

3 METHODEN

3.1 Bakterien-Techniken

3.1.1 Kultivierung von *E.coli* –Stämmen (Maniatis et al., 1989)

Suspensionskulturen von *E.coli* werden in LB-Medium kultiviert. Zur Selektion und Amplifikation transformierter Bakterien werden dem Medium die Antibiotika Ampicillin (100µg/ml Medium) beziehungsweise Kanamycin (30µg/ml Medium) zugesetzt, abhängig von den Resistenzgenen der verwendeten Vektoren. 100 ml LB-Medium werden mit 50 µl einer transformierten Bakterienkultur angeimpft. Bei der Kultivierung von pMOS-Bakterien wird zuvor eine 0,2 ml Vorkultur ohne Antibiotikum 1 Stunde bei 37°C herangezogen und anschließend den 100 ml Medium zugegeben. Das Wachstum erfolgt anaerob über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler.

Für Plattenkulturen werden LB- Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion mit jeweils 50µl Bakterienkultur angeimpft und die Bakterien mit einem Drigalski-Spatel auf deren Oberfläche verteilt.

3.1.2 Blue/White Screening

Mit Hilfe des Blue/White Screenings lassen sich die Klone unterscheiden, die mit einem Insert- tragenden Vektor transformiert wurden von denen, die nur den Vektor beinhalten.

Das Prinzip dieser Screening- Methode beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Das Substrat X-Gal wird in Anwesenheit des Induktors IPTG (Isopropylthiogalaktosid) durch das Enzym β -Galaktosidase zu einem blauen Produkt umgewandelt. Die Methode kann ausschließlich bei Bakterienstämmen, denen die β -Galaktosidase fehlt, angewandt werden, wie zum Beispiel dem pMOS Stamm. Des weiteren muss der Vektor für die β -Galaktosidase in Form eines *lacZ*- Gens kodieren. Ist ein Insert innerhalb des *lacZ*- Gens eingebaut, kann keine funktionelle β - Galaktosidase mehr

gebildet werden und die Bakterienkolonien bleiben ungefärbt. Wird ein Bakterium mit einem Vektor ohne Insert transformiert, findet die enzymatische Umwandlung statt und der Bakterienklon wächst zu einer blauen Kolonie heran.

Ein Blue/White Screening wird durchgeführt, indem jeweils 35µl X-Gal und 20µl IPTG auf der Agaroberfläche verteilt werden. Anschließend werden die Platten vor dem Auftragen der Bakterien inkubiert bis beide Substanzen vollständig in den Agar eindiffundiert sind.

3.2 DNA-Techniken

3.2.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

(Maniatis et al., 1989)

Durch eine Agarosegelelektrophorese werden doppelsträngige DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes aufgetrennt. Bei parallelem Einsatz eines DNA-Molekulargewichtsmarkers als Standard, kann die ungefähre Größe der einzelnen Fragmente bestimmt werden. Eine optimale Auftrennung der Fragmente erfolgt durch die Wahl der geeigneten Agarosekonzentration. In dieser Arbeit wurden kleine DNA-Fragmente von 100 bis 500 bp in 3% Agarosegelen und 500 bp bis 5 kb Fragmente in 1% Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarosegele enthalten den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Endkonz. 0,5 µg/ml). Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelstrang-Helix der DNA und ermöglicht so den visuellen Nachweis der DNA bei Bestrahlung des Agarosegels mit UV Licht. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und deren Molekulargewichtsbestimmung werden die DNA-Ansätze mit 20% (v/v) Blaumarker-Stammlösung (50% Glycerin (v/v); 50 mM EDTA; 0,25% Bromphenolblau (w/v)) versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die DNA-Fragmente werden bei einer angelegten Spannung von maximal 110 Volt in einer Kammer mit TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) detektiert und photographisch dokumentiert.

3.2.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur präparativen Aufarbeitung der DNA werden gelelektrophoretisch-aufgetrennte Fragmente unter langwelligem UV-Licht (366nm) aus einem Agarosegel ausgeschnitten um die Anzahl an UV-Licht-induzierten Doppelstrangbrüchen zu minimieren. Zur Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen kommen zwei verschiedene Methoden in Frage. Die Reisolierung ausgeschnittener DNA-Fragmente mit einer Größe größer 1 kb erfolgt nach der *Gene-clean*-Methode der Firma Dianova. Bei dieser Aufreinigung bindet die DNA an eine positiv geladenen Silikatmatrix. DNA-Fragmente mit einer Größe unter 1 kb werden mit Hilfe des *Nucleo-Spin*-Kits nach Angaben der Firma Macherey und Nagel reisoliert. Nach den Prinzipien der Ionenaustausch-Chromatographie bindet die DNA bei dieser Methode an positiv geladenen Säulen. Nach mehreren Waschschritten wird die gereinigte DNA durch Zugabe von 1x TE Puffer eluiert.

