRINSKKKE	Kan.	1:1000			AG Jentsch
glC2	[C]LKSSSTSFANIQENAT	Kan. 47 Boost 5	1:250	1:50	1:100	AG Jentsch

Fortsetzung auf der folgenden Seite...

Tabelle 5.2 – Fortsetzung

Name	Zielepitop	Spezies	Verdünnung			Referenz
			WB	IP	IF	
gIC3	[C]KRLKSSTSFANIQENAK	Kan. 8303 Boost 6	1:250	1:50	1:100	AG Jentsch
gIN3	PFTSSRHPGFADLLSEQQLKLVQDTG	Kan. 8303 Boost 5	1:100			AG Jentsch
a3	PDASTLENSWSPDEEK	Kan.				AG Jentsch
9E10-Hyb	cMyc (AA 408-439)	Maus	1:50	1:25-100	1:500	DSHB
9E10	cMyc (AA 408-439)	Maus	1:200	1:100	1:500	Santa Cruz (Heidelberg)
9B11	cMyc (AA 408-439)	Maus	1: 200		1:500	Cell Signaling 2276
A-14	cMyc	Kan.	1:200	1:25-100	1:500	Santa Cruz (Heidelberg)
Y-11	HA	Kan.		1:25-100		Santa Cruz (Heidelberg)
3F10	HA	Ratte	1:1000		1:500	Roche (Basel)
hLamp-1	humanes Lamp-1	Maus	1:1000			BD Pharmingen (San Jose)
Lamp-1	Maus-Lamp-1 1D4B	Klon Ratte			1:1000	BD Pharmingen (San Jose)
hCD63	humanes CD63	Maus			1:200	Cymbus Biotech. (Manchester)
EEA1	N-Term. (AA 3-281)	Maus			1:100	Transduction Labs (San Jose)
PDI	DDDQKACKDEL	Maus			1:200	StressGen (Victoria)
cathD	Chathepsin D	Kan.	1:50			Oncogene
CBL 127	CD4	Maus			1: 200	Cymbus Biotechnology

Tabelle 5.3: Verwendete Sekundäntikörper und ihre Verdünnung. HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelte Zweitantikörper wurden für Western Blot-Experimente, Alexa Fluor-gekoppelte Zweitantikörper in Immunfluoreszenzen verwendet. Die Sekundäntikörper wurden von Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA) oder Molecular Probes (Göttingen) bezogen.

Name	Zielepitop	Spezies	Verdünnung	Referenz
α -mouse-HRP	Maus-IgG	Schaf	1:5000	Jackson ImmunoResearch
α -rat-HRP	Ratten-IgG	Ziege	1:5000	Jackson ImmunoResearch
α -gp-HRP	Meerschweinchen-IgG	Ziege	1:5000	Jackson ImmunoResearch
α -rab Alexa-488	Kaninchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -mouse Alexa-488	Maus-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -rat Alexa-488	Ratten-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -gp Alexa-488	Meerschweinchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -rab Alexa-546	Kaninchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -rab Alexa-555	Kaninchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -mouse Alexa-546	Maus-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -mouse Alexa-555	Maus-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -rat Alexa-546	Ratten-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -rat Alexa-555	Ratten-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -gp Alexa-546	Meerschweinchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -gp Alexa-555	Meerschweinchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -rab Alexa-633	Kaninchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -mouse Alexa-633	Maus-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -rat Alexa-633	Ratten-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes
α -gp Alexa-633	Meerschweinchen-IgG	Ziege	1:1000	Molecular Probes

5.1.4 Zelllinien

HEK293 humane embryonale Nierenzelllinie, ATCC CRL-1537

HeLa humane Cervixcarzinom-Zelllinie.

Mausfibroblasten Adulte, primäre und immortalisierte Fibroblasten aus Wildtypmäusen, CIC-7 Knockout Mäusen und *gl* Mäusen (AG-Jentsch).

Neuronen Primäre hippocampale Neuronen aus Wildtypmäusen, CIC-7 Knockout Mäusen und *gl*-Mäusen (AG-Jentsch).

5.1.5 Bakterienstämme

XL1-Blue *endA1, hsdR12(r_K⁻, m_K⁺), supE44, gyrA46, thi-1, relA1, lac⁻, F⁻, proAB, lac1^q, lacZΔM15, tet^r, recA1*

DH5α *F⁻, φ80 dlacZMΔ15, Δ(lacZYA-argF) U169, recA1, endA1, hsdR17 (r_K⁻, m_K⁺), supE44, λ⁻, thi-1, gyrA46, relA1*

5.1.6 Grey-lethal Mäuse

Grey-lethal Mäuse wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) als doppelt heterozygote Mäuse mit dem Genotyp *GL/Le Edar^{dl-J}+/+ Ostm1^{gl/J}* bezogen. Die Mäuse wurden einmal mit C57BL/6 Mäusen gekreuzt und im folgenden das *gl* Allel durch Züchtung isoliert. Homozygote *gl/gl* Mäuse wurden durch Verpaarung von zwei heterozygot *+/gl* Tieren gezüchtet. Die für die Versuche verwendeten Tiere weisen einen unbekanntem genetischen Hintergrund auf und sind ein bis 5 Generationen in den C57BL/6 Hintergrund zurück gekreuzt.

5.1.7 Filmmaterialien und bildgebende Verfahren

Zur Western Blot Detektion wurden Kodak X-Omat AR Röntgenfilme bzw. Kodak Bio-max MR Röntgenfilme (Kodak, Stuttgart) mit dem automatischen Röntgenfilmentwickler Curix 60 (AGFA, Köln) verwendet. Alternativ wurden die CCD Kamerasysteme ChemiDoc (BioRad, Hercules, US) oder ChemiSmart2000 (PeqLab, Erlangen, Deutschland) verwendet. Die Digitalisierung von Röntgenfilmen erfolgte mit einem Flachbettscanner, Epson Expression 1680 Pro. Agarosegele wurden mit einem Digital-Video-System (Intas, Göttingen) aufgenommen und auf Thermopapier ausgedruckt. Die Dokumentation von

Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte am konfokalen Lasermikroskop Leica TCS (Leica Microsystems, Heidelberg) bzw. mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioplan2 (Zeiss, Jena).

