

Material und Methoden

Material

Produkt

Agarose GTQ

AmpliTaq 10x Buffer

MgCl₂ (25mM), ultrapure

AmpliTaq[®] DNA-Polymerase (5U/μl)

pet30 EK Lic Kit

pTriex4 Ek Lic Kit

Nova Blue Single Competent Cells

SOC Medium

Ethanol verg.

Imidazol

NaCl

NaH₂PO₄ x H₂O

Essigsäure

EDTA

T4 DNA Polymerase

Alkaline Phosphatase (CIP)

Quick Ligation Kit

Kanamycinsulfat

Ampicillin Natriumsalz

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid IPTG

Accu Prime PFX DNA Polymerase

100 bp DNA ladder

500 bp DNA ladder

Roti Load Probenpuffer

NiNTA Spin

Quiaprep Miniprep

Firma

Roth, Karlsruhe

Applied Biosystems, Foster City, USA

Perkin Elmer Biosystems, USA

Applied Biosystems, Foster City, USA

Novagen, Nottingham, UK

Novagen, Nottingham, UK

Novagen, Nottingham, UK

Novagen, Nottingham, UK

Baker, Deventer, Holland

Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

Merck, Darmstadt

Baker, Deventer, Holland

Sigma, Saint-Luis, Missouri, USA

Biolabs, Frankfurt a.M.

Biolabs, Frankfurt a.M.

Biolabs, Frankfurt a.M.

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe

Invitrogen, Nottingham, UK

Invitrogen, Nottingham, UK

Invitrogen, Nottingham, UK

Roth, Karlsruhe

QIAGEN, Hilden

QIAGEN, Hilden

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
Quiaquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Quiaquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Ethidiumbromid	SIGMA, Saint-Luis, Missouri, USA
Luria Bertani LB Agar	Roth, Karlsruhe
LB Medium	Roth, Karlsruhe
dNTP Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Pharmingen, Madison, USA
Acrylamid / Bisacrylamid (30% /0,8%)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat APS	Roth, Karlsruhe
Biocoll separating solution	Biochrom, Berlin
Rinderserumalbumin BSA	Serva, Heidelberg
Coomassie-Brilliantblau R250	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
CsCl	Gibco-BRL, Paisley, Scotland
Dimethylsulfoxid DMSO	Biochrom, Berlin
96well Streptavidinplatten max.	Biotez, Berlin
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Glycin	Serva, Heidelberg
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
HeLa S3 adh. und susp.	DSMZ, Braunschweig
DMEM Medium	Biochrom, Berlin
Amicon ultra, YM-10, YM-30	Millipore, Königstein
96 well Maxisorbplatten	Nunc, Wiesbaden
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Fetales Kälberserum FCS	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Nitrocellulose 0,2µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Triton-X-100	Roche, Mannheim
Marker (Protein SDS-Gelelektrophorese) High Range	BioRad, München
Marker Protein SDS-Gelelektrophorese; prestained)	Roth, Karlsruhe
Millipore Immobilon-PVDF	Millipore, Königstein

<u>Produkt</u>	<u>Firma</u>
Igepal	ICN, Eschwege
PBS Dulbecco sine Ca/Mg	Biochrom, Berlin
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Roti-Quant, Proteinbestimmung nach Bradford	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat SDS	Serva, Heidelberg
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat disodium	Roth, Karlsruhe
Salz BCIP	
TMB Tetramethylbenzidin	Seramun, Wolzig
Nitroblautetrazolium NBT	Roth, Karlsruhe
Rotilum 1 und 2	Roth, Karlsruhe
Entwickler RPX-Omat EX	Kodak, Stuttgart
HL-60-Zellen apopt./non-apopt.	SIGMA, Saint-Luis, Missouri, USA
Film X-OMat	Kodak, Stuttgart
Fixierer RPX-Omat LO	Kodak, Stuttgart
EnVision™ Doublestain-System Code Nr. K 1395	DAKO, Glostrup, Dänemark
Eindeckmittel Aquatex	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin nach Mayer	Roth, Karlsruhe
Antikörper Diluent	DAKO, Glostrup, Dänemark
LSAB AP System	DAKO, Glostrup, Dänemark
Chromogen: Fuchsin	DAKO, Glostrup, Dänemark
LSAB Plus HRP System	DAKO, Glostrup, Dänemark
Peroxidase Blockierung	DAKO, Glostrup, Dänemark
Chromogen: DAB	DAKO, Glostrup, Dänemark
Glycerol 87%	Merck, Darmstadt
N,N,N´N´-Tetramethylethylenediamine TEMED	ICN, Eschwege
Trypanblau	Sigma, Saint-Luis, Missouri, USA
RNA: RTS-Biotin, ConK-Biotin	VBC Genomics, Wien, Österreich
Proteasehemmer PMF	Roche, Mannheim
µMACS Strept.-Kit	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA
NucBuster Protein Extraction Kit	Novagen, Nottingham, UK