3.2.3 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) ermöglicht die gezielte *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer maximalen Größe von 12 kb. Die Vervielfältigung doppelsträngiger DNA verläuft exponentiell. Zu Beginn der Reaktion wird die eingesetzte doppelsträngige DNA-Matrize durch kurzzeitiges Erhitzen auf über 90°C in Einzelstränge denaturiert. Im anschließenden Anlagerungsschritt binden spezifische Oligonukleotide an ihre komplementären Sequenzen der „*Template*-DNA“. Die für diesen „*Annealing*-Schritt“ eingesetzte Temperatur ist von der Basenzusammensetzung und Größe der verwendeten Primer abhängig. Es werden jeweils zwei spezifische Primer benötigt, die das zu amplifizierende Fragment eingrenzen und zu je einem der Matrizenstränge komplementär sind. Wenn beide Primer gebunden haben, werden die beiden freien 3`Enden durch die Polymerase komplementär zu dem jeweiligen Matrizenstrang synthetisiert. Diese „*Elongation*“ wird bei einer für die

eingesetzte Polymerase optimalen Arbeitstemperatur durchgeführt. Alle für diese Technik verwendbaren Polymerasen stammen aus thermophilen Organismen und arbeiten bei Temperaturen zwischen 68°C und 73°C. Nach dem Elongationsschritt beginnt ein neuer Zyklus, der ebenfalls wieder aus Denaturierung, Annealing und Elongation besteht. Die exponentielle Vermehrung des spezifischen dsDNA-Amplifikates erfolgt bei durchschnittlich 30 Wiederholungen eines Zyklus. Die PCR wird im Peltier Thermal Cycler PTC 200 der Firma MJ Research durchgeführt. In eine PCR werden für einen 20 µl Ansatz 0,5 µg Template DNA, 0,1 U Taq DNA-Polymerase, 2 µl 10 Taq-Puffer, dNTP`s in einer Konzentration von jeweils 0,2 mM und die jeweiligen Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt. Zur präparativen DNA- Amplifikation werden Ansätze mit 100 µl Endvolumen verwendet.

3.2.4 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

(Maniatis et al., 1989)

Restriktionsendonukleasen (RE`s) sind Enzyme, die hochspezifisch Sequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und diese durch Spaltung der Phosphodiesterbindungen spalten. Die Nomenklatur der RE`s bezieht sich auf die prokaryotischen Organismen, aus denen sie isoliert wurden. Natürlicherweise schützen sie das Genom dieser Organismen vor Integration fremder DNA, indem sie artfremde Moleküle durch Zerschneiden zerstören. Die Erkennung von artfremder und eigener DNA erfolgt aufgrund unterschiedlicher Methylierungsmuster.

3.2.5 Phosphatasebehandlung von Vektoren

(Bolivar et al., 1977; Chaconas und van de Sande, 1980)

Eine Dephosphorylierung aufgeschnittener Vektorenden wird vorgenommen um die Religation von Vektoren zu verhindern, die dann aufgrund der fehlenden Phosphatgruppe nicht mehr in der Lage sind, sich zu

rezirkularisieren. Erst durch die Insertion eines DNA-Fragments mit 5`-Phosphatenden kann das Zuckerphosphatgerüst von Ligasen wieder geschlossen werden. Die Dephosphorylierung wird mit der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) nach den Angaben der Firma Boehringer vorgenommen. Die Vektoren werden durch eine Gelelektrophorese und anschließender *Gene-clean* Reisolierung aufgereinigt.

3.2.6 Ligation von DNA- Fragmenten

(Sgaramella et al., 1970; Dugaiczky et al., 1975)

Während einer Ligation wird die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente durch das Enzym Ligase katalysiert. In dieser Arbeit wurde hierzu die aus dem T4-Bakteriophagen stammende T4-Ligase (New England Biolabs) verwendet. Für die ATP-abhängige Reaktion werden äquimolare Mengen an dephosphoriliertem Vektor und dem zu inserierenden DNA-Fragment mit 100 U Enzym in 1x T4-Ligase-Puffer (New England Biolabs) eingesetzt und bei 4°C für mehrere Stunden inkubiert. Nach der Ligation werden Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert.

3.2.7 Analytische Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien

(Minipräparation nach Holmes und Quigley, 1981)

Die Minipräparation mit der „*Boiling-Präp*- Methode“ dient der Isolierung geringer Plasmid- DNA Mengen zur Analyse von Bakterienklonen im Zuge einer Klonierung. Nach Transformation von *E.coli* pMOS-Kulturen mit einem Ligationsansatz werden die Transformanten auf LB-Agarplatten mit passendem Antibiotikum selektioniert. Die weitere Amplifikation der einzelnen Klone erfolgt in je 1.5 ml LB- Medium plus Antibiotikum bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag werden die Bakterien zentrifugiert (5 min, 4000 rpm [Sigma 202MK]), die Pellets in je 200 µl STET-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM EDTA; 5% Triton-X 100 (v/v), 250 mM Sucrose) mit frisch zugegebenem Lysozym (Endkonzentration 50 µg/ml) resuspendiert und eine Minute gekocht.

