

## 6 Methoden

### 6.1 Zellkultur

#### 6.1.1 Zellkulturmedien und Lösungen

Für die Anzucht und Kultivierung der Melanomzelllinien wurde folgendes Medium verwendet:

##### *Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM-Medium)*

DMEM Grundmedium (mit 4 mM L-Glutamin, 4500 mg/l D-Glukose, ohne Natriumpyruvat)	500 ml	
hitzeinaktiviertes, fötales Rinderserum (FCS)	50 ml	10 %
10.000 IE Penicillin und 10.000 mg/ml Streptomycin	5 ml	100 IE Penicillin / 100 mg/ml Streptomycin

Das Medium kann vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

##### *Hygromycin B:*

Hygromycin B ist eine gebrauchsfertige Lösung mit einer Konzentration von 50 mg/ml.

Für die Kultivierung von transfizierten Melanomzellen wurde folgendes Medium verwendet:

##### *DMEM-TetOn*

DMEM Grundmedium (mit 4 mM L-Glutamin, 4500 mg/l D-Glukose, ohne Natriumpyruvat)	500 ml	
hitzeinaktiviertes, fötales Rinderserum (FCS)	50 ml	10 %
10.000 IE Penicillin und 10.000 mg/ml Streptomycin	5 ml	100 IE Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin
87 mM Geneticin	5 ml	0,87 mM
50 mg / ml Hygromycin B	2 ml	0,2 mg/ml

Das Medium kann vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

*Einfrierlösung für Melanomzellen:*

DMEM-Medium	20 ml
FCS	20 ml
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10 ml

Die Lösung wird bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Anzucht und Kultivierung von Melanozyten erfolgt in Melanozyten-Medium (Eberle *et al.*, 1995):

*Melanozyten-Medium*

MCDB 153 Grundmedium	500 ml	
10.000 IE Penicillin und 10.000 mg/ml Streptomycin	5 ml	100 IE Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin
1 mg/ml Choleratoxin	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{g}$
Apo-Transferrin	5 ml	5 mg
Insulin	250 $\mu\text{l}$	
Rinderhypophysenextrakt	2 ml	
200 mM $\text{CaCl}_2$	5 ml	2 mM
0,1 mg/ml Hydrocortison	2,5 ml	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
20 $\mu\text{g}$ / ml Basal Fibroblast Growth Factor (bFGF)	10 $\mu\text{l}$	200 ng

Das Medium kann vier Wochen bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in der Dunkelheit gelagert werden.

*Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):*

NaCl	8,0 g	137 mM
KCl	0,2 g	2,68 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1,42 g	7,98 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,2 g	1,47 mM

Der pH-Wert der Lösung liegt bei, pH 7,2–7,5, und wird nicht eingestellt.

*Trypsin-Lösung:*

Trypsin	1,5 g	0,3 %
PBS	500 ml	

Die Lösung wurde sterilfiltriert und anschließend zu je 10 ml aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

*Doxycyclin-Stammlösung:*

Doxycyclin-HCl	1 g	200 mM
DMEM	10 ml	

Die Lösung wird in Aliquots zu je 1 ml bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

*Doxycyclin-Lösung:*

Doxycyclin-Stammlösung	10 $\mu\text{l}$	2 mM
DMEM	990 $\mu\text{l}$	

Die Lösung wurde steril filtriert und ist anschließend im Dunkeln bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  maximal vier Wochen haltbar.

### 6.1.2 Präparation primärer humaner Melanozyten

Primäre humane Melanozyten kommen in der menschlichen Epidermis vor. Um sie zu isolieren wurden Vorhäute in einer Petrischale mit 10 ml 0,9 % Kochsalzlösung gespült. Damit das Gewebe nicht austrocknet, wurde für alle Schritte unter 10 ml Kochsalzlösung gearbeitet. Anschließend wurde die Vorhaut aufgeschnitten, flach ausgebreitet und das Blut mit Hilfe einer Pinzette aus den Gefäßen gedrückt. Zur Isolierung der Zellen wurde die Dermis enzymatisch von der Epidermis getrennt. Dies geschah mit Hilfe des Verdauungsenzyms Trypsin. Um eine vollständige Trennung zu gewährleisten, mußte zunächst das Fettgewebe entfernt werden. Anschließend wurde die Vorhaut in kleine Stücke geschnitten und über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in 0,3 % Trypsin inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation mit dem Verdauungsenzym für eine Stunde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Um die Epidermis von der Dermis zu trennen wurde die gelöste Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abgezogen und in eine Petrischale mit 10 ml Melanozyten-Medium mit 10 % Rinderserum (FCS) überführt. Die Zellen wurden mechanisch aus dem Zellverband entfernt indem die Epidermisstücke mit der Rückseite einer gebogenen Pinzette ausgeklopft wurden. Das Medium mit den Zellen und den Gewebetrümmern wurde anschließend drei Minuten bei 200 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 12 ml Melanozyten-Medium mit 10 % FCS aufgenommen und komplett in eine Gewebekulturflasche mit der Bodenfläche  $A=75\text{ cm}^2$  überführt. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das

Medium abgesaugt und durch neues Medium ohne 10 % FCS ersetzt. Durch das eingesetzte Medium fand eine Selektion zu Gunsten der Melanozyten statt.

### **6.1.3 Kultivierung der Zellen**

#### **6.1.3.1 Kultivierung humaner Melanomzellen**

Melanomzellen sind adhärent wachsende Zellen. Sie wurden in Gewebekulturflaschen mit einer Bodenfläche von  $A=75 \text{ cm}^2$  in einem Begasungsbrutschrank bei  $37 \text{ °C}$  kultiviert. Die Atmosphäre im Brutschrank war wasserdampf-gesättigt und mit 5 %  $\text{CO}_2$  angereichert. Die Kultivierung erfolgte mit 12 ml DMEM-Medium. Alle vier Tage wurde das Medium erneuert.

Zur Passage wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 60-80 % einmal mit 6 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 0,7 ml Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben und diese für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurden 5 ml DMEM auf die Zellen gegeben. Durch den hohen Proteingehalt des FCS im Medium wurde das Fortschreiten der Proteolyse durch das Trypsin verhindert. Die Zellen wurden bei  $200 \text{ xg}$  für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml DMEM resuspendiert.  $200 \text{ }\mu\text{l}$  der Zellsuspension wurden anschließend in eine neue Kulturflasche gegeben und mit 12 ml Medium aufgefüllt.

#### **6.1.3.2 Zellkultur primärer humaner Melanozyten**

Primäre Melanozyten sind adhärent wachsende Zellen. Sie wurden wie Melanomzellen (siehe Kapitel 6.1.3.1) bei  $37 \text{ °C}$  in einem Begasungsbrutschrank in 12 ml Melanozyten-Medium gehalten. Alle vier Tage wurde das Medium gewechselt. Zur Passage wurden die Zellen einmal mit 6 ml PBS gewaschen und anschließend in 2 ml Trypsin-Lösung bei  $37 \text{ °C}$  fünf bis zehn Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 10 ml Melanozyten-Medium mit 10% FCS zugegeben. Die Zellen wurden bei  $200 \text{ xg}$  für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml Melanozyten-Medium mit 10 % FCS resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf drei neue Gewebekulturflaschen aufgeteilt und mit 10 % FCS-haltigem Medium mit 10 % FCS auf 12 ml aufgefüllt. Das Serum im Medium diente der Zelladhäsion. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch serumfreies

Melanozyten-Medium ersetzt. Die Passage primärer Melanozyten ist nur drei mal möglich.

#### 6.1.3.3 Kultivierung von transfizierten humanen Melanomzellen

Mit dem Tet-Genexpressions-System (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, D) transfizierte Melanomzellen wurden in DMEM-TetOn-Medium gehalten. Dieses Medium enthielt zusätzlich zwei Selektionsantibiotika, die gewährleisteten, daß die Zellen die zusätzlich eingeführten Gene nicht verlieren.

Alle anderen Kulturbedingungen entsprachen denen nicht transfizierter Melanomzellen (siehe Kapitel 6.1.3.1).