Produkt

Firma

Primärantikörper

Maus anti-BiP/grp78, monoklonal

Maus anti-Hsp70, monoklonal

Kaninchen anti-A3, polyclonal

Kaninchen anti-BiP, polyclonal

Maus anti-human CD 68

BD Biosciences, New Jersey, USA

StressGen, Victoria BC, Kanada

Dr. Henklein, Institut für Biochemie,
Charité Seramun, Wolzig

Seramun, Wolzig

DAKO, Glostrup, Dänemark

Sekundärantikörper / Konjugate

Ziege anti-Kaninchen IgG, AP-konjugiert

Ziege anti-Maus IgG, AP-konjugiert

Kaninchen anti-human-IgG/IgA/IgM, AP-konjugiert

Ziege anti-human-IgG, AP-konjugiert

Kaninchen anti-Huhn IgG, AP-konjugiert

Kaninchen anti-Maus IgG, HRP-konjugiert

Kaninchen anti-human-IgG/IgA/IgM, HRP-
konjugiert

Sigma, Saint-Luis, Missouri, USA

Sigma, Saint-Luis, Missouri, USA

DAKO, Glostrup, Dänemark

Sigma, Saint-Luis, Missouri, USA

Sigma, Saint-Luis, Missouri, USA

DAKO, Glostrup, Dänemark

DAKO, Glostrup, Dänemark

Sonstige

Humanes IgG1 κ

Humanes IgG3 λ

Anti-Citrulline (Modified) Detection Kit

PhosphoProtein Purification Kit

O-Gluc Nac Detection Kit

DIG Glycan Detection Kit

Sigma, Saint-Luis, Missouri, USA

Sigma, Saint-Luis, Missouri, USA

Upstate, Lake Placid, NY, USA

QIAGEN, Hilden

Pierce, Erembodegem, Belgien

Roche Diagnostik, Mannheim

Geräte

Produkt

Hoefler Mighty Small SE250/SE260
 Magellan ELISA Reader und Software
 GeneAmpPCR Systems 9700
 Hoefler Blotkammer TE22

Photometer Shimadzu
 Protean IEF Cell
 UV Transilluminator
 Certomat BS-1 Schüttler
 GS-6Zentrifuge
 Titramax 100 Schüttler
 Thermomixer compact
 Wasserbad W19

Firma

Amersham Pharmacia, Uppsala
 Tecan, Salzburg, Österreich
 PE Applied Biosystems, Norwalk, USA
 Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
 Shimadzu
 Biorad, München
 VWR Merck, Darmstadt
 Sartorius AG, Göttingen
 Beckmann, München
 Heidolph, Schwabach
 Eppendorf, Hamburg
 Haake, Karlsruhe

Puffer und Lösungen

SDS-Gelelektrophorese		
	Elektrodenpuffer	0,028 M Tris, pH 8,3 0,192 M Glycin 0,1 % SDS
	Probenpuffer 6X	0,35 M Tris, pH 6,8 10 % SDS 30 % Glycerol 9,3 % DTT
	Trenngel 10%	Acrylamid 1,5 M Tris, pH 8,8 10 % SDS Deion. H ₂ O 10 % APS TEMED