Durch erneute Zentrifugation (15 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) werden die durch das Lysozym zerstörten Zellwände und die an die Zellmembranen anhaftende genomische DNA sowie die denaturierten Proteine pelletiert und anschließend mit einem sterilen Zahnstocher aus der Lösung entfernt. Die isolierte Plasmid- DNA kann anschließend durch die Zugabe von je 200 µl Isopropanol gefällt und durch erneute Zentrifugation (15 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) sedimentiert werden. Abschließend wird das DNA- Pellet getrocknet und in 40 µl TE- Puffer zuzüglich RNaseA (100 µg/ml) aufgenommen und die aufgereinigte klonale Plasmid- DNA durch Spaltung mit spezifischen Restriktionsenzymen geschnitten.

3.2.8 Präparative Isolierung von Plasmid- DNA aus Bakterien (Maxipräparation)

Maxipräparationen werden bei Volumen ab 100 ml Suspensionkultur vorgenommen. Sie dienen ausschließlich der präparativen Aufbereitung großer Plasmidmengen aus bereits charakterisierten Klonen. Die Maxipräparationen werden mit dem Plasmid- Isolationskit der Firma Macherey und Nagel nach deren Anweisung durchgeführt. Die Konzentration wird durch eine photometrische Messung bestimmt und die Plasmide bei 4°C aufbewahrt.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der Nukleinsäuren wird mittels photometrischer Messungen bestimmt. Das Prinzip eines Photometers beruht auf der Messung der Lichtabsorption durch eine sich im Strahlengang befindenden Substanz bei einer konstanten Wellenlänge. Nukleinsäuren besitzen bei 260 nm ein Absorptionsmaximum. Nach dem Lambert- Beerschen- Gesetz kann die Extinktion in die DNA- Konzentration umgerechnet werden. Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung kann die Reinheit einer DNA- Lösung am Photometer bestimmt werden. Hierzu wird der Quotient aus der optischen

Dichte bei 260 nm und der optischen Dichte bei 280 nm berechnet. Der Quotient reiner DNA sollte zwischen 1,65 und 1,85 liegen. Niedrigere Werte zeigen Verunreinigung durch Proteine an.

3.3 Protein-Techniken

3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten

3.3.1.1 *Zellaufschluss unter nativen Bedingungen*

Für GST- Pulldown Analysen müssen Proteine in ihrer gefalteten Tertiärstruktur vorliegen, um von passenden Antikörpern effektiv erkannt zu werden bzw. um Protein-Protein-Wechselwirkungen eingehen zu können. Um weitgehend native Proteinextrakte aus prokaryotischen Zellen zu gewinnen, werden pelletierte Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in Lysispuffer aufgenommen. Zur Gewinnung nativer Zellextrakte aus Bakterien werden pelletierte Bakterien in Lysispuffer (s.Kap.2.1) aufgenommen. Das Zellpellet wurde bei -70°C über Nacht eingefroren und die anschließende Zellyse erfolgte durch Beschallung mit Ultraschall (Sonikator, output- level 7, 20 s). Alle unlöslichen Faktoren werden abschließend mittels Zentrifugation (60min, 6000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) sedimentiert und die löslichen Proteine im Überstand können für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

3.3.1.2 *Zellaufschluss unter reduzierenden Bedingungen*

Zur Auftrennung von Protein in einer SDS-Page werden Zellpellets in 2x Probenpuffer aufgenommen, 10 sec beschallt und 10 min gekocht. Nach der anschließenden Zentrifugation (30 min, 12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) befinden sich die löslichen Proteine im Überstand. Die Proteine werden in 0,1% NaOH im Photometer bei 280 nm gemessen und nach der empirischen Formel $6,4/\text{OD}$ werden $15\ \mu\text{g}$ errechnet und diese auf einem Acrylamid-Gel aufgetrennt, soweit nicht anders vermerkt.

3.3.1.3 *Proteinsynthese durch in vitro Transkription und Translation*

Zur Synthese einzelner Proteine *in vitro*, d.h. außerhalb eines Zellsystems, wurde das gekoppelte Transkriptions/Translationssystem auf der Basis eines Kaninchen- Retikulozytenlysate von Promega nach den Angaben des Herstellers verwendet. Als *template*- DNA dienten in dieser Arbeit ausschließlich Derivate des pSG5-Plasmides mit einem T7- Promotorelement. Da die Proteine für GST- Pulldown Analysen radioaktiv markiert werden sollten, mussten zur Synthese radioaktive Aminosäuren (³⁵S-Methionin; ³⁵S-Cystein; MP Biomedicals) eingesetzt werden.

3.3.2 Techniken zum Nachweis von Proteinen

3.3.2.1 *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)*

(Laemmli, 1970; Maniatis et al., 1989)

Mit Hilfe einer SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine aufgrund ihres relativen Molekulargewichtes aufgetrennt. Das in dem Gel und dem Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) ermöglicht eine Auftrennung unabhängig von der Eigenladung der Proteine. Ein Polyacrylamidgel besteht aus Acrylamid (AA) und dem quervernetzenden N,N` Methylenbisacrylamid (BIS). Die Konzentration dieser beiden Bestandteile bestimmt die Porengröße des Gels und damit deren Auftrennungskapazität. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch Tetramethylethylendiamid (TEMED) katalysiert. Um eine optimale Auftrennung der einzelnen Proteine zu erreichen, wird eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Am Übergang zwischen dem grobmaschigen oberen Sammelgel („Uppergel“) und dem engporigen Trenngel („Bottomgel“), erfolgt eine Konzentration der Proteine. In dieser Arbeit wurden 7,5-15% Polyacrylamidgele verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt in SDS-Laufpuffer bei einer angelegten Stromstärke von 25 mA innerhalb von 2- 3 h. Die Bestimmung der relativen Proteinmasse erhält man durch den Vergleich der Laufstrecke der Proteine

mit dem Laufverhalten von parallel mitgeführten Markerproteinen mit bekannten Molekulargewichten.