#### 6.1.3.4 Kontrolle der Genexpression in transfizierten Melanomzellen

Bei Melanomzellen, die mit dem Tet-Genexpressions-System transfiziert sind, steht das eingeführte Gen unter der Kontrolle eines Tetracyclin abhängigen Promotors. Dadurch läßt sich die Expression des Zielgens durch die Zugabe von Doxycyclin, einem Tetracyclin, steuern.

Die Zellen wurden auf DMEM-TetOn-Medium bis zu der gewünschten Zelldichte kultiviert. Das Medium wurde abgesaugt und 12 ml DMEM-Medium auf die Zellen gegeben. Die Genexpression wurde durch die Zugabe von 4 µM Doxycyclin für mindestens 24 Stunden induziert.

### 6.1.4 Einfrieren und Auftauen der Melanomzellen

Konfluente Melanomzellen wurden wie in Kapitel 6.1.3.1 beschrieben mit Trypsin abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Einfrierlösung für Melanomzellen aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 1 ml Einfrierrohrchen überführt und für 24 Stunden bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen zur entgeltigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Im Gegensatz zum Einfrieren soll das Auftauen von Zellen schnell erfolgen. Die Zellen wurden daher in der Hand aufgetaut und in 20 ml vorgewärmtes DMEM-Medium überführt und drei Minuten bei 200 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgesaugt und das Sediment in 24 ml DMEM resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend komplett auf zwei Gewebekulturflaschen aufgeteilt.

Bei transfizierten Zellen wurde nach 24 Stunden das Medium abgesaugt und die Zellen weiter auf DMEM-TetOn kultiviert.

## 6.2 Bakterien

Die Arbeit mit Bakterien erforderte eine keimarme Umgebung. Alle verwendeten Glasgeräte wurden für 4 h bei 220 °C erhitzt. Einwegmaterial und Medien wurden für 20 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert. Lösungen, die nicht hoch erhitzbar waren, wurden steril filtriert.

### 6.2.1 Benötigte Lösungen und Medien

*L-Broth Medium:*

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Hefe-Extrakt	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

*Ampicillin-Stammlösung:*

Ampicillin	0,5 g	50 mg / ml
H <sub>2</sub> O	10 ml	

Die Lösung wird steril filtriert und in Aliquots zu je 2 ml bei –20 °C aufbewahrt.

*L-Broth Agar mit Ampicillin:*

Pepton	10 g
NaCl	5 g
Hefe-Extrakt	5 g
Agar Agar	15 g
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml

Die angesetzte Lösung wurde autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C wurde 1 ml der Ampicillin-Stammlösung zugegeben. Die Lösung wurde anschließend auf Petrischalen verteilt. Nach dem Aushärten des Agars ist dieser für vier Wochen bei 4 °C lagerbar. Die Petrischalen wurden „face down“ gelegt, um zu verhindern, daß Kondenswasser auf den Nährboden tropft.

### 6.2.2 Anzucht transformierter *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ Zellen

Um Einzelkolonien von *E.coli*-Bakterien zu erhalten, wurden die Zellen aus Kapitel 6.7.4 auf L-Broth Agar mit Ampicillin mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Agarplatten können bei 4 °C maximal vier Wochen aufgehoben werden.

Zur Vermehrung der Bakterien wurde eine Übernachtskultur angeimpft. Hierfür wurde eine Einzelkolonie in 4 ml L-Broth Medium mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin für ca. 16 Stunden bei 37 °C unter Schütteln (ca. 220 Upm) inkubiert. Für die Anzucht von größeren Volumina wurde die Vorkultur in 400 ml L-Broth Medium mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin überführt und für weitere 16 Stunden bei 37 °C geschüttelt. Die benutzten Gefäße sollten etwa das Dreifache des eingesetzten Volumens aufnehmen können, um eine ausreichende Belüftung der Kulturen zu gewährleisten.

### 6.2.3 Einfrieren und Auftauen von *E. coli* DH5 $\alpha$

Für das Einfrieren wurden 700  $\mu$ l einer dicht gewachsenen Kultur auf vorgelegte 300  $\mu$ l Glycerin in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und gemischt. Die Zellen wurden bei – 80 °C eingefroren.

Die Glycerinkultur wurde schnell bei 37 °C aufgetaut und in 40 ml L-Broth mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben angezüchtet.

## 6.3 Zellbiologie

### 6.3.1 Messung der Proliferation

Die Proliferation der Zellen kann vereinfacht als die Anzahl der Zellen angesehen werden. Die Bestimmung der Zellzahl stellt daher eine einfache und zuverlässige Methode dar, die Proliferationsrate zu bestimmen. Bei adhärent wachsenden Zellen lösen sich die toten Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche ab und können einfach weggespült werden. (Gillies *et al.*, 1986) haben eine Methode beschrieben, die auf dieser Tatsache beruht. Nachdem die toten Zellen weggespült worden sind, wurden die verbleibenden Zellen mit Glutardialdehyd fixiert und anschließend mit Kristallviolett angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde abgewaschen. Um die Zellzahl zu

bestimmen, wurde der gebundene Farbstoff mit Triton X-100 aus der Zelle gewaschen und anschließend in einem ELISA-Photometer vermessen.

Benötigte Lösungen:

*Fixierlösung*

50 % Glutardialdehyd	300 µl	1 %
PBS	ad 15 ml	

*Kristallviolett-Stammlösung:*

Kristallviolett	15 mg	0,1 %
PBS	15 ml	

Die Lösung ist bei Raumtemperatur zwei Monate stabil.

*Färbe-Lösung:*

Kristallviolett-Stammlösung	1,5 ml	0,01 %
PBS	15 ml	

*Entfärbe-Lösung:*

Triton X-100	10 µl	0,2 %
PBS	5 ml	

Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert und behandelt. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen einmal mit 250 µl PBS gespült. Jedes Loch wurde mit 500 µl Fixierlösung aufgefüllt. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur langsam geschwenkt. Danach wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Platte einmal mit 500 µl PBS pro Loch gespült. Die Färbung wurde durch die Inkubation mit 500 µl Färbelösung je Loch für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter sanftem schwenken erreicht. Ungebundener Farbstoff wurde danach durch untertauchen der Platte in destilliertem Wasser für 15 Minuten entfernt. Um den gebundenen Farbstoff aus den Zellen auszuwaschen wurden diese mit je 200 µl Entfärbelösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem schütteln inkubiert. Zuletzt wurden 100 µl der Lösung aus jedem Loch bei 570 nm im ELISA-Photometer gemessen.

Die Absorption der Kontrollzellen wird auf 100 % gesetzt, die Zellzahl der behandelten Zellen wurde als % der Kontrolle berechnet.

### 6.3.2 Bestimmung der Zytotoxizität

Der unspezifische Zelltod, die Nekrose, wird vom Anschwellen der Zellen und schließlich von ihrem Platzen geprägt. Der Inhalt der Zelle wird daher *In vitro* in den Kulturüberstand abgegeben oder *In vivo* in das umgebende Gewebe. Um die Zytotoxizität nachzuweisen kann die Aufnahme oder der Ausschluß von Farbstoffen wie Trypanblau und Propidiumiodid gemessen werden. Eine weitere Methode ist die Aktivität zytoplasmatischer Enzyme wie der alkalischen Phosphatase oder Laktat-Dehydrogenase (LDH).

Mit dem hier benutzten „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, D) wurde die Aktivität der LDH im Kulturüberstand in einer zweistufigen Reaktion nachgewiesen. Im ersten Schritt der Reaktion katalysierte LDH die Umsetzung von Laktat zu Pyruvat und reduzierte dabei  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$ . Im zweiten Schritt überführte das Enzym Diaphorase den Wasserstoff von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  auf ein gelb gefärbtes Tetrazoliumsalz. Das Produkt der Reduktion, das rot gefärbte Formazansalz, konnte bei 490 nm im ELISA-Photometer nachgewiesen werden.

#### Benötigte Lösungen:

Die Katalysator-Lösungen und Farbstoff-Lösung sind gebrauchsfertig.