SDS-Gelelektrophorese	Sammelgel 4%	Acrylamid 1,5 M Tris, pH 6,8 10 % SDS Deion. H ₂ O 10 % APS TEMED
Blotten / Proteintransfer	Tankblotpuffer	25 mM Tris, pH 8,3 193 mM Glycine
Immunblot / Seren	Blocken	3 % Milchpulver MP in PBS, pH 7,4
	Waschen	PBST: PBS+0,05% Tween 20
	Verdünnungspuffer	3% MP/PBST
DNA-Elektrophorese	Laufpuffer	TAE Tris-Acetat-TBE
ELISA	Coatingpuffer	Carbonatpuffer, pH 9,5
		PBS, pH 7,4
	Blocken	5 % BSA / PBS
	Waschen	PBS + 0,1 % Tween 20
	Verdünnung	2% MP in PBS + 0,1 % Tween 20
	Stopplösung	0,5 M H ₂ SO ₄
Coomassie-Färbelösung		0,25 % Coomassie
		40 % Methanol
		7 % Eisessig
Ponceau S		0,2% Ponceau
		30 % Trichloresigsäure
		30 % Sulfosalicylsäure
AP-Puffer		0,1 M Tris 0,1 M NaCl 5 mM MgCl ₂
TAE 50x	Agarosegel	484 g Tris, 136 g Na-Acetat, 37 g EDTA, auf 2 l dH ₂ O, pH 8.2
Beladungspuffer	Agarosegel	10 mM EDTA, 10 % Ficol, 0.1 Orange G

0,01MCitratkochpuffer pH6		
Carbonatpuffer, pH 9,5		
Zellkulturmedium		DMEM Pen/Strep 100 U/ml FBS 5%

Methoden

Zellkultur

HeLa-Zellen (S3, Suspensionszellen) wurden in DMEM mit Penicillin/Streptomycin und FCS bei 37°C und 5% CO₂ in 75ml-Zellkulturflaschen der Firma NUNC inkubiert und bei entsprechender Zelldichte in 175ml-Flaschen überführt. Die Zellzahl wurde täglich mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer und mittels Trypanblau bestimmt. Sämtliche Schritte wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen.

Gesamtproteinextraktion aus HeLa-Zellen

HeLa-Zellen (1g Feuchtwicht) wurden mit 14ml Prolyp G in einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Mit gesättigter Cäsiumchloridlösung, 43ml, wurde eine Dichte von 1,6g/cm³ eingestellt, um mittels Ultrazentrifugation Proteine von den restlichen Zellbestandteilen trennen zu können. Proteine mit einer Dichte von 1,3g/cm³ floatieren, Polysaccharide (1,6g/cm³) bleiben unterhalb und Nukleinsäuren (DNA mit 1,7g/cm³ und RNA mit 1,9g/cm³) sedimentieren. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 50.000g und 20°Celsius für eine Stunde. Die floatierenden Proteine wurden abgenommen, mit 15ml Prolyp N homogenisiert und anschließend in zwei Litern 25mM Tris-Puffer (pH 7,5) für zwei Stunden bei Raumtemperatur dialysiert. Der Puffer wurde jede halbe Stunde gewechselt. Die Substitution des Gardols durch NP-40 war erforderlich, weil das Gardol das Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE stört. Die Dialyse diente dem Auswaschen von Gardol und Cäsiumchlorid. Das Dialysat wurde dann mit dem doppelten Volumen an Ethanol versetzt, bei -20°C für 20 Minuten gefällt und danach abzentrifugiert. Das Gesamtprotein konnte nass, oder nach Acetonfällung getrocknet eingewogen werden.

Gewinnung von Kern- und Zytoplasmaextrakten

Die Gewinnung von Proteinfractionen aus humanem Kern- und Zytoplasmafraktionen erfolgte gemäß Protokoll zu dem NucBuster Protein Extraction Kit.

Gelelektrophorese

Eine Trennung der Proteine im Proteingemisch entsprechend ihrer Größe wurde mit der 1-dimensionalen Gelelektrophorese vorgenommen. Hierzu wurden 10% Polyacrylamidgele mit 4% Sammelgel verwendet. Entsprechend der zu erwartenden

Proteinmenge wurde 10-20µl der Probe mit Probenpuffer (Laemmli) zugesetzt, bei 95°C 5 Minuten erhitzt, kurz abzentrifugiert (2000 rpm in der Eppendorfszentrifuge) und in die Geltaschen gefüllt. Der Gellauf erfolgte mit 25 mA/ Gel ca. 40 Minuten, bis die Farbfront des Probenpuffers aus dem Gel gelaufen ist. Die Gelkammern wurden während des Laufs konstant bei einer Temperatur von 18°C gekühlt.

2D-Gelelektrophorese

Die 2D-gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem ReadyPrep 2-D Starter Kit und der 2D-Elektrophoreseapparatur Protean IEF Cell von Biorad. Es wurden Streifen mit immobilisierten pH-Gradienten verwendet.