Trenngele: 375 mM Tris-HCl pH8,8; 0,1% SDS; 0,235% TEMED; 0,05% APS; AA und BIS variierten abhängig vom erforderlichen Trennbereich

Sammelgele: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% TEMED; 0,03% APS; 4% AA; 0,12% BIS

3.3.2.2 *Westernblot*

(Towbin et al., 1979; Burnette, 1981)

Bei einem Westernblot werden die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine über kovalente Wechselwirkungen an eine Membran gebunden und mit spezifischen Antikörpern immunologisch detektiert. Im Folgenden wird die Methode am Beispiel des „tank-blot“ Verfahrens erklärt. Vor dem Proteintransfer wird die Polyvinylidendifluoridmembran (Fa. Millipore) in Methanol geleg. In einer Tank- Blot - Kammer werden die Proteine innerhalb einer Nacht bei 10 V von einem SDS-Gel auf die Membran transferiert. Anschließend wird die Markerspür von der restlichen Membran abgetrennt, in Amidoschwarzlösung (0,1% Amidoschwarz (w/v) in 25% Isopropanol (v/v) und 10% Eisessig (v/v)) gefärbt und in Entfärbelösung (10% Isopropanol (v/v), 10% Eisessig (v/v)) entfärbt. Zum Sichtbar machen der Proteinbanden und des aufgetragenen Markers muss die restliche Membran vor der weiteren Verwendung zuerst in Methanol, dann in Wasser inkubiert, und anschließend mit Blockinglösung (10% Magermilchpulver (v/w) in PBS) für 30 min inkubiert werden. Durch dieses Abblocken der freien Membranbereiche mit den Proteinen der Milch, können weniger Antikörper unspezifisch an die polare Membran binden. Im Anschluss wird die Membran mit einer Erstantikörperlösung über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am folgenden Tag werden die nicht gebundenen Antikörper durch mehrfaches Waschen in PBS-Puffer entfernt. Die Membran wird mit 10 ml einer entsprechenden Zweitantikörperlösung 1h bei 4°C erneut inkubiert und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Der Nachweis der

membrangebundenen Zweitantikörper erfolgte mit Hilfe der ECL- Reaktion. Die ECL- Reaktion (*Enhanced Chemiluminescens Reaction*) beruht auf der Detektion von Lichtstrahlen, die bei der enzymatischen Umwandlung des Substrates Luminol, in Anwesenheit von H_2O_2 , durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase freigesetzt werden. Die hierbei emittierte Strahlung wird auf einem Röntgenfilm nachgewiesen. Der ECL-Nachweis wurde mit dem *ECL-Western-Blotting* Kit der Firma GE Healthcare nach deren Angaben vorgenommen. Die Entwicklung der Röntgenfilme und deren Fixierung erfolgte ebenfalls nach Anweisung des Herstellers.

3.3.2.3 *Nachweis von Proteinen im SDS-Gel*

Proteine lassen sich durch den Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue anfärben. Zur Kontrolle der Expressionsinduktion von GST-Fusionsproteinen werden SDS-Gele in einer Stunde bei $55^\circ C$ in Coomassie- Färbelösung gefärbt. Anschließend wird der Gel- Hintergrund mit Hilfe von Entfärberlösung wieder entfärbt. Die gefärbten Gele werden mit Hitze unter Vakuum getrocknet und können so aufbewahrt und dokumentiert werden.

3.3.2.4 *Nachweis radioaktivmarkierter Proteine durch Autoradiographie*

Um ^{35}S -markierte Proteine in SDS-Gelen nachzuweisen, werden diese 30 min fixiert (50% Methanol (v/v), 10% Eisessig (v/v)), 3x in H_2O gewaschen, 1 Stunde in 1M Natriumsalicylatlösung inkubiert und anschließend mit Hitze unter Vakuum getrocknet und zur Belichtung eines Röntgenfilms eingesetzt.

3.3.3 Techniken zum Nachweis der subzellulären Proteinlokalisierung

3.3.3.1 *Detektion autofluoreszierender Proteine durch Fluoreszenz-mikroskopie*

Durch Autofluoreszenz kann nach spezifischer Anregung die Lokalisation eines fluoreszierenden, rekombinanten Fusionsproteins in einer Zelle bestimmt werden. Für diesen Assay müssen adhärente Zellen am Vortag 1:3 auf sterile Deckgläschen ausgesät werden. Die Transfektion der Zellen erfolgt am nächsten Tag mit Derivaten des pEGFP oder pDsRed Vektors bzw. mit den parental Vektoren, unter Verwendung des FuGENE6 Reagenz (s. Kap. 3.5.3.1). 24- 48 Stunden nach Transfektion werden die Zellen vorsichtig 2 x mit je 1 ml PBS-Puffer gespült und zum Fixieren mit 1 ml Paraformaldehyd (4% v/v in PBS) für 15 min bei 37 °C überschichtet. Das Paraformaldehyd wird durch Spülen mit PBS-Puffer entfernt und die Zellen werden abschließend in DAPI- Lösung (0,2 µg/ml in Methanol) 1 Minute lang gefärbt, 1x mit Methanol gespült und kopfüber auf einen Objektträger in Elvanol eingebettet. Die Auswertung erfolgt am Fluoreszenz- Mikroskop (s. Kap. 2.12).