#### Reaktions-Lösung:

Katalysator-Lösung	2 $\mu\text{l}$
Farbstoff-Lösung	90 $\mu\text{l}$

Die Zellen wurden in einer 24-Loch Platte kultiviert und behandelt. Nach sechs Stunden und nach 24 Stunden wurden aus jedem Well 50  $\mu\text{l}$  Kulturüberstand abgenommen und bei 300 xg für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in eine 96-Loch Platte überführt und 50  $\mu\text{l}$  der Reaktionslösung zugegeben. Der Ansatz wurde danach für fünf bis zehn Minuten unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 490 nm wird mit Hilfe eines ELISA-Photometers bestimmt.

Die Absorption der Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt, und die Zellzahl der behandelten Zellen als % der Kontrolle berechnet.

### 6.3.3 Nachweis der Apoptose

Der Prozeß der Apoptose kann auf viele verschiedene Methoden gemessen werden. Eine weit verbreitete Methode ist der Nachweis der DNA-Fragmentierung. Dies stellt einen irreversiblen Schritt im Ablauf der Apoptose dar. Eine Endonuklease, die am Ende der apoptotischen Kaskade aktiviert wird, zerschneidet die DNA an zugänglichen Stellen. Die resultierenden Nukleosomen oder Oligo-Nukleosomen mit einen vielfachen von etwa 180 Basenpaaren DNA werden ins Zytoplasma abgegeben.

Für den Nachweis der Histon-assoziierten DNA-Fragmente wurde der käufliche Kit „Apoptosis Detection ELISA<sup>Plus</sup>“ der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, D) verwendet. Der Test wurde in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte durchgeführt. Nach der Zugabe von Zell-Lysat wurde eine Mischung aus anti-Histon-Biotin-Antikörpern und anti-DNA-Peroxidase-Antikörpern zugegeben. Der anti-Histon-Antikörper erkennt den Protein-anteil der Nukleosomen und immobilisiert diesen durch die Bindung des Biotins an das Streptavidin. Die DNA, die um die Histone gewunden ist, wird von dem zweiten Antikörper erkannt. Zum Nachweis wurde ein Farbsubstrat zugeben und die Absorption bei 405 nm gemessen.

#### Benötigte Lösungen:

Alle benötigten Lösungen waren gebrauchsfertig.

#### *Reagenz-Lösung*

anti-Histon-Biotin-Antikörper	4 µl
anti-DNA-Peroxidase-Antikörper	4 µl
Inkubations-Puffer	72 µl

Die Zellen wurden in 24-Loch Platten kultiviert und behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 150 xg für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 200 µl Lysis-Puffer auf jedes Loch gegeben. Die Platte wurde unter leichtem Schwenken für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden 20 µl des Überstandes in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte überführt und 80 µl der Reagenz-Lösung zugegeben. Nach zwei Stunden Inkubation unter leichtem schwenken wurden alle Proben dreimal mit 200 µl Inkubations-Puffer gewaschen und 100 µl der Substrat-Lösung zugeben. Nach fünf bis zehn Minuten Inkubation unter Lichtschutz wurde die Absorption bei 405 nm mit einem ELISA-Photometer gemessen.

Die Absorption der Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt, die Zellzahl der behandelten Zellen wird als % der Kontrolle berechnet.

## 6.4 Lipidchemie

### 6.4.1 Vesikelformierung für den *In-vitro*-UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase-Assay

Die UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase (Glukosylceramid-Synthase) ist ein transmembran Enzym, das seine katalytische Aktivität in der Golgi-Membran entfaltet. Für den *In-vitro*-Aktivitätsassay ist es daher erforderlich, Lipidvesikel zu bilden, die eine künstliche „Membran“ für die Synthese des Glukosylceramids darstellen.

#### Benötigte Lösungen:

##### *Vesikel-Puffer:*

1 M EPPS pH 7,4	100 µl	10 mM
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

Der Puffer ist bei 4 °C unbegrenzt lagerbar.

##### *Lipid-Stammlösungen:*

Dioleoyl-Phosphatidylcholin (DOPC)	25 mg/ml in CHCl <sub>3</sub>
20 mM <i>N</i> -Octanoylsphingosin (C <sub>8</sub> -Ceramid)	20 mM in MeOH
Sulfatide	5 mg/ml in CHCl <sub>3</sub> :MeOH (2:1, v/v)

Die Lipid-Lösungen wurden bei –20 °C in Glasröhrchen gelagert.

Für zehn Reaktionen wurden die folgenden Lipide vermengt und mit Stickstoff getrocknet:

		Konzentration im Ansatz
25 mg/ml DOPC	12,6 µl	1,26 µg/µl
20 mM C <sub>8</sub> -Ceramid	5 µl	0,17 µg/µl
5 ml/ml Sulfatide	9,9 µl	0,2 µg/µl

Zu dieser Mischung wurden 50 µl Vesikel-Puffer gegeben und die Lipide 30 Minuten auf Eis rehydratisiert. Die Vesikelbildung wurde durch einen Ultraschallstoß von 20 Sekunden Länge bei 70 – 100 % Leistung erreicht. Die Lipide werden dabei im Eiswasser gekühlt. 5 µl der Lösung wurden zu jedem Reaktionsansatz gegeben (siehe Kapitel 6.5.1)

## 6.4.2 Isolierung und Auftrennung zellulärer Lipide

### 6.4.2.1 Isolierung von zellulärem Gesamt-Lipid

Die Isolierung von zellulären Lipiden erfolgte durch eine modifizierte Methode nach (Bligh und Dyer, 1959).

Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen angezogen und behandelt. Nach dem Ende der Behandlung wurden die Zellen einmal mit 6 ml PBS gespült und anschließend wie in Kapitel 6.1.3 beschrieben mit Trypsin abgelöst. Nach dem zentrifugieren wurde das Pellet über nacht gefriergetrocknet. Anschließend wurden die Lipide durch Zugabe von 250  $\mu$ l  $\text{CHCl}_3$ , 125  $\mu$ l MeOH und 100  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  isoliert. Die Lösung wurde zwei Minuten mit einem Vortex-Schüttler gemischt. Danach wurde die Lösung zehn Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. Um eine Phasentrennung zu erreichen, wurden zu der Lösung 125  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}$  und 125  $\mu$ l  $\text{CHCl}_3$  gegeben. Die Proben wurden erneut wie oben beschrieben geschüttelt und zentrifugiert. Danach wurde die untere, organische Phase abgenommen und in ein, gewogenes Gefäß überführt. Die isolierten Lipide wurden im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurde das Gefäß erneut gewogen. Die Differenz zwischen den beiden Wägungen war die Menge an isoliertem Lipid. Die Proben wurden in frischem Chloroform in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  aufgenommen.

### 6.4.2.2 Auftrennung und Nachweis zellulärer Lipide

#### Benötigte Lösungen:

*Laufmittel* (Lavi *et al.*, 1997):

Chloroform	30 ml
Methanol	20 ml
Wasser	4 ml

Das Laufmittel entspricht einem Verhältnis von Chloroform: Methanol : Wasser von 60 : 40 : 8 (v / v / v / v).

*Färbelösung* (Touchstone *et al.*, 1983):

CuSO <sub>4</sub> × 5 H <sub>2</sub> O	15,63 g	0,63 M
85 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	10 ml	8,5 %
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

Das Laufmittel wurde in eine Dünnschichtchromatographie-Kammer gefüllt. Damit die Proben gleichmäßig laufen wurde ein zugeschnittenes Filterpapier an eine Kammerwand gestellt und diese verschlossen. Sobald das Filterpapier komplett mit dem Laufmittel durchsetzt war, konnte die Kammer benutzt werden.

100 - 200 µg Probe wurden mit Hilfe eines Probenauftragegerätes auf eine hochauflösende Dünnschichtchromatographie-Platte (HPTLC-Platte) aufgetragen. Die Platte wurde anschließend so in die Dünnschichtchromatographie-Kammer gestellt, daß ihre Rückseite eine Wand berührte, und die Kammer wieder verschlossen. Der Lauf war beendet, wenn die Front des Laufmittels nur noch 0,5 cm vom oberen Rand der HPTLC-Platte entfernt war. Die Platte wurde aus der Kammer genommen und getrocknet. Die Lipide wurden danach auf einer Heizplatte zehn Minuten bei 180 °C fixiert. Nach dem Abkühlen wurde die Platte drei Sekunden in die Färbelösung getaucht und anschließend getrocknet. Zum Färben der Lipide wurde die HPTLC-Platte auf einer Heizplatte bei 120 °C erhitzt, bis eine ausreichende Schwärzung der Lipide zu sehen war.