5.1.8 Elektronische Datenverarbeitung und Datenanalyse

Für die Analyse von Daten wurden die folgenden Programme verwendet: Die DNA-Sequenzdaten wurde mit dem Software-Paket DNASTAR 4.0 - 5.0 (DNASTAR Inc., Madison, US) oder alternativ mit Vector NTI Advance 9.0 (Informax, Oxford, UK) bearbeitet. Die Prozessierung und Analyse der Bilddaten des konfokalen Lasermikroskop erfolgte mit der Leica Confocal Software V.2.00 Build 0437 (Leica Microsystems, Heidelberg). Die densitometrische Analyse wurde mit den Softwarepaketen Tina 2.0 (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) oder Quantity One (BioRad, Hercules, US) durchgeführt.

5.2 Molekularbiologische Techniken

Die Bezugsquelle oder die Herstellung der verwendeten Plasmidkonstrukte ist in Kapitel A.1 beschrieben. Erzeugte Klone wurden durch Restriktionsverdau auf erfolgreiche Insertion und korrekte Ausrichtung eingeführter Sequenzen getestet. Alle durch Polymerasekettenreaktion generierten Fragmente wurden sequenziert, um das Auftreten von durch die Amplifizierung eingeführten Mutationen auszuschließen.

5.2.1 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation wurden elektrokompente Zellen der Stämme XL1-Blue, XL10 oder DH5 α verwendet. Je 1-3 μ l des Ligationsansatzes wurden zu 50 μ l elektrokompenten Zellen auf Eis in eine Elektroporationsküvette gegeben. Die DNA wurde durch einen Stromstoß (25 μ F, 2,5 kV, R=400 Ω) in die Zellen eingebracht. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde die Zellsuspension 30 Minuten bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien im Mini-Maßstab wurde das E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit 1 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) verwendet. Dieses Isolations-Kit kombiniert die Methoden der alkalischen Lyse [BIRNBOIM und DOLY 1979] mit der selektiven und reversiblen Bindung der DNA an eine Silikamembran. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Die Isolation von 100-200 µg Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien im Midi-Maßstab erfolgte mit dem Jet Star Plasmid Purification System (Genomed, Löhne) nach Angaben des Herstellers. Das durch Zentrifugation aus 50-100 ml Übernachtskultur gewonnene Bakterienpellet wird dabei mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen.

5.2.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA Lösungen erfolgte durch photometrische Messung der OD bei 260 nm mit einem Photometer GeneQuant II (Pharmacia, Uppsala). Für die Berechnung der DNA-Konzentration wurde einer OD von 1 die Konzentration von 50 µg /ml doppelsträngiger DNA zugrunde gelegt. Für die Bestimmung der Reinheit der DNA-Lösung wurde der Quotient aus OD 260 nm/OD 280 nm gebildet. Eine proteinfreie DNA Präparation sollte ein Verhältnis von 1,8 aufweisen.

5.2.4 Restriktionsverdau

1 µg DNA wurden mit 5 U des jeweiligen Restriktionsenzym und 2 µl 10x Puffer nach Angaben des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 20 µl für eine Stunde inkubiert. Die Reaktionstemperatur betrug in der Regel 37 °C oder 25 bis 65 °C, nach Angaben des Herstellers.

5.2.5 Phosphorylierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um Oligonukleotide ohne vorherige PCR in einer Ligation einsetzen zu können, wurden sie zuvor am 5'-Ende durch T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK) phosphoryliert und zu einem doppelsträngigen Fragment hybridisiert. Hierfür wurde je 2 µl , 100 µM der komplementären Oligonukleotide mit 10 µl 5x Ligasepuffer und 1 µl T4 PNK in einem 50 µl

-Ansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde für 20 min auf 95°C erhitzt und dann langsam (5 °C/5 min) abgekühlt.

5.2.6 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Selbstligation von linearisierten Plasmidvektoren mit komplementären Enden zu verhindern, wurden diese durch Zugabe von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert. Dabei wurde dem Restriktionsverdau 1 U alkalische Phosphatase (Roche, Basel, Schweiz) zugesetzt und der Ansatz für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde anschließend einer Gelelektrophorese mit folgender Gelelution unterzogen.

5.2.7 Auffüllen und Entfernen überhängender DNA-Enden

Zur Ligation nicht-kompatibler, überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten wurden diese Enden zunächst aufgefüllt. Da die T4-DNA-Polymerase sowohl eine 3'-5'-Exonuklease- als auch eine 5'-3'-Polymeraseaktivität besitzt, kann sie 3'-Überhänge abbauen und 5'-Überhänge auffüllen. Verdau-Ansätze von 30µl, die bis zu 5µg DNA enthielten, wurden mit 2U T4-Polymerase pro µg DNA und 1µl 2,5mM dNTP-Mix versetzt und für 15min bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die Polymerase durch eine 10minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert.

5.2.8 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse sowie der präparativen Trennung von DNA-Fragmenten wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Es wurden Flachbettgelapparaturen und je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente 0,8-2%-ige Agarosegele mit TAE, versetzt mit 0,5 mg/l Ethidiumbromid, verwendet. Zur Größenbestimmung wurde der DNA-Marker 1 kB-Leiter von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Zur Visualisierung wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator photographiert.

5.2.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Basel, Schweiz) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wird die Agarose durch Inkubation in einem Puffer mit chaotropen Salzen bei

55 °C aufgelöst und die DNA mittels Anionenaustauschersäulen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 µl /H₂O.

5.2.10 Ligation

Zur Ligation von Restriktionsfragmenten wurden 1-2 µl des Vektorfragmentes, bis zu 6,3 µl Insertfragment (etwa die zweifache molare Menge des Vektorfragmentes), 2 µl 5x T4-DNA-Ligase-Puffer und 0,7 µl T4 Ligase (5 U/µl) in einem Volumen von 10 µl für 4-16 h bei 16 °C inkubiert.

5.2.11 Amplifizierung von PCR-Fragmenten zur Klonierung aus cDNA oder Subklonierung

Sollte ein Fragment aus einer cDNA-Bank kloniert werden oder waren keine geeigneten Schnittstellen für die Subklonierung eines DNA-Fragmentes vorhanden, amplifiziert man das entsprechende Segment mittels einer PCR. Die dabei verwendeten Primer wiesen 5'-Überhänge mit der Sequenz der zur Ligation in den Vektor gewünschten Restriktionsschnittstelle auf. Um Probleme beim Restriktionsverdau zu vermeiden, die bei Verwendung von Schnittstellen nahe dem Ende linearer DNA-Fragmente entstehen können, wurde der Überhang um mehrere beliebige Nukleotide hinter der Erkennungsstelle des Enzyms verlängert.