3.3.3.2 *Anfärben von zellulärer DNA mit dem DAPI- Reagenz*

Das DAPI- Reagenz (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, Sigma) ist ein blau fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und daher ausnahmslos Zellkerne anfärbt. Durch den Vergleich der in der DAPI-Färbung sichtbaren Kerndimension mit den gefärbten Bereichen des fluoreszierenden Proteins (siehe Kap. 3.3.3.1) kann eine Aussage über eine Kern- oder eine Cytoplasmalokalisation der untersuchten Proteine getroffen werden.

3.3.4 Methoden zur Detektion und Analyse von Proteininteraktionen

3.3.4.1 GST-Pulldown Analysen

Mit Hilfe der GST-(Glutathion S-Transferase)-pulldownanalyse können Protein-Protein Interaktionen *in vitro* nachgewiesen werden. Bei dieser Methode wird eines der zu untersuchenden Proteine bakteriell als GST-Fusionsprotein exprimiert. Hierzu müssen *E.coli*-BL21DE3 Bakterien mit von pGEX- abgeleiteten Konstrukten transformiert und in 20 ml Übernachtskulturen in LB-Amp- Medium angezogen werden. Am nächsten Tag werden 110 ml frisches LB-Amp- Medium mit 2 ml der Übernachtskultur angeimpft, bis zu einer OD_{600} von zirka 0,4-0,6 kultiviert und anschließend die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (0,1mM) induziert und für weitere 4 Stunden kultiviert. Ein Teil der Bakterien wird in 2x Probenpuffer aufgenommen und die Proteininduktion nach Auftrennung der Extrakte in einem mit Comassielösung gefärbten Gel kontrolliert. Der andere Teil wird in Lysispuffer aufgenommen, über Nacht bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ lysiert und anschließend 60 min zentrifugiert (12000 rpm [Sigma 202MK], 4°C). Der Überstand wird aliquotiert und eingefroren. Das native Zellysate wird jeweils frisch aufgetaut, und je 250 μl des Zellysates mit je 100 μl Glutathion- Sepharose (1:2 in PBS, Roche) versetzt und für 4 Stunden bei 4°C auf einem Überkopf- Rotator inkubiert. Das GST- Fusionsprodukt wird hierbei durch die Bindung des GST-Anteils an die Glutathion-S- Sepharose -Matrix immobilisiert und kann anschließend durch 5-maliges Waschen mit je 500 μl GST- Kopplungspuffer (1 min, 4000 rpm [Sigma 202MK], 4°C) aufgereinigt werden. Nach Zugabe von 15 μl eines *in vitro* transkribierten/translatierten radioaktivmarkierten Proteins (s. Kap. 3.4.1.3) können beide Proteine über Nacht komplexieren. Am nächsten Tag wird die Glutathion- Sepharose erneut 6 mal mit 500 μl GST- Kopplungspuffer gewaschen (1 min, 4000 rpm, [Sigma 202MK]). Nachdem der Puffer vollständig entfernt ist, müssen 20 μl 2x Probenpuffer zugeben werden, um die Proteine durch 10-minütiges Kochen von der Sepharose- Matrix zu lösen. Nach kurzer hochtouriger Zentrifugation können die Proteine im Überstand abgenommen, in einer SDS-Page (3.4.2.1)

aufgetrennt und kopräzipitierte *in vitro* synthetisierten Proteine mittels Autoradiographie (3.4.2.4) nachgewiesen werden.

3.3.4.2 Ko-Immunopräzipitation

2×10^7 293 T-Zellen wurden in 10 cm-Durchmesser Schalen ausgesät. Pro Ansatz wurden je 2 Schalen verwendet. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Konstrukten mit Nanofectin (PAA) transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden Proteinextrakte aus den Zellen hergestellt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 500 μ l AB-Puffer (Tris HCL pH 7,4 0,02M; NaCl 0,15M; EDTA 0,001M; Np40 0,5%; DOC 0,5%; SDS 0,5%; H₂O) aufgenommen. Die Extrakte wurden mit Ultraschall 30 Sekunden auf Eis lysiert und anschließend eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden die Extrakte 10 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge) und der Überstand mit 30 μ l Anti-BEC-1 Serum (oder 5 μ l Anti-Flag-Antikörper eine Stunde auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde Protein-G-Sepharose mit PBS gewaschen. Pro Ansatz wurden 40 μ l Protein-G-Sepharose (GE Healthcare) zugegeben und 2h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert.