## 6.5 Enzymreaktionen

### 6.5.1 Messung der UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase-Aktivität

Die *In-vitro*-Aktivität der humanen UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase (Glukosylceramid-Synthase) wurde durch einen radioenzymatischen Ansatz bestimmt (Costantino-Ceccarini und Cestelli, 1981; Shayman und Abe, 2000). Zell-Lysate und UDP-Glukose wurden hierfür mit Liposomen inkubiert, die *N*-Octanoylsphingosin als Substrat enthielten (siehe Kapitel 6.4.1). Die Glukosylceramid-Synthase katalysierte aus diesen Substraten die Bildung von Glukosylceramid (Costantino-Ceccarini und Morell, 1973).

Benötigte Lösungen:*12,5 x Assay-Puffer*

1 M EPPS, pH 7,8	93,8 µl	625 mM
200 mM DTT	9,38 µl	15 mM
H <sub>2</sub> O	ad 150 µl	

Für zehn Reaktionen wird die folgende Menge UDP-[<sup>14</sup>C]-Glukose mit UDP-Glukose gemischt:

3,7 Mbq/ml UDP-[ <sup>14</sup> C]-Glukose	0,38 µl	46,25 kBq/ml
2,022 mM UDP-Glukose	30,72 µl	2 mM

*Ein Standard-Assay enthält in jeder Reaktion:*

12,5 x Assay-Puffer	2 µl	50 mM EPPS, 1 mM DTT
Vesikel-Mix	5 µl	1,26 µg/µl DOPC; 0,17 µg/µl C <sub>8</sub> -Ceramid; 0,2 µl/µl Sulfatide
325 mM MnCl <sub>2</sub>	0,5 µl	6,5 mM
2 mM UDP-[ <sup>14</sup> C]-Glukose	3,13 µl	250 µM (5,8 kBq)
Protein	25 µg	1 µg/µl
H <sub>2</sub> O	ad 25 µl	

Die Reaktion wurde durch die Zugabe der UDP-Glukose-Lösung gestartet. Die Proben wurden für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum abstoppen der Reaktion wurden die Proben auf Eis gestellt und 100 µl 5 % Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (w/v) zugegeben. Die Extraktion der Lipide erfolgte durch die Zugabe von 630 µl *tert*-Butyl-methylether. Die Proben wurden für zehn Sekunden auf einem Vortex-Schüttler gemischt und danach für fünf Minuten bei 800 xg zentrifugiert. Anschließend wurde die organische Phase abgenommen und in Szintillations-Röhrchen überführt. Zum Auswerten wurde zusätzlich eine Probe vermessen, die nur Radioaktivität enthält.

**6.6 Proteinchemie****6.6.1 Peptid-ELISA**

Um die Spezifität der hergestellten polyklonalen Antikörper gegen die humane Glukosylceramid-Synthase zu testen, wurde ein Peptid-ELISA benutzt, in dem die Peptide, die zur Herstellung des Antikörpers dienten, als Antigen eingesetzt wurden. Der zu testende Antikörper wurde zunächst in einer Verdünnung von 1:500 an eine Mikrotiterplatte gekoppelt. Anschließend wurden die Peptide zugegeben. Nach der

Bindung der Peptide an den Antikörper wurde der zu testende Antikörper in verschiedenen Verdünnungen zugegeben. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch einen Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen Kaninchenantikörper. Die Peroxidase dieses Antikörpers katalysierte eine Farbreaktion, die bei 490 nm im ELISA-Photometer nachgewiesen wurde.

### Benötigte Lösungen:

#### *Fixier-Lösung:*

50 % Glutardialdehyd	1 ml	0,5 %
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml	

#### *Puffer-1:*

10 x PBS	50 ml	
Tween <sup>®</sup> -20	250 µl	0,05 %
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	

#### *Peptid-Lösung:*

Peptid-1	0,1 mg	0,1 mg/ml
Peptid-2	0,1 mg	0,1 mg/ml
Puffer-1	1 ml	

#### *Blockier-Lösung:*

Rinderserum Albumin	1 g
PBS	100 ml

#### *Substrat-Mix:*

Phenyldiamin	8 mg
33 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	5 µl
0,1 M Citrat pH 6,0	10 ml

Der ELISA wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. 100 µl des zu testenden Antikörpers wurden in einer Verdünnung von 1:500 in Puffer-1 für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend verworfen. Danach wurden je Loch 100 µl Fixier-Lösung zugegeben und die Platte 30 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde der Überstand abgegossen und jedes Loch einmal mit 100 µl Puffer-1 gewaschen. Um freie Bindungsstellen zu blockieren, wurden je 200 µl Blockier-Lösung auf jede Probe gegeben und die Platte 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgeschüttet und 100 µl Peptid-Lösung auf jedes Loch

gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Lösung wurde anschließend verworfen und jedes Loch dreimal mit 100 µl Puffer-1 gewaschen. Es folgte eine weitere Inkubation mit dem zu testenden Antikörper in verschiedenen Verdünnungen für 60 Minuten bei 37 °C. Die Platte wurde hiernach erneut dreimal mit je 100 µl Puffer-1 gespült. Zum Nachweis wurde jedes Loch mit einer 1:1000 Verdünnung eines Peroxidase gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörpers in 0,1 M Citrat, pH 6,0, bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Die Ansätze wurden dreimal mit je 100 µl Puffer-1 gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl Substrat-Lösung zugegeben und die Platte bei 37 °C für fünf Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden je 100 µl 2,5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu jedem Loch zugegeben. Die Platte wurde anschließend bei 490 nm im ELISA-Photometer vermessen.

Um eine Aussage über die Spezifität des Antikörpers treffen zu können, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt. Eine Kontrolle ohne Antikörper, eine Kontrolle ohne sekundären Antikörper, ohne Antigen und sowie eine Kontrolle ohne den Antikörper an die Platte zu koppeln. Zusätzlich wurde noch ein Peptid mitgeführt, das aus der Sequenz der humanen Phospholipase 1 stammt (Müller-Wieprecht *et al.*, 1998).

### 6.6.2 Isolierung zellulärer Proteine und subzelluläre Isolierung

#### Benötigte Lösungen:

##### *Puffer A:*

1 M EPPS pH 7,8	500 µl	50 mM
1 M Sucrose	3200 µl	320 mM
100 mM PMSF	50 µl	0,5 mM
1 mM Leupeptin	100 µl	0,01 mM
0,1 mM Pepstatin	100 µl	1 µM
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

##### *Puffer B:*

1 M EPPS pH 7,8	100 µl	50 mM
100 mM PMSF	10 µl	0,5 mM
1 mM Leupeptin	20 µl	0,01 mM
0,1 mM Pepstatin	20 µl	1 µM
H <sub>2</sub> O	ad 2 ml	

Puffer A und Puffer B wurden immer frisch auf Eis angesetzt.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend wie im Kapitel 6.1.3 beschrieben mit Trypsin abgelöst. Nach dem Zentrifugieren wurde der Kulturüberstand abgesaugt und die Zellpellets auf Eis mit je 1 ml Puffer A versetzt. Die Zellen wurden durch drei kurze Ultraschallstöße von je drei Sekunden im Eiswasser solubilisiert. Zwischen den Ultraschallstößen war eine Pause von je zehn Sekunden. Die Proteinlösung wurde anschließend zehn Minuten bei 13.000 xg und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer B resuspendiert und die Lösung bis zum Gebrauch bei –80 °C gelagert.

Für die subzelluläre Fraktionierung wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet. Nach der Zugabe von Puffer A wurden die Zellen für zehn Minuten bei 10.000 xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für weitere 60 Minuten bei 100.000 xg und 4 °C sedimentiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl Puffer B aufgenommen und bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

### 6.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchonin-Säure basiert auf einer Methode, die von (Smith *et al.*, 1985) beschrieben wurde. Dabei bilden Kupfer(II)-Ionen während der Biuretreaktion im alkalischen Milieu einen rot- bis blauvioletten Komplex mit den Amid-Stickstoffatomen der Proteine. In diesem Komplex wird Kupfer(II) zu Kupfer(I) reduziert. Ein Kupfer(I)-Ion bildet einen stabilen Chelatkomplex mit zwei Molekülen Bicinchonin-Säure. Dieser Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann daher in einem Photometer vermessen werden. Abhängig von der Inkubationstemperatur können verschiedene Empfindlichkeiten erreicht werden, die in Tabelle 1 dargestellt sind.