Alle PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Standardansatz mit 50 µl Reaktionsvolumen angesetzt:

1 µg DNA-Template
je 1 µl (10 pMol/µl) Vorwärts- und Rückwärts-Primer
5 µl 10x Pfu Polymerasepuffer
4 µl dNTPs
1 µl Pfu oder PfuTurbo
ad 50 µl H₂O

Ein Standard-PCR-Programm (hier für die Klonierung von Ostm1 aus cDNA) sah folgendermaßen aus. Die Annealingtemperatur wurde den eingesetzten Primern entsprechend angepasst. PCR-Reaktionen wurden auf einem Thermocycler der Firma PerkinElmer (Boston, USA) durchgeführt.

7 min 97°C
37 Zyklen [30sec 97°C, 30sec 55°C, 2 min 72°C]
7 min 72°C
∞ 10°C

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze mit DNA-Probenpuffer versetzt und die Produkte über ein Agarosegel aufgereinigt.

5.2.12 Rekombinante PCR

Punktmutanten und Chimären wurden mittels rekombinanter PCR generiert. Für Punktmutationen wurden in zwei getrennten Standard-PCR- Ansätzen der Sequenzabschnitt ober und unterhalb der Position, an der die Punktmutation eingeführt werden sollte, amplifiziert. Dabei enthielten die inneren Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die in einem Bereich von etwa 15 Nukleotiden zueinander komplementär waren, die gewünschte Mutation. Für die Generierung von Chimären wurde das benötigte Fragment jeder cDNA amplifiziert und dabei an der Stelle, an der die cDNA aneinandergesetzt werden sollte, ein der zu fusionierenden Sequenz komplementärer Primer mit einem etwa 12 nt langen 5'-Überhang verwendet. Die Größe der entstandenen Fragmente wurde auf einem Agarosegel überprüft, die entsprechende Bande ausgeschnitten und extrahiert. Anschließend wurde erneut eine Standard-PCR angesetzt, wobei diesmal die beiden in der ersten PCR entstandenen Fragmente als Template dienten. Dabei wurden die jeweils weiter außen bindenden Primer aus der ersten Reaktion in dieser zweiten PCR erneut eingesetzt. Durch das Aneinanderlagern der kurzen komplementären Sequenzen und anschließende Elongation der 3'-Enden entstand in dieser Reaktion das cDNA-Fragment mit der gewünschten Punktmutation bzw. die gewünschte chimäre cDNA. Die Primer wurden so gewählt, dass ihr dem Template komplementärer Abschnitt so lang war, dass eine Schmelztemperatur (TM) von 50-55 °C erreicht wurde. Diese wurde folgendermaßen berechnet: $TM = 4(G \text{ oder } C) + 2(A \text{ oder } T)$. Die PCR-Reaktion wurde entsprechend modifiziert, so dass die Annealing- Temperatur 2-4 °C unter der errechneten Schmelztemperatur lag. Die Länge des Elongationsschritts wurde je nach Länge des erwarteten Fragments so eingestellt, dass eine Elongationsrate der Pfu-Polymerase von etwa 600 nt pro Minute zugrunde gelegt wurde. Folgendes Reaktionsgemisch wurde verwendet:

1 µl Primer 1 (100 pmol/ml)
1 µl Primer 2 (100 pmol/ml)

0,5-1 µg Template-DNA
5 µl Taq-Puffer
5 µl DMSO
0,5 µl TAQ-Polymerase
2 µl dNTPs (je 2,5 µM)
ad 50 µl H₂O

Durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen und anschließende Ligation wurden die Fragmente in die Ziel-DNA eingefügt.

5.2.13 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalyse wurde mittels Kettenabbruchverfahren [SANGER et al. 1977] im Servicelabor des ZMNH durchgeführt. DNA-Sequenzierungen wurden mit einem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Boston, USA) unter Verwendung des ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Boston, USA) durchgeführt.

5.2.14 RNA Präparation aus Gewebe

Zur Präparation von gesamt RNA wurde die Hälfte eine gefrohrenen Hippocampus in 800 µl TRIZOL (Gibco-BRL Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, US) überführt. Das wurde mit einer 2ml Spritze zerkleinert (10x 0.90 x 40 mm Nadel gefolgt von 10x 0.45 x 25 mm Nadel) und bei Raumtemperatur für 5 Minuten in TRIZOL inkubiert, bevor 160 µl (0.2 x vol TRIZOL) chloroform hinzugefügt wurden. Nach kräftigem Schütteln und 3 Minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 10 Minuten bei 4°C, 10000 rpm zentrifugiert. Die ober Phase wurde abgenommen und mit 0.4 ml Isopropanol versetzt. Nach Vortexen und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 14000 rpm, 4°C für 15 min Zentrifugiert. Das RNA Pellet wurde zwei mal mit 17% EtOH gewaschen und getrocknet bevor es in 100 µl DEPC Wasser resuspendiert wurde.

Die Konzentration und Reinheit wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt. Ein Aliquot (1-2 µg) wurde mittels Agarose-Gelelektrophores untersucht. Die RNA wurde im im folgenden über RNeasy Säulen (Quiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben weiter gereinigt und mit 35-40 µl DEPC-Wasser eluiert.

5.2.15 Northern Blot

Die Northern Blot-Analyse wurde von Lena Wartosch durchgeführt. Für die Northern Blot-Analyse wurden Mäuse MTNTM Multiple Tissue Northern Blot Membranen von Clontech, BD Bioscience (San Jose) verwendet. Zur Detektion spezifischer RNA wurde eine 1030 bp lange DNA-Sonde aus Maus Ostm1 DNA erstellt. Mittels *random priming* wurde die Sonde mit ³²P markiert (spezifische Aktivität der ExpressHyb Hybridisierungslösung: 2x10⁶ cpm/ml) und entsprechend dem Clontech Protokoll mit der RNA hybridisiert. Die Detektion erfolgte durch Belichtung von Kodak BioMax MR Film für 48h bei -70°C.

5.2.16 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Zur Genotypisierung von Mäusen wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Die Isolation erfolgte entweder mit Hilfe des Invisorb Kits (Invitex) nach Angaben des Herstellers oder mittels *Hot Shot*.