Nach einem fünfmaligen Waschschritten mit AB-Puffer wurden die Protein G-Sepharose Beads mit 20 μ l 2x Probenpuffer versetzt, um die Proteine durch 10-minütiges Kochen von der Sepharose- Matrix zu lösen. Nach kurzer hochtouriger Zentrifugation können die Proteine im Überstand abgenommen, in einer SDS-Page (3.3.2.1) aufgetrennt und kopräzipitierte Proteine mit Hilfe eines Western Blots (3.4.2.2) nachgewiesen werden.

3.3.4.3 Kolokalisationsassay

Die unter 3.4.3.1 und 3.4.3.2 beschriebenen Methoden zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation von Proteinen kann ebenso zum Nachweis von Protein-Protein- Kolokalisationen *in vivo* verwendet werden. Hierzu können beide zu testende Proteine rekombinant als Fusionsprodukte mit unterschiedlich fluoreszierenden Fluorochromen in der Zelle vorliegen und mittels ihrer Autofluoreszenz detektiert werden. Der Nachweis der

Kolokalisation erfolgt nach separater Dokumentation beider Proteine durch digitale Überlagerung der aufgenommenen Bilder. Übereinander liegende Signale werden durch die entsprechenden Bildbearbeitungssysteme als gelbe Bereiche dargestellt und können als Kolokalisationsorte der untersuchten Proteine gedeutet werden.

3.4 Zellkultur-Techniken

3.4.1 Kultivierung und Lagerung von Säugerzelllinien

Die Inkubation von Zellkulturen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre. Adhärente Zellen können durch Behandlung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst werden. Zur Passagierung werden Anteile der Suspension der abgelösten adhären Zellen bzw. von Suspensionszellen in das entsprechende frische Kulturmedium (s. Kap. 2.7) überführt.

3.4.2 Zellwachstums -Assay

Das Zellwachstum wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem „Cell Proliferation Kit I“ (MTT-Assay) der Firma Roche ermittelt. Hierbei nehmen lebende Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um. Für die photometrische Messung werden die Zellen lysiert, um den Farbstoff freizusetzen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen. 3×10^5 COS-1 Zellen auf 96 Loch Platten in 100 µl Medium ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie mit den Konstrukten pSG5-BEC-1 und pSG5-BEC2600Flag transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert (37°C, 5%CO₂) und daraufhin mit 10µl „MTT labeling“ Reagenz (0,5mg/ml) versetzt. Nach einer weiteren 4 stündigen Inkubation (37°C, 5%CO₂) wurden zu den Zellen 100µl Solubilisierungslösung (im Kit enthalten) zugegeben. Nach weiteren 24

Stunden bei 37°C, 5%CO₂ werden die Zellen im Microelisa ® Auto Reader der Firma Dynatech bei einer Wellenlänge von 500 nm - 600 nm gemessen.

3.4.3 Herstellung von PBMCs und Makrophagen

Buffycoats wurden, nachdem sie mit 15 ml PBS gemischt wurden, in 50 ml Falcons auf 15 ml Ficoll-PlaqueTM-Plus (GE Healthcare) geschichtet. Die Vollblut-Ficoll-Proben wurden dann bei 1800 rpm (ohne Bremse) für 25 Minuten zentrifugiert. Mit einer 5 ml Pipette wurde die graue Lymphozytenbande an der Phasengrenze abpipettiert. Diese wurde in ein frisches steriles Falcon überführt und mit Medium (DMEM ohne Zusätze) gemischt. Die Probe wurde zentrifugiert bei 1000 RPM für 10 Minuten (mit Bremse). Der Überstand wurde abgezogen und der Waschschrift 1-2x wiederholt. Das Pellet (PBMCs) wurde in 10 ml Medium (RPMI+20%FKS+5%AB-Serum+1xPenicilin/Streptomycin) aufgenommen und in eine 75 cm² Costar-Flasche überführt. Die Zellen wurden 2h bei 37°C und 5% CO₂ wachsen gelassen. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen 2-3x mit PBS (ohne Mg/Ca) gespült. Zu den erhaltenen Monozyten wurde 40 ml Medium gegeben und diese für 6 Tage inkubiert.

3.5 Transformation von Zellen

3.5.1 Transformation von Bakterienzellen

(Kushner et al., 1978; Lederberg und Cohen, 1974)

Zur Transformation von Zellen werden sogenannte kompetente Bakterien eingesetzt. Kompetente Bakterien besitzen eine erhöhte Fähigkeit Fremd-DNA während einer Transformation aufzunehmen. Zu ihrer Herstellung werden 30 ml SOB-Medium (20 g/l Trypton; 5 g/l Yeast-Extract; 0,6 g/l NaCl; 0,5 g/l KCl; zuzüglich 10 ml einer 2M Mg²⁺-Stammlösung (203,3 g/l MgCl₂ x 6 H₂O; 246,5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O) frisch zugegeben), mit dem jeweiligen Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen werden 8 ml entnommen und in 200 ml frisches SOB-Medium überführt. Die weitere Kultivierung erfolgt bis zu einer optischen Dichte von zirka 0.3 bei einer Wellenlänge von 550 nm. Danach kann die Kultur auf 4