**Tabelle 1: Abhängigkeit der Sensitivität der Proteinbestimmung von der Temperatur**

Inkubationszeit	Temperatur	Konzentrationsbereich
30 Minuten	60 °C	5 – 250 µg / ml
30 Minuten	37 °C	20 – 1200 µg / ml
120 Minuten	Raumtemperatur	20 – 1200 µg / ml

Benötigte Lösungen:

Die Proteinbestimmung wurde mit dem käuflichen „BCA Protein Assay“ Kit (Perbio, Weißkirchen, D) durchgeführt. Lösung A und Lösung B waren gebrauchsfertig und bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.

*Arbeitslösung:*

Lösung A	50 Teile
Lösung B	1 Teil

In einer 96-Loch Platte wurden 2,5 µl der Protein-Probe und 7,5 µl bidestilliertes Wasser gemischt. Eine Standard-Reihe wurde parallel mit verschiedenen Konzentrationen von Rinderserum Albumin angesetzt. Jede Probe und jeder Standard wurden in Dreifach-Werten pipettiert. Zu jedem Loch wurden 200 µl der Arbeitslösung gegeben und die Platte 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 570 nm in einem ELISA-Photometer gemessen. Mit der Standard-Reihe wurde eine Regression der Form  $A = a + b \cdot e^{-cP}$  durchgeführt. Dabei war  $A$  die Absorption,  $P$  die Proteinkonzentration,  $a$ ,  $b$  und  $c$  die Variablen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe der erhaltenen Werte der Variablen berechnet.

**6.6.4 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde modifiziert nach Laemli (1970) durchgeführt. Polyacrylamid-Gele wurden durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und  $N,N'$ -Methylenbisacrylamid als Quervernetzer gebildet. Ammoniumpersulfat (APS) und  $N,N,N',N'$ -Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) wurden als Radikalbildner und Radikalstabilisator zugesetzt. Allen Puffern wurde das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt, das praktisch an alle Proteine bindet und sie denaturiert. Zusätzlich wurde 1,4-Dithitritol (DTT) dem Probenpuffer beigesetzt um Disulfidbrücken zu reduzieren. Um die Masse unbekannter Proteine zu bestimmen, wurde parallel ein Größenstandard mit aufgetrennt.

Benötigte Lösungen:

AA-Bis wurde als gebrauchsfertige 40 %-Lösung bei der Firma Roth (Karlsruhe, D) gekauft. Das Verhältnis von Acrylamid : *N,N'*-Methylenbisacrylamid entsprach bei dieser Lösung 29:1 (w/w) oder 40 % T und 3,4 % C.

*10 % APS*

Ammoniumpersulfat	0,1 g	10 %
H <sub>2</sub> O	1 ml	

Die Lösung ist für vier Wochen bei 4 °C stabil.

*Trenngelpuffer (5×)*

		Endkonzentration
Tris	113,5 g	375 mM
SDS	2,5 g	35 mM
HCl	ad pH 8,8	
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	

*Sammelgelpuffer (4×)*

		Endkonzentration
Tris	16,95 g	175 mM
SDS	0,8 g	35 mM
HCl	ad pH 6,8	
H <sub>2</sub> O	ad 200 ml	

*Elektrophoresepuffer (10×)*

		Endkonzentration
Tris	60,55 g	175 mM
SDS	20,19 g	35 mM
Glycin	285,27 g	190 mM
H <sub>2</sub> O	ad 2.000 ml	

Der pH-Wert wird nicht eingestellt und liegt bei pH 8,3.

*Probenpuffer (5×)*

		Endkonzentration
1 M Tris/HCl pH 6,8	720 µl	30 mM
Glycerol	1250 µl	700 mM
10 % SDS	2,5 ml	35 mM
1,4-Dithiothreitol	0,39 g	100 mM
1 % Bromphenolblau	250 µl	0,05 %
H <sub>2</sub> O	ad 5 ml	

*Pipettierschema für zwei Gele der Größe 80 mm × 60 mm × 1,5 mm:*

	Trenngel				Sammelgel 3 %
	7,5 %	10 %	12,5 %	15 %	
H <sub>2</sub> O [ml]	12,15	10,9	9,65	8,4	5,34
Trenngelpuffer (5×) [ml]	4	4	4	4	-
Sammelgelpuffer (4 ×) [ml]	-	-	-	-	2
AA-BIS [ml]	3,75	5	6,25	7,5	0,6
TEMED [µl]	5	5	5	5	6
10 % APS [µl]	95	95	95	95	55

Die Trenngellösung wurde wie in der Tabelle oben beschrieben vorbereitet. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von TEMED und APS gestartet. Die Gellösung wurde vorsichtig gemischt und so zwischen das Sandwich aus Glasplatten und Platzhaltern gefüllt, daß noch genügend Platz für das Sammelgel und den Kamm bleibt. Um eine gerade Oberfläche zu erhalten, wurde die Lösung vorsichtig mit n-Butanol überschichtet. Nach Beenden der Polymerisation wurde der Überstand abgegossen und mit einem 3 MM Papier komplett entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel eingefüllt und der Kamm eingeführt. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt, die Geleinheit in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Elektrophoresepuffer gefüllt.

Die Proben wurden mit Puffer B (siehe Kapitel 6.6.2) auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml verdünnt, und  $\frac{1}{4}$  des Volumens wurde an Probenpuffer (5×) zugegeben. Anschließend wurden die Proteine bei 95 °C für fünf Minuten denaturiert.

Die Elektrophorese lief bei 35 mA pro Gel für 15 Minuten und anschließend bei 20 mA pro Gel. Die Spannung war auf 150 V begrenzt. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte. Die Gelapparatur wurde auseinander gebaut und die Gele für die weitere Verwendung entfernt.

### 6.6.5 Western Blot

Einzelne Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können durch die Bindung eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden. Innerhalb eines Gels ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion nur unter Verlust der Auflösung oder gar nicht zu erreichen. Daher werden die aufgetrennten Proteine durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Im allgemeinen sind die Proteine bei dem pH-Wert des Transferpuffers aufgrund des SDS negativ geladen und werden daher von der Kathode zur Anode transferiert. Die immobilisierten Proteine können dann auf der Membran mit einem Antikörper nachgewiesen werden.

#### Benötigte Lösungen:

##### *Transferpuffer (2×)*

		Endkonzentration
Tris	12,11 g	25 mM
Glycin	28,83 g	192 mM
Methanol	800 ml	4,9 M
H <sub>2</sub> O	ad 2.000 ml	

Der pH-Wert der Lösung wird nicht eingestellt und sollte bei pH 8,3 liegen.

##### *Färbelösung:*

Ponceau S	10 g	0,1 %
Eisessig	50 ml	0,5 %
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml	

Das Tankblotverfahren folgte unmittelbar auf die SDS-PAGE. Die Nitrozellulose wurde in Transferpuffer (1×) zusammen mit Schwämmen und 3 MM Papier eingeweicht. Das Transfer-Sandwich wurde zusammengebaut, indem auf die schwarze Seite der Kassette zunächst ein Schwamm, dann ein 3 MM Papier, dann das Gel, dann die Nitrozellulose, dann wieder ein 3 MM Papier und zuletzt erneut ein Schwamm gelegt wurden. Dabei wurde darauf geachtet, daß sich keine Luftblasen in dem System befinden. Die Kassette wurde geschlossen und so in die Transferkammer eingehängt, daß die Membran zur Anode zeigte. In die Kammer wurde zusätzlich ein Eisblock gehängt. Die Transferkammer wurde komplett mit Transferpuffer gefüllt. Der Transfer der Proteine fand auf einem Magnetrührer bei 100 V für 60 Minuten statt. Die Stromstärke war auf 250 mA beschränkt. Der erfolgreiche Transfer der Proteine wurde durch die reversible Färbung mit Ponceau S überprüft.