Bei der *Hot Shot*-Methode wurde das Gewebe je nach Größe mit 75-100 µl Lysis-Puffer versetzt und für 60min bei 95 °C erhitzt. Nach der alkalischen Lyse wurden 75-100 µl Neutralisationspuffer dazu gegeben und bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Phenol-Chloroform-Fällung wurde das Gewebe unter Schütteln in 0,5 ml Schwanzlyse-Puffer bei 55 °C über Nacht lysiert. Anschließend wurde das Lysat mit 500 µl einer 25:24:1 Mischung Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und 45 min bei RT über Kopf geschüttelt. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm bildete sich ein Zwei-Phasen-System, wobei sich an der Phasengrenze weißes Präzipitat gesammelt hatte. Die obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 500 µl Lithiumchlorid/Isopropanol (10 Volumina Isopropanol mit 1 Volumen 8 M LiCl) gefällt, indem die Mischung mehrmals invertiert wurde, wobei die genomische DNA als weißer filamentöser Niederschlag erkennbar wurde. Die DNA wurde durch 30 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand wieder abgenommen und das Pellet luftgetrocknet. Das trockene Pellet wurde in 50-100 µl Niedrig-TE-Puffer resuspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

5.2.17 Genotypisierung der Edar^{dl-J} Punktmutation mittels Sequenzierung

PCR Ansatz:

38,1 µl Wasser
5 µl 10x Puffer
2 µl MgCl₂
1 µl dNTPs (10 mM)
1 µl Primer(10 µM): 00221_edars + 00222_edar_as
0,4 µl Taq
1 µl Säulen DNA

PCR Programm:

5min 94 °C
35 Zyklen [30 s 94 °C; 30 s 52 °C; 30 sec 72 °C]
6 min 72°C
Unendlich 10 °C

Das PCR Produkt wurde mit mit den Primern 00221_edars und 00222_edar_as sequenziert.

5.2.18 Genotypisierung von CIC-7 Mäusen mittels PCR

PCR Ansatz:

10 µl Wasser
2,5 µl 10x Puffer
0,75 µl MgCl₂
0,5 µl dNTPs (10 mM)
0,5 µl Primer(10 µM): wt:6773 + 4272(Lz2f); ko 6775 + 6776
0,1 µl Taq
10 µl 1:20 verdünnte HotShot-DNA oder 1 µl Säulen-DNA

PCR Programm:

5min 95 °C
38 Zyklen [30 s 95 °C; 30 s 55 °C; 1 min 72 °C]

6 min 72°C
Unendlich 10 °C

PCR Produkte:

wt: 400 bp
ko: 250 bp (unspezifische Bande bei 500 bp)

5.2.19 Genotypisierung von *grey-lethal* Mäusen mittels PCR

PCR Ansatz:

38,1 µl Wasser
5 µl 10x Puffer
2 µl MgCl₂
1 µl dNTPs (10 mM)
1 µl Primer(10 µM): wt: 00111_pl53-mgl-wt-s + 00112_pl54-mgl-wt-as;
ko:00113_pl55-mgl-ko-s + 00114_pl56-mgl-ko-as
0,4 µl Taq
1 µl Säulen-DNA

PCR Programm:

5min 94 °C
35 Zyklen [30 s 94 °C; 30 s 52 °C; 30 sec 72 °C]
6 min 72°C
Unendlich 10 °C

PCR Produkte:

wt: 240 bp
ko: 330 bp (unspezifische Bande bei 500 bp)

5.3 Biochemische Methoden

Alle Arbeitsschritte mit Proteinlysaten wurden, wo nicht anders angegeben, auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt.

5.3.1 Herstellung von S1-Proteinlysaten aus Gewebe

Für biochemische Experimente wurden Gewebelysate aus Mäusegehirn hergestellt. Man tötete entsprechende Tiere durch Genickbruch und entnahm das Gehirn. Das Gewebe wurde kleingeschnitten und in 5 ml HBS aufgenommen. Man potterte für zwei Minuten im Douncer von Hand oder mit Hilfe eines elektrischen Potters mit Teflonstab bei 1000 rpm. Zellkerne und nichtlysierte Zellen wurden bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand, der zytosolische sowie membranöse Zellfraktionen enthielt, wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3.2 Herstellung von Proteinlysaten aus transfizierten HEK293-Zellen

HEK-Zellen wurden in 10 cm-Schalen kultiviert und transfiziert wie in Kapitel 5.4.7 beschrieben. 24 bis 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml PBS und Abschaben mit einem Plastik-Wägeschälchen geerntet. Die Zellen wurden bei 3000 rpm/4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und zur Lyse der Plasmamembran in eiskaltem Lysepuffer (HBS +1% (v/v) Triton-X-100, + Complete Proteaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis zentrifugierte man 1 min bei 3000 rpm/4°C. Der Überstand, der aus großen Teilen der zellulären Membranen sowie Zytosol besteht, wurde unmittelbar verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3.3 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Der Gesamtproteingehalt einer Lösung wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) gemäß den Herstellerangaben im 50 µl-Maßstab bestimmt. Als Konzentrationseichreihe wurde eine BSA-Verdünnung in H₂O verwendet.

5.3.4 Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität

Die β -Hexosaminidase ist ein lysosomales Enzym. Die Messung der β -Hexosaminidase-Aktivität in den verschiedenen Fraktionen einer subzellulären Fraktionierung diente als Maß für das Vorhandensein von Lysosomen in diesen Fraktionen. Für die Messung wurden jeweils 10 µl der einzelnen Fraktionen für 2h bei 37°C unter leichtem Schütteln mit je 100 µl β -Hexosaminidase-Lösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von

1ml Stopplösung beendet. Die gelblich gefärbten Proben wurden im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gegen eine Referenzprobe, bei der 10 µl Wasser eingesetzt worden waren, gemessen. Bei zu geringer Verfärbung wurde die eingesetzte Probenmenge vergrößert und/oder die Inkubationszeit verlängert.

5.3.5 Kopplung von Antikörpern and Protein-A-Sepahrose

Modifiziert nach [QORONFLEH et al. 2003]. 50 µl Protein-A-Sepharose wurden in 1,5 ml Chromatographiesäulen (BioRad, Hercules, US) mit PBS gewaschen und anschließend mit den angegebenen Antikörpern in 500 µl PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur im Rotator inkubiert. Nach 2 maligem Waschen mit 0,2 M Na-Borat pH 9,0 wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2,6 mg in 500 µl Na-Borat gelöstem Dimethyl-pimelimidate inkubiert. Die Reaktion wurde durch 4 Waschschrirte mit TBS gestoppt. Nicht gekoppelter Antikörper wurde durch 4 Waschschrirte mit 0,2 M Glycin pH 2,5 gefolgt von 3 Waschschrirten mit TBS entfernt.