Blotten / Proteintransfer

Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet, d.h. die Proteine wurden aus der Gelmatrix heraus mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf die Membran transferiert. Dies erfolgte im Tankblotverfahren mit einer Stromstärke von 400 mA. Die durch das SDS negativ geladenen Proteine wandern in Richtung Anode aus dem Gel.

Das Gel wurde auf ein Filterpapier gelegt, darauf die Nitrocellulosemembran, wobei unbedingt darauf zu achten war, daß sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel befanden, und darauf noch ein Filterpapier. Diese gesamte Einheit wurde in der zum Zubehör der Blotkammer gehörige Klemmvorrichtung arretiert und in die Blotkammer gegeben. Zum Überprüfen der Qualität der vorangegangenen Gelelektrophorese sowie des Proteintransfers wurden die Proteine auf den Membranen nach dem Blotten mit Ponceau S angefärbt.

Immunoblots

Die Nitrocellulosemembran mit Protein wurde 30 Minuten in MP/PBS (3% Milchpulver in PBS, pH 7,4) unter leichtem Schwenken inkubiert.

Anschließend wurden die Seren 1:25 in MP/PBST (3% Milchpulver in PBS, pH 7,4 + 0,05 % Tween 20) verdünnt und auf dem Blot unter leichtem Schwenken für eine Stunde inkubiert.

Nach viermaligem Waschen mit PBST, jeweils 5 Minuten unter leichtem Schwenken wurde der Blot mit einem Sekundärantikörper, einem Konjugat (Antikörper + Enzym) für

30 Minuten inkubiert. Die Detektion erfolgte, nach fünfmaligem Waschen (s.o.), mit BCIP/NBT in AP-Puffer für max. 7 Minuten.

ELISA

Parallel zu den Immunoblots wurde die Reaktivität der Seren auf einem ELISA getestet. Hierzu wurde Antigen mit einer Konzentration von 10µg/ml in PBS, pH 7,4 angesetzt und davon je 100 µl/well auf eine 96 well Maxisorb-Microtiterplatte gegeben. Nach zwei Stunden Inkubation auf Eis auf dem Orbitalschüttler, wurde die Platte ca. 12 Stunden bei 4°C gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden die Kavitäten mit 5% BSA/PBS geblockt, um unspezifische Bindung von Serum oder Antikörpern an die Platte zu verhindern. Dazu wurden 100 µl der BSA-Lösung 30 Minuten unter Schütteln auf der Platte inkubiert und anschließend wurde die Platte drei Mal gewaschen, um überschüssiges, nicht gebundenes Protein zu entfernen. Alle Waschschritte wurden mit PBST vorgenommen.

Nach dem Testen der günstigsten Serum-, Antikörper- und Antikörperkonjugatverdünnung wurde sich festgelegt auf Serum 1:200, anti-human-IgG/IgA/IgM-HRP: 1:5.000, anti-PA3: 1:10.000 und anti-rabbit-IgG-HRP: 1:10.000.

Herstellung eines Antiserums gegen hnRNPA3

Zur Herstellung eines Antiserums gegen hnRNP-A3 wurde zunächst ein 16 Aminosäuren langes, am N-Terminus des Proteins befindliches Peptid synthetisiert. Kaninchen wurden mit dem Peptid gundimmunsiert, geboostert und schließlich wurde nach der 12. bzw 13 Kalenderwoche das Hyperimmunserum gewonnen. Im Festphasenelisa wurde das Serum getestet. Diese Arbeiten wurden von Herrn Dr. Henklein, Biochemie (Peptidsynthese) und von der Firma SERAMUN (Antiserumherstellung) nach unseren Vorgaben durchgeführt.

Immunhistologie

Verschiedene Gewebe sollten histologisch auf die Expression von A3 hin untersucht werden. Hierzu wurden 1-3µm dicke Paraffinschnitte der entsprechenden Gewebe angefertigt und auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger gebracht. Nach einer Inkubation bei 58°C über Nacht wurden die Schnitte von Paraffin befreit und rehydriert. Abschließend erfolgte die Antigendemaskierung in Citratpuffer pH 6,0 durch Hitze.

Die später mit Peroxidase umgesetzten Schnitte wurden mit 3% Wasserstoffperoxid behandelt, um endogene Peroxidasen zu blocken.