Aliquotes à 50 ml aufgeteilt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 rpm [Heraeus, Megafuge1.0] abzentrifugiert werden. Die pelletierten Bakterien werden in je 16 ml Transformationspuffer 1 (0,1 M RbCl; 0,05 M MnCl₂ x 4 H₂O; 0,03 M CH₃COOK pH 7,5; 0.01 M CaCl₂ x 2 H₂O; 15% Glycerol (v/v)) resuspendiert, erneut 15 min auf Eis gestellt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend werden die Bakterienpellets in je 4 ml Transformationspuffer 2 (0,5 M MOPS pH 6,8; 0.01 M RbCl; 0,075 M CaCl₂ x 2 H₂O; 15% Glycerol (v/v)) aufgenommen, à 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Stämme erfolgt bei -70°C. Zur Transformation werden 50 µl eines solchen Stammes auf Eis aufgetaut und mit 1-10 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit lagert sich die negativ geladene DNA spontan an die Bakterienwände an. Durch einen Hitzeschock bei 42°C von 70 s wird die Zellmembran der Bakterien kurzzeitig permeabel und die DNA gelangte ins Innere der Zellen. Vor der Kultivierung in LB-Medium zuzüglich des entsprechenden Selektionsmarkers werden die Zellen wenige Minuten zur Regeneration auf Eis gestellt.

3.5.2 Transfektion von Säugerzellen

3.5.2.1 *Transfektion mit Nanofectin*

Das Transfektionsreagenz NanofectinI (PAA) wurde eingesetzt zur Untersuchung von transfizierten 293T Zellen im Luziferase Assay. Dazu wurden 3×10^5 293T Zellen 16 Stunden vor Transfektion in 24-Loch Schalen ausgesät. Anschließend wurden Reporter und Effector Plasmid in einem 1:4 Verhältnis und 100 ng EGFP, zur Bestimmung der Transfektionseffizienz im FACS, mit 50ml 150mM NaCl versetzt und zu 3,2µl NanofectinI in 50µl 150mM NaCl gegeben. Das Gemisch wurde bei RT für 15-20 Minuten inkubiert und dann zu den Zellen gegeben.

3.6 Kalium Kanal Funktionsanalyse

3.6.1 FluxOr Thallium Detektion Kit der Firma Invitrogen (Katalognummer: F10016, F10017)

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen zur Funktionalität des BEC-1 Kalium Kanals mit Hilfe des FluxOr Thallium Detection Kits der Firma Invitrogen gemacht. Der Test nutzt den Vorteil, dass Kalium Kanäle genauso durchlässig für Thallium sind wie für Kalium. Dabei wurden die mit BEC-1 transfizierten Zellen mit einem Indikatorfarbstoff geladen. Dieser Farbstoff reagiert nach der Aktivierung des Kanals mit Kalium mit dem einströmenden Thallium und es erfolgt eine Fluoreszenzfreisetzung. Diese Fluoreszenz kann im Microelisa[®] Auto Reader der Firma Dynatech bei 490 nm gemessen werden und dient als Indikator für die Funktionalität des Kanals. 2×10^7 Cos-1 Zellen wurden in 10 cm-Durchmesser Schalen ausgesät. 24h später wurden die Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Als Kontroll Kanal wurde im Kit ein hERG Kalium Kanal (Synonyme: Spannungsabhängiger Kalium Kanal der Subfamilie H; Spannungsabhängiger Kalium Kanal der Subfamilie Kv11.1) mitgeliefert, der mit Hilfe eines Baculo-Systems in die Zelle gelangt und dann dort exprimiert wird (Abb. 3.1). Dieser Kalium Kanal repolarisiert Herzmuskeln nach dem Aktionspotential (Sanguinetti und Tristani-Firouzi, 2006). Eine Blockade der hERG-Aktivität *in vivo* führt zu einer Herz-Arrhythmie. Das hERG-Screening und verschiedene Tests mit diesem Kanal sind die Grundlage für alle neuen Medikamente in der präklinischen Entwicklung. 48h nach der Transfektion der Zellen mit den Konstrukten wurden die Zellen in eine 96 Lochplatte überführt. Pro Loch wurden 20.000 Zellen ausgesät. Zunächst werden die Zellen mit einem Fluoreszenz-Farbstoff beladen, der als Acetomethylester zugesetzt wird. In dieser Form kann der Farbstoff durch die Lipidschicht der Zelle aufgenommen werden. Innerhalb der Zelle wird der Farbstoff durch eine intrazelluläre Esterase in eine aktive Form überführt, die so Thallium-Ionen binden kann. Wird nun den Zellen Thallium angeboten und zusätzlich ein Stimulus, der Kaliumkanäle aktivieren kann, wird der Kanal geöffnet und Thallium-Ionen können in die Zelle einströmen. Die Bindung der Thallium-Ionen an den Farbstoff führt zu einer Fluoreszenz-Emission. Durch Messung der Emission kann der Transport von

Thallium-Ionen in die Zelle und somit die Aktivität des Kaliumkanals optisch verfolgt werden.