5.3.6 Immunpräzipitation mit ungekoppelten Antikörpern

Proteinlysate wurden wie in Kapitel 5.3.2 und 5.3.1 angegeben hergestellt. 500 µl des Lysates (100-1000 µg Protein) wurden 75 Minuten mit den angegebenen Antikörpern auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurden die Antigen-Antikörperkomplexe durch 30 min. Inkubation auf einem Rotator an 50 µl Protein-A-Sepharose immobilisiert. Es folgten 5 Waschschrirte mit je 500 µl Lysepuffer, wobei die Antigen-Antikörper-Sepharosekomplexe jeweils resuspendiert und bei 3000 rpm/4°C zentrifugiert wurden. Im letzten Waschschrirte wurde die Suspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Gebundene Proteine wurden durch fünfminütige Inkubation bei 55°C in 50 µl 2xSDS-Probenpuffer eluiert, durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und zur Detektion auf Nitrozellulosemembran transferiert.

5.3.7 Immunpräzipitation mit gekoppelten Antikörpern

Proteinlysate wurden wie in Kapitel 5.3.2 und 5.3.1 angegeben hergestellt. 500 µl des Lysates (100-1000 µg Protein) wurden 2 Stunden mit den angegebenen, an Protein-A-Sepharose gekoppelten Antikörpern auf einem Rotator inkubiert. Es folgten 5 Waschschrirte mit je 500 µl Lysepuffer, wobei die Antigen-Antikörper-Sepharosekomplexe je-

weils resuspendiert und bei 3000 rpm/4°C zentrifugiert wurden. Gebundene Proteine wurden mit 100 µl 0,2 M Glycin pH 2,5 eluiert, mit Tris/Cl pH 10 Neutralisiert, durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und zur Detektion auf Nitrozellulosemembran transferiert.

5.3.8 Deglykosylierung mit N-Glycosidase F

50-200 µg Proteinlysate wurden mit 100 mM Natriumdihydrogenphosphat Puffer pH 7, 0,2 % SDS sowie 1 % β -Mercaptoethanol für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Anschließend wird auf 1 % Triton X-100 und 1,3 mM EDTA eingestellt sowie Complete Proteinaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) zugegeben. Nach Zugabe von 2 µl N-Glycosidase F (Roche, Basel, Schweiz) wird für mindestens 30 Minuten bis über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4x SDS Probenpuffer gestoppt.

5.3.9 Deglykosylierung mit Endo-H

50-200 µg Proteinlysate wurden in 50 mM NaAcetatpuffer pH 5,2 mit 0,02 % SDS und 1 % β -Mercaptoethanol für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Anschließend wird auf 1 % Triton X-100 und 1,3 mM EDTA eingestellt sowie Complete Proteinaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) zugegeben. Nach Zugabe von 2 µl Endo-Glycosidase H (Roche, Basel, Schweiz) wird für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um eine saubere Auftrennung durch SDS-Page zu ermöglichen wird der Ansatz mit geringer Menge Tris pH 10 neutralisiert.

5.3.10 SDS-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihren Molekulargewichten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [LAEMMLI 1970]. Durch die unspezifische Bindung von Natriumdodecylsulfat werden die Proteine proportional zu ihrer Länge mit negativer elektrischer Ladung versehen und weisen daher ähnliche Masse-zu-Ladung-Koeffizienten auf. Die Elektrophorese im Polyacrylamidgel führt daher zu einer Trennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse. Die Trennschärfe wird bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE dadurch erhöht, dass der niedrige pH-Wert im Sammelgel in Kombination mit dem glycinhaltigen Laufpuffer zu einer Fokussierung der Proteine führt.

Die Proteinlösungen wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 55 °C erwärmt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der gefärbte Proteinstandard "Bench-

mark" (Invitrogen, Carlsbad, US) verwendet. Im Anschluss folgte die Elektrophorese in 8-12,5%-igen Gelen in Minigelkammern (Amersham, Freiburg). Als Spannungsquelle diente ein Biometra Power Pack P25 (Whatman Biometra, Göttingen). Die Trennung erfolgte mit 25 mA pro Gel in Tris-Glyzin-Elektrophoresepuffer.

Alternativ wurden 4-12 % NuPAGE-Bis-Tris Gradientengele mit MOPS oder MES Puffer entsprechend den Herstellerangaben verwendet (Invitrogen, Carlsbad, US) .

Das anscheinende Molekulargewicht von Ostm1 variierte je nach verwendetem SDS-PAGE Gelsystem. Die große und kleine Form von Ostm1 lief bei 80 kD/35-45 kD in Bis-Tris Gradientengelen (Invitrogen, Carlsbad, US) mit MES Puffer, 70/35-40 kD in dem gleichen Gelsystem mit MOPS Puffer und 50 kD/30-35 kD standard 10 oder 11.5% Tris/Cl Gelen mit Tris/Glycin Puffer (entsprechend Proteinstandard "Benchmark" (Invitrogen, Carlsbad, US)). Der Übersichtlichkeit wegen wurde das Molekulargewicht von Ostm1 einheitlich als 80 kD/40 kD in den Abbildungen angegeben. Einzelne Abbildungen wurden leicht in der Höhe gestaucht, um eine Vergleichbarkeit der Bandenposition zu erreichen.

5.3.11 Nicht-reduzierende Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von über Cystein Brücken gekoppelten Proteinen wurde wie oben angegeben verfahren jedoch SDS-Probenpuffer ohne β -Mercapto-Ethanol und DTT verwendet.

5.3.12 Western Blot

Zum Nachweis von Proteinen durch spezifische Antikörper wurden sie nach der gelelektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrocellulose-Membran der Porengröße 0,45 μ m (Roth, Karlsruhe) transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Tankblot-Kammer (Amersham, Freiburg) in Transferpuffer bei 70 V für 2 h oder 30 V für 16 h. Durch Anfärbung der Proteine mit Ponceau S-Lösung wurde der Transfer überprüft. Man inkubierte die Membran 2 min in Ponceau S-Lösung und entfärbte anschließend durch mehrmaliges Waschen mit PBS.