Die so beschichteten Objektträger wurden nun mit dem anti-PA3 in der Verdünnung 1:5.000 30 Minuten inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen mit TBS, pH 7,6 wurde der Sekundärantikörper auf dem Objektträger inkubiert. Hier wurden unterschiedliche Färbemethoden angewandt, die verschiedene Sekundärantikörper benötigen: a) biotinylierter Sekundärantikörper bindet an Konjugat aus Streptavidin und HRP; das Substrat DAB führt zu einer Braunfärbung.

b) biotinylierter Sekundärantikörper bindet an Konjugat aus Streptavidin und AP; das Substrat Fuchsin führt zu einer Rotfärbung

Um die Zellen sichtbar zu machen, erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer, wobei die Zellkerne blau angefärbt werden.

Abschließend wurden die gefärbten Schnitte auf den Objektträgern mit einem Eindeckmittel und Deckgläschen versiegelt.

Doppelfärbung

Hier sollten zusätzlich Makrophagen mit einem anti-CD68-Antikörper sichtbar gemacht werden. Die Doppelfärbung erfolgte mit dem EnVision™ Doublestain-System. Hierzu wurde zunächst die endogene Peroxidase im Gewebe mit Wasserstoffperoxid geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem anti-CD68-Primärantikörper, nach ausreichenden Waschschritten erfolgte die Inkubation mit einem Peroxidase konjugierten Antikörper und anschließender Visualisierung mit dem Chromogen DAB. CD68-positive Zellen wurden braun angefärbt. Durch die Behandlung mit Doublestain Block wurden eventuell kreuzreagierende Substanzen/Antikörper entfernt und eine mögliche Aktivität einer endogenen AP blockiert.

Nun folgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper anti-PA3 (s.o.) und nach ausreichenden Waschschritten die Inkubation mit einem AP konjugierten Antikörper und anschließender Visualisierung mit Fast Red. Die A3-positiven Zellen erhielten eine rote Färbung. Zuletzt wurden auch hier die Schnitte auf den Objektträgern mit Aquatex und Deckgläsern versiegelt und haltbar gemacht.

Proteinbestimmung

Sämtliche Proteinbestimmungen wurden entsprechend der BCA-Methode mit BSA-Standardreihen von 6-50µg/ml oder Bradford-Methode (Roti-Quant) von 4µg–20µg/ml vorgenommen, die photometrischen Messungen dazu erfolgten mit einem Shimadzu-Photometer bei 562nm (BCA) und 595nm (Bradford).

Kompetente Zellen

In LB-medium, dem das Antibiotikum Chloramphenicol Ampicillin zugesetzt wurde, wurden kompetente Zellen (E.Coli, Single Blue) über Nacht unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien bei 2500 rpm abzentrifugiert und das Pellet in eiskaltem 0,1M CaCl resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. nach abermaligem Abzentrifugieren bei 2350 rpm wurden die Bakterien in 0,1 M CaCl plus 15% Glycerin aufgenommen und als „stocks“ bei – 80°C gelagert.

Klonierung BiP

Die cDNA von BiP wurde als Template für die unterschiedlichen PCR-Fragmente, die durch die Auswahl der entsprechenden Primer entstehen, genutzt, um letztlich BiP oder Fragmente des Proteins exprimieren zu können. Die entsprechenden PCR-Produkte wurden in den Expressionsvektor pET-30 Ek/LIC kloniert. Die Klonierung erfolgte nach dem Ligation-Independent-Cloning-Verfahren der Firma Novagen, dieses Verfahren macht sich die 3'→5' Exonucleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase zunutze. Die hierzu verwendeten LIC-Primer sind mit einer 20 bp langen Sequenz versehen, die nicht an das Template bindet, so dass das entstandene PCR-Fragment auch diese Sequenz enthält. Durch die Zugabe von T4 DNA-Polymerase und dATP wird die DNA-Sequenz bis zu einem bestimmten Adenin abgebaut. Die T4 Exonucleaseaktivität wird bei diesem Adenin durch die Aktivität der T4 Polymerase aufgehoben. Es entsteht ein PCR-Fragment, daß links und rechts zwei nicht komplementäre 5' Überhänge von 13 und 14 bp besitzt. Diese Überhänge sind komplementär zu den Überhängen am linearisierten Ek/LIC Vektor pET-30. Die kovalente Bindung zwischen PCR-Fragment und Vektor erfolgt erst nach der Transformation durch die bakterielle Ligase. Vor der Klonierung wurden jedoch erst die übrigen dNTPS entfernt werden. Hierzu wurde der QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN verwendet.