### 6.6.6 Immuno-Nachweis geblotteter Proteine

Nach dem Western-Blot kann auf der Membran die Antigen-Antikörper Reaktion durchgeführt werden. Dabei werden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt. Der erste Antikörper ist spezifisch für das nachzuweisende Protein, der zweite Antikörper ist spezifisch für den ersten Antikörper und zudem mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die der Visualisierung durch eine Chemilumineszenz-Reaktion dient. Durch die Peroxidase kann Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert werden, indem Luminol als Reduktionsmittel dient. Ein „Enhancer“ verstärkt diese Reaktion und die Stabilität des Übergangszustandes von Luminol, der während der Reaktion auftritt. Während des Rückfalls in den Grundzustand wird Licht emittiert, das auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann.

#### Benötigte Lösungen:

##### *PBS (10×):*

		Endkonzentration
KCl	4 g	2,68 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g	1,47 mM
NaCl	160 g	137 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O	28,8 g	8,09 mM
H <sub>2</sub> O	ad 2.000 ml	

Der pH-Wert wird nicht eingestellt und sollte bei pH 7,4 liegen. Dieses PBS wird nicht für die Zellkultur verwendet.

##### *PBS-T:*

PBS (10×)	50 ml	
Tween-20	500 µl	0,1 %
H <sub>2</sub> O	ad 500 ml	

##### *Blockier-Lösung:*

Trockenmilchpulver	0,5 g	1 %
PBS-T	50 ml	

##### *Super-Signal Arbeitslösung:*

Luminol / Enhancer	2,5 ml
Stabile Peroxid-Lösung	2,5 ml

*Stripping-Puffer:*

Glycin	15 g	0,2 M
SDS	10 g	35 mM
Tween-20	1 ml	0,1 %
HCl	ad pH 2,3	
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml	

Unmittelbar vor Gebrauch werden noch 2 ml 5 M Natriumazid zugegeben.

Die Membran wurde in 10 ml Blockier-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem schwenken inkubiert. Die Blockierlösung wurde anschließend verworfen und der erste Antikörper in 10 ml PBS-T über Nacht bei 4 °C unter leichtem schwenken inkubiert. Die Verdünnung der benutzten Antikörper ist in der Tabelle 2 angegeben. Die Lösung wurde verworfen und die Membran zwei-mal für fünf Minuten mit je 10 ml PBS-T unter leichtem schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper in 10 ml PBS-T für 60 Minuten unter leichtem schwenken inkubiert. Danach wurde die Membran erneut zwei-mal in 10 ml PBS-T wie oben beschrieben gewaschen und anschließend zwei-mal mit PBS für je 5 Minuten unter leichtem schütteln gewaschen. Zum Nachweis der Proteine wurde die Membran fünf Minuten in der Super-Signal-Arbeitslösung inkubiert. Zuletzt wurde die Membran in eine Plastikhülle gesteckt und ein Röntgenfilm zur Detektion aufgelegt. Um die Membran mehrmals zu benutzen, wurde gebundener Antikörper mit 20 ml Stripping-Puffer entfernt. Die Membran wurde hierfür mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt.

**Tabelle 2: Verdünnungen der verwendeten Antikörper**

primärer Antikörper	Verdünnung	Verdünnung des sekundären Antikörpers
anti $\beta$ -Aktin	1:2.000.000	1:40.000
anti Maus-Bcl-2	1:1.000	1:10.000
anti Glukosylceramid-Synthase	1:2.000	1:10.000

## 6.7 Molekularbiologie

### 6.7.1 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Nukleinsäuren erfolgte mit Kits der Firma Qiagen (Hilden, D). Diese basieren auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, unter bestimmten Ionenbedingungen in alkoholischer Lösung an Silikatkügelchen zu binden (Vogelstein und Gillespie, 1979), während Proteine und Kohlenhydrate abgewaschen werden können. Die verwendeten Puffer sind Bestandteile des Kits.

#### 6.7.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA

##### Benötigte Lösungen:

RLT-Puffer, RW1-Puffer, DEPC-Wasser und RPE-Puffer sind gebrauchsfertige Lösungen.

##### *Lysispuffer:*

RLT-Puffer	3 ml	
β-Mercaptoethanol	30 µl	1 %

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten ( $A = 9,75 \text{ cm}^2$  pro Loch) kultiviert und zur Ernte mit kaltem PBS gespült. Nach Zugabe von 350 µl Lysispuffer wurden sie mit einem Zellschaber abgekratzt. Zum Homogenisieren wurde das Lysat auf eine QIAshredder Zentrifugationssäule gegeben und für eine Minute bei Raumtemperatur mit 13.000 xg zentrifugiert. Das Homogenat kann bei  $-80^\circ \text{C}$  eingefroren werden. Zur Isolation wurde ein Volumen 70 % Ethanol zugefügt, gründlich gemischt und das gesamte Lysat auf eine Mini-Spin-Säule gegeben. Die Zentrifugation erfolgte 13.000 Upm für 15 Sekunden. Das Eluat wurde verworfen. Zum Waschen wurden nacheinander 700 µl RW1-Puffer und zweimal 500 µl RPE auf die Säule gegeben und jedesmal der Durchfluß verworfen. Die Säule wurde zum Schluß zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Die RNA wurde durch Zugabe von 30 µl DEPC-Wasser und Zentrifugieren bei 13.000 Upm für eine Minute eluiert und bei  $-20^\circ \text{C}$  gelagert. Die RNA-Menge wurde photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 6.7.1.5).

### 6.7.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

#### Benötigte Lösungen:

Puffer QG, Puffer PE und Puffer EB sind gebrauchsfertige Lösungen.

Ein durch Restriktion von DNA erhaltenes Fragmentgemisch (siehe Kapitel 6.7.5) wurde in einem Agarose-Gel (siehe Kapitel 6.7.6) aufgetrennt und angefärbt. Auf einem UV-Durchlichtgerät wurden die gesuchten Banden schnell mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstückchen von maximal 0,2 g wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem dreifachen Volumen an Puffer QG versetzt und für zehn Minuten bei 50 °C unter Intervallschütteln von fünf Sekunden mit 1.400 Upm alle drei Minuten gelöst. Nach Zugabe des einfachen Gelvolumens 2-Propanol wurde die Lösung auf eine QIAquick-Zentrifugationssäule gegeben, für eine Minute mit 13.000 xg zentrifugiert und das Eluat verworfen. Danach wurden einmal je 500 µl Puffer QG zugegeben, wie zuvor zentrifugiert, 750 µl Puffer PE zugegeben, fünf Minuten inkubiert und wie oben zentrifugiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, um den im Puffer PE enthaltenen Ethanol zu entfernen. Die Elution erfolgte mit 50 µl Puffer EB durch Inkubation für eine Minute und anschließende Zentrifugation.

### 6.7.1.3 Plasmidpräparation im Großmaßstab

Die alkalische Extraktion nach Birnboim und Doly (1979) nutzt das unterschiedliche Verhalten von linearer gegenüber zirkulär geschlossener DNA bei der Denaturierung mit Alkali und anschließender schneller Neutralisation in Anwesenheit einer hohen Salzkonzentration aus.

#### Benötigte Lösungen:

Puffer P1, P2, P3, QBT, QC, QF und 100 mg/ml Ribonuklease A sind gebrauchsfertige Lösungen.

Je 250 ml einer Großkultur (siehe Kapitel 6.2.2) wurden für 15 Minuten bei 4 °C mit 6.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit je 10 ml eiskaltem Puffer P1 mit 100 µg/ml Ribonuklease A mit einer Pipette resuspendiert und in ein neues Gefäß überführt. Nach der Zugabe von 10 ml Puffer P2 wurde die Lösung

durch sechsmaliges saches Umdrehen gemischt und zur Lyse fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 10 ml eiskalter Puffer P3 zugegeben und wie zuvor gemischt. Zur Fällung wurde das Gemisch 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei 4 °C und 20.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und erneut für 15 Minuten wie zuvor zentrifugiert. Währenddessen wurde je ein Qiagen-Tip 500 mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Auf die trocken-gelaufene Säule wurde der Überstand der zweiten Zentrifugation dekantiert und durchlaufen gelassen. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml Puffer QC gewaschen und mit 15 ml Puffer QF eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 ml 2-Propanol versetzt, gemischt und 30 Minuten bei 4 °C und 15.000 xg zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und nach Zentrifugation wie zuvor an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde die Probe in 500 µl Puffer TBE (siehe Kapitel 6.7.6) aufgenommen.