5.3.13 Immundetektion

Auf Nitrocellulosemembran immobilisierte Proteine wurden zur Vermeidung unspezifischer Bindung durch Inkubation mit 3% (w/v) Magermilchpulver und 0,2% (v/v) NP-40

in PBS für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte die Bindung des ersten Antikörpers in entsprechender Verdünnung (Tabelle 5.2) in Blockpuffer für 2 h bei Raumtemperatur. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurde die Membran mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper in Blockpuffer für 1 h inkubiert. Erneut wurde fünfmal mit PBS gewaschen, bevor die Detektion mit einem Chemolumineszenz-basierten System (SuperSignal West Pico oder Femto Chemiluminescent Substrate, PerBioScience, Bonn) nach Angaben des Herstellers erfolgte. Zur Dokumentation wurden Röntgenfilme oder ein CCD-Kamerabasiertes System verwendet.

5.3.14 Herstellung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren

5.3.14.1 Immunisierung

Die Synthese der Peptide sowie Immunisierung und Blutung der Tiere wurde von Biogenes (Berlin, Deutschland) oder Eurogentec (Liege, Belgien) durchgeführt. Die zur Immunisierung hergestellten Peptide (siehe Abb. 3.2) wurden aufgereinigt und über ein entweder in der betreffenden Sequenz enthaltenes oder zusätzlich aminoterminal eingefügtes Cystein an BSA oder KLH (*keyhole limpet hemocyanin*) gekoppelt. Eine Mischung aus je zwei Peptiden wurde jeweils zwei Kaninchen oder Meerschweinchen injiziert. Die Immunantwort wurde über mehrere Monate hinweg durch bis zu 9 Injektionen im Abstand von etwa einem Monat verstärkt. Ab der dritten Immunisierung wurden zehn Tage nach den Injektionen Blutproben entnommen, um die Güte des Antiserums nach Aufreinigung im Western Blot zu bestimmen und zu verfolgen. Änderte sich das Signal nicht mehr, wurde das Tier geopfert und ausgeblutet.

5.3.14.2 Peptidkopplung

Das zur Immunisierung verwendete Peptid wird wie folgt über die Cysteinreste an eine aktivierte AgaroseMatrix gekoppelt. 0,8 ml Sulfolink Gel (Pierce, Rockford, USA) wurden sechs mal mit 1 ml Kopplungspuffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8,5) gewaschen. 2 mg Peptid wurde für mindestens 20 min bei Raumtemperatur auf der Säule inkubiert und mehrmals gemischt. Es folgten drei Waschschrte mit je 1 ml Kopplungspuffer. Anschließend wurde für 15 min unter ständigem Mischen und weiteren 30 min ruhend in 1 ml Blockierlösung (50 mM Cystein in Kopplungspuffer) bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem letzten Waschschrift mit 16 ml 1 M NaCl wurde die Säule mit TBS pH 7,4 für die Aufreinigung equilibriert oder in 5 ml TBS, 3 mM Natriumazid bei 4 °C gelagert.

5.3.14.3 Aufreinigung

2 ml des aufzureinigenden Serums wurde 1:1 in TBS pH 7,4 verdünnt und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf die mit 16 ml TBS pH 7,4 equilibrierte Säule gegeben und bei 4 °C für 16 Stunden oder bei Raumtemperatur für 2 Stunden im Rotator inkubiert. Für fünf Fraktionen wurden je 40 µl Neutralisierungslösung (0,2 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,3) vorgelegt. Die Säule wurde zweimal mit 8 ml TBS gewaschen und mit 2 ml Glycin/HCl pH 2,5 eluiert. Für jede Fraktion wurden 8 Tropfen (etwa 400 µl) in der Neutralisierungslösung aufgenommen. Es wurde mit 3 M Tris pH 6,8 auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA (siehe Kapitel 5.3.3) bestimmt und die Antikörperlösung auf 10 µg/ml BSA, 3 mM Natriumazid eingestellt.

5.4 Zellkulturarbeiten

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank unter Verwendung sterilisierter Gefäße und Reagenzien durchgeführt. Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5% (v/v) in wasserdampf-gesättigter Atmosphäre in Zellkulturschalen oder 24-Wellplatten der Firma Nunc (Nalge Nunc International, Wiesbaden) kultiviert.

5.4.1 Kultur von HEK293- und HeLa-Zellen

HEK293 und HeLa-Zellen wurden in DMEM-Medium (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (FCS) (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe), 25 µg /ml Pyruvat und 2 mM Glutamin kultiviert. Alle Kulturmedien enthielten 50 IU/ml Penicillin und 50 µg /ml Streptomycin (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe) zur Vermeidung mikrobieller Kontaminationen. Vor Erreichen der Konfluenz wurden Zellen im Verhältnis 1:2 - 1:10 passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin-EDTA (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe) von der Kulturschale gelöst und vereinzelt. Die Protease wurde durch Zugabe von 10 Volumenanteilen frischen Mediums inaktiviert und die Zellen auf frische Kulturschalen verteilt.

5.4.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden trypsiniert, in Medium aufgenommen und bei 200 x g für drei Minuten sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei -80 °C eingefroren und in flüssigen Stickstoff gelagert.

5.4.3 Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die Zellen im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in 5 ml vorgewärmtes Medium überführt und bei 200 x g für drei Minuten sedimentiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

5.4.4 Kultivierung von murinen adulten Fibroblasten

Ein 0,5-1 cm langes Stück Schwanzspitze einer Maus wurde unter sterilen Bedingungen für einige Sekunden in 70% EtOH getaucht und anschließend in PBS überführt. Anschließend wurde sie mit einer sterilen Schere in 1 ml Enzymlösung (0,2 % Collagenase A , 2 U/ml Dispase in PBS) gut zerkleinert und 1 h unter kräftigem Schütteln bei 37°C in einem Thermomixer inkubiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 x g pelletiert, in DMEM aufgenommen und auf einer 6 cm- Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

5.4.5 Immortalisierung von Fibroblasten

Die Fibroblasten wurden durch Transfektion mit dem großen T-Antigen des SV40-Virus im Vektor pMS immortalisiert. Die Selektion der immortalisierten Zellen erfolgte durch regelmäßiges Splitten (1:10, alle 2-4 Tage). Gleichzeitig wurde eine untransfizierte Platte von Fibroblasten gesplittet. Wenn nach etwa 3-4 Wochen auf dieser Platte keine Zellen mehr zu finden waren, wurde die transformierte Platte als immortalisiert erachtet und die Zellen eingefroren oder in Kultur belassen und für weitere Experimente verwendet.