- 1 μ l Ek/LIC Vektor
- 2 μ l T4 DNA Polymerase verdautes Insert
- 1 μ l 25 mM EDTA

Das Reaktionsgemisch wurde leicht mit einer Pipettenspitze durchmischt und bei 22°C für 5 Minuten inkubiert.

Transformation

Ca. 30 μ l kompetente Zellen (Nova Blue Singels™ Competent Cells) wurden mit 100-200 ng Vektor-DNA vermischt und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 30 Sekunden auf 42°C erhitzt und dann erneut für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde das Gemisch bei RT mit 80 μ l SOC-Medium vermischt und 45 Minuten bei 37° geschüttelt. Das Gemisch wurde auf einer Petrischale mit LB-Agar und Antibiotikum (Kanamycin 50mg/ml) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden jeweils in 3-5 ml LB Medium + Kanamycin bei 37°C kultiviert. Im Anschluß wurden die Plasmide der Bakterienkolonien mit dem QIAGEN Protokolls für Minipreps isoliert.

Die isolierten Plasmide wurden enzymatisch verdaut und die entstandenen Fragmente auf einem 1%iges Agarosegel überprüft.

Agarosegel

Die verdauten DNA-Fragmente wurden im 1,2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,5x TEA verwendet. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, das zwischen den Basen interkaliert, wurde die DNA im UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 302 nm bzw. 254 nm sichtbar gemacht. Der Gellauf erfolgte bei 7-10Volt/cm Gel für eine Stunde.

Expression

Um nun die Synthese des entsprechenden Proteins vornehmen zu lassen, wurden E.coli Bakterien des Stammes B(DE3)pLysS mit dem Vektor pET-30EK/LIC, der nun die cDNA des Proteins enthält, transformiert. Dieser Ansatz wurde auf Petrischalen mit LB-Agar + Kanamycin ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden angewachsene Kolonien, denn nur die Kolonien können wachsen, die den pET-

30EK/LIC, der eine Kanamycinresistenz beinhaltet, gepickt und in eine Suspensionskultur, LB-Medium + Kanamycin überführt und abermals über Nacht unter Schütteln kultiviert, um eine möglichst große Menge an Protein-synthetisierenden Bakterien zu erhalten. Die Übernachtskultur wurde noch einmal 1:100 verdünnt und bei 37°C kultiviert. Nun wurde 1mM IPTG zugeführt, das die Produktion des gewünschten Proteins induziert. Die fertigen Bakterienkulturen wurden in 50 ml Falcon-tubes überführt und 30 min bei 4000 rpm, RT, abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml 8 M Harnstoff aufgelöst und eine Probe davon auf ein SDS-Gel gegeben und anschließend mit Coomassie gefärbt, um zu kontrollieren, ob eine ausreichende Expression des Zielproteins gegeben ist.

Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung der exprimierten Proteine erfolgte über NiNTA-Spin Säulen. Das Proteingemisch der aufgeschlossenen und filtrierten Bakterienzellen wurde auf eine NiNTA-Spin-Säule gegeben. Die mit einem HIS-Tag versehenen Proteine (A3 und BiP) blieben auf der Säule hängen, während die übrigen Proteine die Säule passierten. Nach vier Waschschritten mit PBS in 8M Urea und 20 mM Imidazol erfolgte die Elution der Proteine, die mit einem HIS-Tag versehen sind, durch Erhöhung der Imidazolkonzentration von 20mM auf 300mM. Die übrigen Aufreinigungsbedingungen aus dem mitgelieferten Handbuch von Quiagen wurden exakt eingehalten. Auf einem 10% SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung wurde die Qualität der Aufreinigung überprüft.

Apoptose

Es wurden hier einerseits gekaufte HL-60 Leukämiezellen, mit und ohne induzierte Apoptose verwendet. Eingeleitet wurde die Apoptose mit einem chemotherapeutischen Agens, dem Etoposide.

Aus dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie wurden uns fertige Blots mit apoptotischen und non-apoptotischen Jurkat T-Zellen zur Verfügung gestellt. Die Apoptose wurde hier mit einem Anti-Fas-Antikörper induziert [34].