#### 6.7.1.4 Plasmidpräparation im Kleinmaßstab

##### Benötigte Lösungen:

Puffer P1, P2, N3, PB, PE, EB und 100 mg/ml Ribonuklease A sind gebrauchsfertige Lösungen.

1,5 ml einer Vorkultur (siehe Kapitel 6.2.2) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für eine Minute bei Raumtemperatur mit 13.000 xg zentrifugiert und das Pellet in 250 µl Puffer P1 mit 100 µg/ml Ribonuklease A mit einer Pipette resuspendiert. Nach der Zugabe von 250 µl Puffer P2 wurden die Proben durch sechsmaliges saches Umdrehen gemischt und zur Lyse maximal 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden 350 µl eiskalter Puffer N3 zugegeben und wie zuvor gemischt. Zur Fällung wurde das Gemisch wie zuvor zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine QIAprep Zentrifugationssäule gegeben und für eine Minute wie oben beschrieben zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 500 µl Puffer QB und zweimal mit je 750 µl Puffer PE gewaschen. Zur vollständigen Beseitigung des Ethanols folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die Elution erfolgte mit 50 µl Puffer EB. Nach einer Inkubation von einer Minute wurde die Säule wie zuvor zentrifugiert.

### 6.7.1.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von wäßrigen Nukleinsäuren kann durch Messung der Absorption von UV-Licht der Wellenlänge 260 nm bestimmt werden. Eine Absorption ( $A_{260}$ ) von 1,00 entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA, 33  $\mu\text{g/ml}$  kurzer, einzelsträngiger DNA oder 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Mißt man zusätzlich die Absorption bei 280 nm ( $A_{280}$ ), läßt sich über den Quotienten  $Q_{Ns} = A_{260}/A_{280}$  auf den ungefähren Grad der Verunreinigung mit Protein schließen. Reine DNA-Präparationen besitzen einen Quotienten von  $Q_{Ns} = 1,8$ . Der Quotient für reine RNA-Präparationen hat einen Wert von  $Q_{Ns} = 2,0$ . Kontaminationen mit Protein oder anderen aromatischen Substanzen verursachen durch ihre Absorption bei 280 nm einen niedrigeren Wert des Quotienten.

## 6.7.2 Enzymkatalysierte Reaktionen

### 6.7.2.1 Restriktion von DNA

#### Benötigte Lösungen:

##### *Stop-Lösung:*

EDTA	0,29 g	10 mM
SDS	0,1 g	3,5 mM
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

##### *Stop/Lade Lösung (5 ×):*

10 × DNA Probenpuffer (siehe Kapitel 6.7.6)	5 ml
Stop Lösung	5 ml

Ein Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Inkubationspuffer (10 ×)	2 $\mu\text{l}$
10 U/ $\mu\text{l}$ Enzym	0,5 $\mu\text{l}$
DNA	2 – 3 $\mu\text{g}$
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu\text{l}$

Die Konzentration an DNA sollte etwa 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  bis 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  betragen. Für präparative Ansätze wurden Volumina bis 100  $\mu\text{l}$  verwendet. Das Schneiden der DNA erfolgte bei 37 °C für 60 Minuten. Danach wurde die Reaktion durch die Zugabe von  $\frac{1}{4}$  Volumen Stop/Lade Lösung (5×) und Inkubation bei 65 °C für fünf Minuten beendet. Die Fragmente wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Kapitel 6.7.6).

### 6.7.2.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA

Die Dephosphorylierung der DNA ist vor allem bei linearisierten Vektoren notwendig, um eine Religation bei Einbringen eines Fremdgens zu verhindern.

Fragmente aus präparativen Restriktionsansätzen (siehe Kapitel 6.7.2.1) können direkt durch die Zugabe von 1 U Alkalische Phosphatase je pmol 5'-Enden vor dem Stoppen dephosphoryliert werden. Die Inaktivierung erfolgte hier durch die Zugabe von  $\frac{1}{4}$  des Ansatzvolumens Stop/Lade Lösung und Inkubation für 10 Minuten bei 75 °C. Die Fragmente wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Kapitel 6.7.6) und hieraus eluiert (siehe Kapitel 6.7.1.2).

### 6.7.2.3 Ligation von DNA-Fragmenten

#### Benötigte Lösungen:

Der Ligase-Puffer (5×) ist eine gebrauchsfertige Lösung der Firma Invitrogen, (Karlsruhe, D).

Die Vektormoleküle müssen durch Restriktion linearisiert (siehe Kapitel 6.7.2.1) und dephosphoryliert (siehe Kapitel 6.7.2.2) sein. Nach Möglichkeit wird der Vektor und das zu ligierende Fragment mit derselben Restriktionsendonuklease geschnitten, da bei überhängenden Enden diese komplementär zueinander sind.

Der Ligationsansatz enthielt 11 fmol Vektormoleküle, 33 fmol DNA und 1 U T4-Ligase in einem Volumen von 20 µl Ligase-Puffer (1×). Als Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Ligase mitgeführt. Die Ansätze wurden 16 Stunden bei 14 °C inkubiert und ohne weitere Aufbereitung zur Transformation (siehe Kapitel 6.7.4) eingesetzt.

## **6.7.3 Klonierung der humanen UDP-Glukose:Ceramid-Glukosyltransferase**

Um die humane Glukosylceramid-Synthase in humanen Melanomzellen zu überexprimieren, mußte das Gen aus dem Vektor pT7T3D-Pac in den Schaltbaren Vektor pTRE umkloniert werden. Das Gen wurde dazu mit der Endonuklease EcoRI aus dem Vektor, pT7T3D-Pac geschnitten (siehe Kapitel 6.7.2.1). Auf die gleiche Weise wurde auch der Zielvektor, pTRE, geschnitten. Die 5'-Enden des linearisierten Vektors und des Gens wurden anschließend dephosphoryliert (siehe Kapitel 6.7.2.2), auf einem Agarose-Gel (siehe Kapitel 6.7.6) aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (siehe

Kapitel 6.7.1.2). Zuletzt wurde das DNA-Fragment der humanen Glukosylceramid-Synthase mit dem linearisierten Vektor pTRE ligiert (siehe Kapitel 6.7.2.3).

#### **6.7.4 Transformation kompetenter *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -Zellen**

Für die Transformation wurden 50  $\mu$ l kompetenter *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen auf Eis in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, mit je 0,5 mg der zu transformierenden DNA vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Mit einem Hitzeschock von 20 Sekunden bei 37 °C erfolgte die Aufnahme der DNA. Nach einer Inkubation von zwei Minuten auf Eis wurden 950  $\mu$ l L-Broth-Medium zugegeben und die Zellen zur „Regeneration“ für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln (200-300 Upm) inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen für fünf Sekunden bei 2.000 xg zentrifugiert, das Pellet mit 100  $\mu$ l L-Broth Medium versetzt und wie unter Kapitel 6.2.2 beschrieben angezüchtet.

#### **6.7.5 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Methode der Vervielfältigung von DNA aus geringsten Mengen genetischen Materials wurde 1985 von Kary Mullis erfunden (Saiki *et al.*, 1985). Sie setzt voraus, daß man die Nukleotidsequenz auf beiden Seiten der Zielregion kennt. Als Ausgangsmaterial dient Doppel- oder Einzelstrang-DNA. Durch Erwärmen wird der Doppelstrang denaturiert und mit zwei kurzen Oligonukleotiden, den Primern, hybridisiert. Die Vervielfältigung der DNA findet durch eine thermostabile Polymerase statt. Der eine Primer sollte komplementär zum Plus-Strang und der andere zum Minus-Strang sein. Die Reaktionen eines Zyklus, Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Primer (*annealing*) und DNA-Polymerisation, laufen bei unterschiedlichen Temperaturen ab. Die Anzahl der entstehenden DNA-Moleküle wird in jedem durchlaufenen Zyklus verdoppelt. Eine typische PCR-Reaktion hat 20 - 30 Zyklen.