5.4.6 Kultivierung von murinen embryonalen Neuronen

Zur Anfertigung von Primärkulturen aus dem Hippokampus wurden Mäuse an den Tagen p0 oder p1 verwendet. Beide Hippokampi wurden in PBS/10 mM Glucose präpariert. Zur Vereinzelnung der Zellen inkubierte man die Gewebe in PBS/10 mM Glucose mit 10 µg/ml DNase I und 0,5 mg/ml Papain (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) für 15 min bei 37 °C. Nach Waschen in 10 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) mit 10% (v/v) FCS, 25 µg/ml Pyruvat und 2 mM Glutamin wurden die Zellen vorsichtig in 1 ml des selben Mediums trituriert. Die Zellen wurden in DMEM-Medium mit Zusätzen (s.o.) in einer Dichte von 30.000 bis 60.000 Zellen pro Glasplättchen in den Vertiefungen einer 24-well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Glasoberflächen waren zuvor mit Poly-L-Ornithin (1,5 µg/ml in PBS, 37 °C über Nacht, (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)) beschichtet und anschließend dreimal mit PBS gewaschen worden. Die Kulturen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C und 5% (v/v) CO₂ in einem Brutschrank inkubiert. Nach 3 Stunden wurde das Medium durch Neurobasalmedium mit den Zusätzen 2 mM Glutamin, 25 µg/ml Pyruvat und 2% (v/v) B27 (Gibco-BRL Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, US) ersetzt. Alle Medien enthielten 50 IU/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin. Nach 3 Tagen in vitro (DIV) wurde 3 µM 1-[β-D-Arabinofuranosyl] cytosin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zu den Kulturen gegeben, um die Proliferation von Astrozyten zu stoppen. Am Ende jeder Woche wurde ein Drittel des Kulturmediums durch frisches Medium ersetzt.

5.4.7 Transiente Transfektion

5.4.7.1 Transfektion von HeLa-Zellen und Mausfibroblasten mit FuGene6

HeLa-Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen wurden den Herstellerangaben entsprechend mit FuGENE6 (Roche, Basel, Schweiz) transfiziert. Hierbei wurden pro 24-well 3 µl FuGene6-Reagenz und 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNA in 97 µl Opti-MEM (Gibco-BRL Life Technologies, Karlsruhe) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann in das Kulturmedium auf den Zellen gegeben. Nach 6 bis 16 Stunden wurde das Transfektionsmedium durch frisches Kulturmedium ersetzt.

5.4.7.2 Kalciumphosphat-Transfektion von HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden für biochemische Experimente in 10-cm Schalen bei einer Konfluenz von etwa 60% mit Hilfe von Kalcium transfiziert. Hierbei wurde zu 5-10 µg Plasmid-DNA 75 µl CaCl₂, 215 µl H₂O und 300 µl 2x BBS gegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5,4 ml Kulturmedium zugegeben und die Zellen in diesem Medium für 6 Stunden kultiviert. Die Expression erfolgte anschließend in frischem Kulturmedium für weitere 24 bis 48 Stunden.

5.4.8 Proteaseinhibition

Wildtypfibroblasten wurden für 24 h mit 20 µM Leupeptin (Roche, Basel, Schweiz) oder 10 µM E64 (Roche, Basel, Schweiz) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml PBS und Abschaben mit einem Plastik-Wägeschälchen geerntet. Die Zellen wurden bei 3000 rpm/4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und zur Lyse der Plasmamembran in eiskaltem Lysepuffer (HBS +1% (v/v) Triton-X-100, + Complete Proteaseinhibitor (Roche, Basel, Schweiz) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis zentrifugierte man 1 min bei 3000 rpm/4°C. Der Überstand, der aus großen Teilen der zellulären Membranen sowie Zytosol besteht, wurde unmittelbar verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.4.9 Messung des lysosomalen pH-Wertes

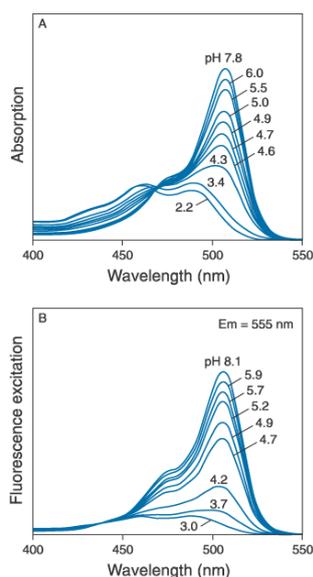


Abbildung 5.1: pH-abhängiges Spektrum von Oregon-Green Dargestellt ist das Absorptions- sowie Exitationsspektrum von *Oregon-Green* in Abhängigkeit vom pH Wert. Bei einer Anregung im Bereich von 440 nm verändert sich die Emission bei wechselndem pH praktisch nicht. Im Bereich von 490-520 nm kann dagegen eine deutliche pH-Abhängigkeit der Absorption wie auch der Exitation festgestellt werden.

Immortalisierte und nicht immortalisierte primäre Fibroblasten von WT, gl und CIC-7 Knockout Mausfibroblasten wurden für zwei Stunden mit 0,3 mg/ml dextrangekoppeltem Oregon Green 488 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, US) in Kulturmedium beladen, gefolgt von zwei Stunden in reinem Kulturmedium. Primäre Neuronenkulturen wurden über Nacht mit 0,5 mg/ml beladen und für zwei Stunden in reinem Kulturmedium weiterkultiviert. Die auf Glas kultivierten und beladenen Zellen wurden während der pH Messung in bicarbonat gepuffertem, mit 5% CO² begastem Ringerpuffer inkubiert. Eichkurven wurden durch schrittweise, je 5 minütigen, Inkubation mit je 10 µM Monensin und Nigerizin in MES oder HEPES mit einem pH Wert von 6,5 bis 4,0 gewonnen.

Die ratiometrische Fluoreszenzmessung erfolgte an einem invertierten Mikroskop (Zeiss Axiovert 100) mit einem 100x Ölimmersionsobjektiv. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer CCD Kamera (Hamamatsu C4742-95) bei einer Exitationswellenlänge von 440 nm und 490 nm (Polichrom II, Tillvision) aquiriert. Die Aquisition und Auswertung der Bilder erfolgte mit den Software Paketen Openlab 4 (Improvision) und MetaMorph (Universal Imaging).