Nach drei Stunden wurden die Zellen mit dem FluxOr Farbstoff geladen (Loading Buffer (im Kit enthalten) und erneut eineinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dem Beladen der Zellen mit dem Farbstoff wurde ein Assay-Puffer (im Kit enthalten) auf die Zellen gegeben. Durch die Zugabe eines Stimulus-Puffers (im Kit enthalten) wurden die Kalium-Kanäle aktiviert und die abgestrahlte Fluoreszenz konnte gemessen werden. Dabei gilt das Prinzip je höher die Absorption desto besser die Leitfähigkeit des Kanals.

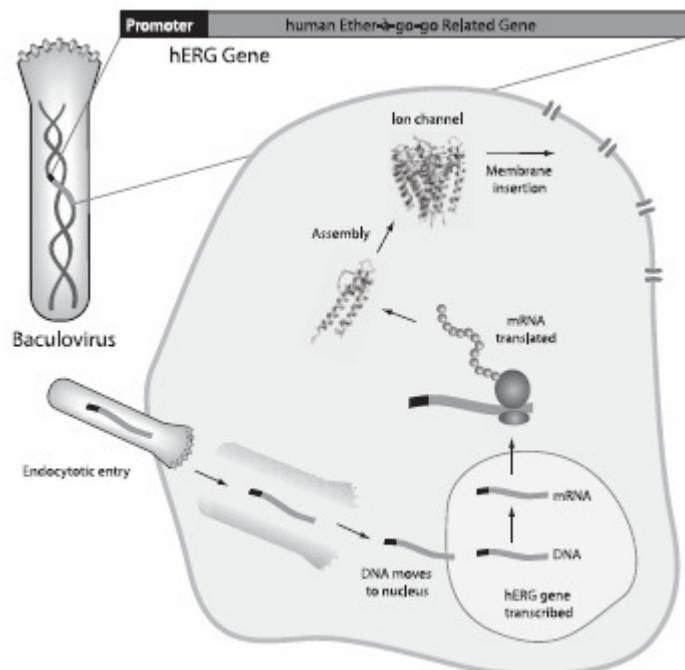


Abb. 3.1 Mechanismus des BacMam-vermittelten Gentransports in die Zelle

Das hERG Gen befindet sich innerhalb der Baculoviralen DNA, downstream eines CMV Promotors, welcher die Genexpression voran treibt wenn er in der Säugerzelle eingeführt ist. Die BacMam Partikel werden über endozytotische Pathways aufgenommen, und die DNA in den viralen Partikeln wird für die Transkription und Expression freigesetzt. Das translatierte Protein wird dann für die Insertion in die Membran gefaltet und bildet dort die funktionalen hERG Kanäle. Dieser Prozess beginnt 4-6 Stunden nach der Transduktion und wird über Nacht abgeschlossen. Die Proteine sind 72-120 Stunden stabil.

3.7 HIV-1 Partikel-Release Assay

293T Zellen wurden in 10 cm-Durchmesser Schalen ausgesät und transfiziert mit den Konstrukten pSG5-BEC und pSG5-BEC2600Flag (8µg DNA/Platte). Am folgenden Tag wurden die Zellen erneut mit 4µg DNA der Plasmide pTN7-Stopp und pENV035x. pTN7-Stopp ist ein HIV-1 NL4-3 basierender viraler Vektor, welches ein *Renilla Luziferase* Reporter gen anstelle des *nef* Gens trägt und kein funktionelles *env* Gen besitzt, damit nur eine „single-round“ Infektion stattfindet (Neumann et al., 2005). pENV035x trägt ein CCR5-tropes HIV *env* Gen. Die Kotransfektion der beiden Plasmide resultiert in der Freisetzung von pseudo-typisierten HIV-1 Partikeln. Die Virus-enthaltenden Überstände wurden 48h nach der Transfektion geerntet, filtriert durch 0,45µm Cellulose-Acetat Filter (Schleicher&Schuell), und in 1ml Aliquots bei -80°C gelagert. Um die Transfektionseffizienz von pTN7-Stopp in 293T Zellen zu überprüfen, wurde die *Renilla Luziferase* Aktivität mit Hilfe eines Luziferase Reaktions Kits (Promega) in den 293T Zelllysaten 48h nach der Transfektion gemessen.

Die HIV-1 Partikel in den Überständen wurden mit Hilfe eines Standard p24-ELISA-Kits (BioRad) quantifiziert. Zusätzlich wurde die *Renilla Luziferase* Aktivität in PM1 Zellen, die mit den HIV-1 pseudo-typisierten Partikeln enthaltenden Überständen infiziert wurden, gemessen. Dazu wurden die PM1 Zellen (ein T-Zell-Subklon der HuT78 Zelllinie, welche CD4 exprimiert und beide, CCR5 und CXCR4 Korezeptoren) in 96-Lochplatten ausgesät (10^5 Zellen/Loch). Jeweils drei Ansätze wurden durch Zugabe von 100µl der Überstände infiziert. 48h nach der Infektion, wurden die *Renilla Luziferase* Aktivität in den PM1 Zellen gemessen. Die p24 Level und die relativen Luziferase Aktivität der infizierten PM1 Zellen wurde mit der Transfektionseffizienz des pTN7-Stopp in 293T Zellen während der HIV-1 Pseudotypenherstellung, normalisiert.