Die reverse Transkription von RNA in komplementäre DNA (cDNA) erlaubt die Untersuchung von Genexpressionen. Hierfür wurde der käufliche Kit OneStep RT-PCR (Qiagen, Hilden, D) genutzt. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Kit ermöglichte die Synthese der cDNA sowie die Durchführung der PCR in einem Ansatz. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Reaktionsprodukt gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 6.7.6).

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Um Kontaminationen der verwendeten Lösungen zu überprüfen, wird für jedes Primer-Paar ein Reaktionsansatz pipettiert, der keine Nukleinsäure enthält.

#### Benötigte Lösungen:

Alle benötigten Lösungen sind gebrauchsfertig. Über die Zusammensetzung macht der Hersteller keine näheren Angaben. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5 $\times$ PCR-Puffer	5 $\mu\text{l}$	
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 $\mu\text{l}$	0,4 mM
20 $\mu\text{M}$ 5' Primer	0,5 – 0,75 $\mu\text{l}$	0,4 – 0,6 $\mu\text{M}$
20 $\mu\text{M}$ 3' Primer	0,5 – 0,75 $\mu\text{l}$	0,4 – 0,6 $\mu\text{M}$
10 ng / $\mu\text{l}$ Template RNA	5 $\mu\text{l}$	2 ng / $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu\text{l}$	

Die Menge der eingesetzten Primer richtete sich danach, welches Gen amplifiziert werden sollte. Sie ist zusammen mit den Sequenzen im Kapitel **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** angegeben.

In Tabelle 3: wird beispielhaft ein PCR-Programm dargestellt.

**Tabelle 3: Beispiel für ein PCR-Programm.**

30 min. 50 °C	1 $\times$
15 min. 95 °C	1 $\times$
30 sec. 92 °C 30 sec. 50 °C 30 sec. 72 °C	25 $\times$ ; die Verringerung der Denaturierungstemperatur verlängert das Leben der DNA-Polymerase.
10 min. 72 °C	1 $\times$ ; mit diesem Schritt werden bereits begonnene DNA Stränge zu Ende synthetisiert.

Der erste Schritt diente der Synthese der cDNA. Der zweite Schritt inaktivierte die Reverse-Transkriptase. Das hier dargestellte Zyklusprofil ist nur ein Beispiel. Für jedes verwendete Primer-Paar wurden die Bedingungen optimiert, um eine größtmögliche Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion zu erreichen. Variiert wurden hierbei die *annealing*-Bedingungen (Temperatur oder Zeit) sowie die Anzahl der Zyklen.

Im Anschluß an die PCR wurden 10  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes mit Hilfe einer Agarose Gel Elektrophorese (siehe Kapitel 6.7.6) analysiert. Um die Fragmentlänge der

PCR-Amplifikate bestimmen zu können, wurden 125 ng  $\phi$ X/HaeIII DNA-Marker mit aufgegeben.

### 6.7.6 Agarose-Gel Elektrophorese

Agarose bildet eine poröse Matrix, die es erlaubt, große Nukleinsäure-Moleküle aufzutrennen. Dabei wandern Nukleinsäuren aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphatrückgrates in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Doppelsträngige DNA kann durch planare, aromatische Kationen wie Ethidiumbromid angefärbt werden. Dieses bindet an die DNA durch Interkalation, wodurch seine Fluoreszenz deutlich verstärkt wird. Auf die gleiche Weise können auch Einzelstrang-DNA und RNA nachgewiesen werden. Hierbei ist die Verstärkung der Fluoreszenz jedoch geringer.

#### Benötigte Lösungen:

##### *10× TBE:*

		Enkonzentration
Tris	108 g	89 mM
Borsäure	55 g	89 mM
0,5 M EDTA, pH 8,0	40 ml	2 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1.000 ml	

##### *DNA-Probenpuffer (10×):*

		Enkonzentration
Ficoll 400	2,5 ml	25 %
2,5 % Bromphenol Blau	200 $\mu$ l	0,72 mM
TBE Puffer (10×)	500 $\mu$ l	
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml	

Zu 1,5 g Agarose wurden werden 90 ml Wasser gegeben und durch Kochen in einer Mikrowelle bei 600 W in Lösung gebracht. Die Lösung wurde wieder auf 90 ml aufgefüllt und mit 10 ml TBE (10×) aufgefüllt. Nachdem die Temperatur der Lösung unter 80 °C gesunken war wurden 5  $\mu$ l der 10 mg/ml Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und bei einer Temperatur von unter 60 °C in einen vorbereiteten Schlitten gegossen. Nach dem Aushärten wurde der Kamm gezogen und der Schlitten horizontal in eine Elektrophoresekammer gehängt. Die Kammer wurde mit TBE gefüllt, so daß das Gel komplett bedeckt ist. Zu den Proben wird  $\frac{1}{9}$  des Volumens an DNA-Probenpuffer (10×) gegeben. Die Proben werden auf das Gel geladen und die Elektrophorese bei 100 V und 150 mA durchgeführt bis das Bromphenolblau  $\frac{2}{3}$  des Gels durchlaufen hat.

Anschließend wird das Gel auf einem UV-Durchlicht-Tisch mit einer CCD-Kamera fotografiert und digitalisiert.

### **6.7.7 Transfektion von humanen Melanomzellen mit dem schaltbaren Vektorsystem pTet-On**

Das schaltbare Vektorsystem pTet-On nutzt die von *E. coli* stammenden Tetracyclin-Resistenz-Gene aus. Das System wurde modifiziert, um in Säugetierzellen eingesetzt werden zu können (Hillen und Berens, 1994; Gossen *et al.*, 1995).

Um das System in Zellen nutzen zu können, müssen die drei Plasmide pTet-On, pTRE und pTK-Hyg in die Zellen eingebracht werden. Die Zellen werden zuerst mit pTet-On transfiziert, und eine stabile Zelllinie wird etabliert. pTet-On codiert für ein Protein, das in Anwesenheit von Doxycyclin die Genexpression des Zielgens, das sich auf pTRE befindet, ermöglicht. Die Effektivität der Schaltbarkeit läßt sich mit einem Luciferase-Vektor (pTRE-Luc) testen. Anschließend werden die beiden Plasmide pTRE und pTK-Hyg Ko-transfiziert. Dies ist notwendig, da pTRE keinen eigenen Selektionsmarker trägt. pTK-Hyg codiert für die Hygromycin B-Resistenz.

Die Zelllinie Bro/Tet-On (303AG7), wurde mir freundlicherweise von Dr. Jürgen Eberle zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um die Melanomzelllinie Bro, die stabil mit dem Plasmid pTet-On transfiziert ist.

Die Transfektion der beiden anderen Plasmide erfolgte mit dem Lipofektionskit Fugene 6 (Roche Diagnostics, Mannheim, D). Das nicht näher beschriebene lipophile Agens wurde zur Komplexierung von DNA eingesetzt und ermöglichte der DNA dadurch den Eintritt durch die Zellmembran. Gelangt die DNA während der Zellteilung in den Zellkern, kann eine transiente Genexpression stattfinden. Das Plasmid wird dabei weder vermehrt noch weitergegeben. Nach der Mitose kann die fremde DNA jedoch während der Reparaturprozesse durch ein Rekombinationsereignis in das Genom integrieren und so eine dauerhafte Veränderung des Wirtsgenoms hervorrufen, die weitervererbt wird.

Etwa 60 % konfluente 303AG7-Zellen wurden in 6-Loch-Schalen mit frischem Medium versetzt. Für je ein Loch wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 3 µl Fugene 6 Lösung in 97 µl serumfreiem DMEM gegeben und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden je 2 µg Plasmid (siehe Kapitel 6.7.3) vorgelegt und die vorbereitete Transfektionslösung hierauf getropft und durch sanftes Antippen gemischt. Zur Bildung des Lipofektionskomplexes wurde die Lösung weitere 15

Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Selektionsmedium versehen (siehe Kapitel 6.1.1).