Regionen, die lichtmikroskopischer Untersuchung nach Endosomen und Lysosomen entsprechen, wurden anhand einer Mindestfluoreszenzintensität bei 490 nm Exitation als Messbereich definiert. Für jeden Messbereich wurde das mittlere Intensitätsverhältnis zwischen 490 nm und 440 nm Anregung ermittelt. Für jedes Bild, das ein Neuron beziehungsweise eine bis wenige Fibroblastenzellen abbildete, wurde das mittlere Verhältnis gewichtet nach Größe der Messbereiche errechnet. Das Verhältnis wurde entsprechende der sigmoidal gefitteten Eichkurve in pH Werte umgerechnet.

5.5 Histologische Methoden

5.5.1 Perfusion von Mäusen

Für histologische und immunhistologische Untersuchungen wurden Mäuse über ihren Blutkreislauf mit einem Fixativ perfundiert, um eine Auswaschung von Erythrozyten und eine bessere Erhaltung der Gewebestrukturen zu erreichen. Die Mäuse wurden durch Injektion einer Ketamin-Rompun-Mischung betäubt, bevor ihr Brustkorb geöffnet wurde. Das Herz wurde freigelegt und eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt. Zunächst wurden über die Kanüle 0,01% Heparin in PBS (pH 7,4) mit einem Druck von ca. 180 mmHg in den Blutkreislauf gespült. Durch einen Schnitt in den rechten Vorhof konnte

das Blut nach Passage des großen Körperkreislaufs vollständig abfließen. Anschließend wurde mit 4% PFA in PBS (pH 7,4) zur Fixierung der Gewebe perfundiert. Nach der Perfusion wurden die gewünschten Gewebe frei präpariert und gegebenenfalls 1-12h bei 4°C in 4% PFA in PBS (pH 7,4) nachfixiert.

5.5.2 Gewebeschnitte

5.5.2.1 Gefrierschnitte

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die perfusionsfixierten Organe bei 4°C für je 2,5 h in 10%, 20% und 30% Sucrose-Lösung äquilibriert. Anschließend wurden die Gewebe in Tropfen von TissueTek Einbettmedium (Leica Microsystems) auf Trockeneis eingefroren. Mit Hilfe eines Kryotoms wurden 5-10µm dicke Schnitte hergestellt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Die fertigen Schnitte wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C gelagert.

5.5.2.2 Paraffinschnitte

Die nach der Perfusion entnommenen Organe wurden über eine aufsteigende Isopropanolreihe entwässert (2h 60%, 3h 75%, 3h 90%, 12h 100%) und anschließend für jeweils 12h bei 63°C in einem Isopropanol-Paraffin-Gemisch (1:1) und reinem Paraffin inkubiert. Anschließend wurden die Organe in flüssigem Paraffin eingebettet und bei 4°C ausgehärtet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden die Blöcke in 5-10µm dicke Scheibchen geschnitten. Die in einem handwarmem Wasserbad gestreckten Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei 4°C gelagert.

5.5.3 Elektronenmikroskopie

Die Herstellung elektronenmikroskopischer Präparate fand in Zusammenarbeit mit Dr. Michaela Schweizer aus der morphologischen Serviceeinheit des ZMNH Hamburg statt. Für die Elektronenmikroskopie wurden Gewebe verwendet, die über Nacht in 3% Glutaraldehyd / 4% Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4) fixiert worden waren. Glutaraldehyd reagiert mit den Aminosäuregruppen löslicher und membrangebundener Proteine zu vernetzten Komplexen auf Pyridinbasis, wodurch das Gewebe in seiner räumlichen Struktur sehr gut konserviert wird. Das fixierte Gewebe wurde in 1% OsO₄ nachfixiert und

kontrastiert. Danach wurde das Gewebe in Ethanol dehydriert und im Kunstharz Epon eingebettet. 0,5 µm Semi-Dünnschnitte wurden mit Methylblau gefärbt. 60 nm Ultra-dünnschnitte wurden am Ultramikrotom geschnitten und auf Trägerrittern aufgefangen. Zur Erhöhung des Kontrastes und der Bildschärfe wurde eine Doppelkontrastierung mit den Schwermetallsalzen Uranylacetat und Bleizitrat durchgeführt. Die Auswertung fand an einem EM902A Elektronenmikroskop von Zeiss statt.

5.5.4 Immunhistochemie

5.5.4.1 Immunhistochemie an Schnitten

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Paraffin oder Kryoschnitte verwendet. Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert (10min Xylol, 1min frisches Xylol, 5 min 100% EtOH, 5 min 90% EtOH, 5 min 75% EtOH, 5 min 50% EtOH, 5 min 30% EtOH, 5 min PBS). Für alle Färbungen mit einem CIC-7 spezifischen Antikörper wurden die Schnitte 10 min in Zitratpuffer gekocht und anschließend in PBS gespült. Danach folgte eine 3 minütige Nachfixierung der Schnitte mit 4% PFA in PBS + 0,2% SDS. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Schnitte 1-2h in Blocklösung (3% BSA, PBS) inkubiert, bevor der Primärantikörper in Blocklösung dazugegeben wurde. Nach 2 h Inkubation bei RT und 12 h Inkubation bei 4°C wurden die Schnitte 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der an einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Zweitantikörper in Blocklösung auf die Schnitte gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Fluoromount eingedeckelt.

5.5.4.2 Immunzytochemie von Zellkulturen

Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden mit PBS mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM MgCl₂ gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 12 min in 4% (w/v) Paraformaldehyd in PBS fixiert und mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit Saponin um vesikuläre Strukturen besser zu erhalten [GOLDENTHAL et al. 1985]. Nach 30 min Blockierung in Blockpuffer/Saponin (3% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Saponin, in PBS) wurden die Zellen für 2 h mit Erstantikörper in Blockpuffer/Saponin inkubiert, viermal in PBS gewaschen und erneut für 45 min mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper in Blockpuffer/Saponin inkubiert. Nach 4 Waschschritten in PBS wurden die Glasplättchen mit Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabama, USA) auf Objektträgern fixiert.

Alternativ wurden die Zellen nach Fixierung zunächst 4 min mit PBS/0,2% (v/v) Triton X-100 inkubiert, um die Membranen zu permeabilisieren. In den weiteren Schritten wurde Blockpuffer ohne Saponin verwendet.

Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie im seriellen Modus. Gleichzeitig eingesetzte Antikörper wurden auf Kreuzreaktivität überprüft, wenn sie gleiche Strukturen markierten.