

3. Methoden

3.1 Zelluläre Methoden

Sämtliche zellulären Arbeiten wurden in einer Sterilbank durchgeführt.

3.1.1 Herstellung von Milzzellsuspensionen

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und auf die rechte Körperseite gelegt. Die linke Körperseite wurde vor der Eröffnung mit 70%igem Ethanol befeuchtet. Nach Öffnung der linken, lateralen Bauchdecke wurde die Milz, welche sich dorsal vom Magen befindet, steril entnommen, weitgehend von Fett- und Geweberesten befreit und in eisgekühltem BSS aufbewahrt. Anschließend wurden die Milzen in einem sterilen Einmalsieb zerrieben, die Zellen durch wiederholtes Spülen mit BSS in ein 50ml Röhrchen überführt und 10 min auf Eis gehalten, damit größere Gewebetrümmer niedersinken. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, zentrifugiert und das Sediment mit BSS gewaschen. Dazu wurde das Röhrchen mit BSS aufgefüllt und 10 min bei 1200 Upm (165xg) zentrifugiert. Aus dem Zellsediment wurden anschließend die B-Lymphozyten isoliert.

3.1.2 Isolation und Reinigung ruhender B-Lymphozyten

3.1.2.1 Isolation von B-Lymphozyten aus Milzzellsuspensionen

T-Lymphozyten wurden durch Inkubation der Milzzellen mit monoklonalen Antikörpern gegen T-Zell-Epitope und anschließender Komplement-Lyse vollständig entfernt. Dazu wurden die sedimentierten Milzzellen (vgl. 3.1.1) in BSS (3,5ml/Milz) resuspendiert, welches die Antikörper Klon-C, 13-4, anti-CD4 und anti-CD8 aus Hybridomüberständen in einer für den jeweiligen Antikörper zuvor ermittelten Optimalkonzentration enthielt. Nach der 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit BSS gewaschen, in Meerschweinchenserum (1:20 in BSS) als Komplementquelle aufgenommen und 45 min bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut mit BSS gewaschen.

3.1.2.2 Anreicherung ruhender B-Lymphozyten durch Percollgradienten¹

Diese Methode basiert auf der unterschiedlichen Dichte von ruhenden und aktivierten B-Zellen. Ruhende B-Zellen sind vergleichsweise kleiner und kompakter - daher dichter - als aktivierte B-Zellen und können mittels einer Percoll-Dichtegradientenzentrifugation voneinander getrennt werden.

Hierfür wurden die gewaschenen Zellen nach der Komplement-Behandlung in 10 ml BSS aufgenommen, in Gradientenröhrchen überführt und nochmals abzentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Zellsediment in 2ml 80 % (v/v in 0,9 % NaCl) Percoll resuspendiert und vorsichtig mit jeweils 2ml der weiteren Percollstufen (70 %, 65 %, 60 %, 50 % v/v in 0,9 % NaCl) sowie abschließend 2ml BSS überschichtet. Nach erfolgter Zentrifugation (20 min, 4 °C, 2000 Upm (400xg), ohne Bremse) wurden die Zellen der Interphasen 70/65 % Percoll sowie 65/60 % Percoll abgenommen und zweimal mit BSS gewaschen, um Percollreste zu entfernen. Ein Percollgradient wurde maximal mit den Zellen aus vier Milzen beladen. Die Reinheit des Präparats wurde mit $1,5-3 \times 10^5$ Zellen im FACScan (vgl. 3.1.9.1) durch Färbungen entweder gegen B220, $\alpha\beta$ TCR und CD4 oder gegen B220 und CD3 kontrolliert und war >92 %, wobei die restlichen Zellen keine T-Zellen waren.

3.1.3 **Ermittlung der Zellzahl**

Zur Ermittlung der Anzahl gewonnener Zellen wurden diese in einer Neubauer-Kammer gezählt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einer Trypanblau-Arbeitslösung (Stammlösung 1:5 in PBS verdünnt) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Das Trypanblau wird von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht es somit, diese von lebenden Zellen zu unterscheiden. 30 μ l der Zellverdünnung wurden anschließend unter das Deckgläschen einer Neubauer-Zählkammer pipettiert und die lebenden Zellen in 2-3 Quadranten gezählt. Die Zellzahl wurde gemäß (Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant) x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellzahl/ml berechnet.

¹ DeFranco et al., 1982. *J. Exp. Med.* 155:1523

3.1.4 Stimulation ruhender B-Lymphozyten in vitro

Gereinigte, ruhende B-Lymphozyten wurden 10 min bei 1200 Upm (165g) abzentrifugiert, in RPMI⁺ aufgenommen und auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Es wurde dann mit dem BZR-quervernetzenden $\alpha\mu\text{F}(\text{ab}')_2$ -Fragment oder mit einem gegen CD40 gerichteten Antikörper (FGK 45.5) bzw. verschiedenen Kombinationen derselben stimuliert. Die Stimulantien wurden in Konzentrationen von 1 bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt.

3.1.5 Kultivierung von B-Lymphozyten

In vitro stimulierte B-Lymphozyten wurden in einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen pro ml in sterilen 6, 12, 24, oder 96-Napfplatten bzw. 5 ml Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und täglich mikroskopisch kontrolliert. Zu den gewünschten, im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten, wurde jeweils ein Teil der Zellen geerntet.

3.1.6 Stimulation von WEHI 231 Zellen

Es wurde mit dem BZR-quervernetzenden $\alpha\mu\text{F}(\text{ab}')_2$ -Fragment oder mit einem gegen CD40 gerichteten Antikörper (3/23 oder FGK 45.5; Diese waren im WEHI System austauschbar und zeigten keinerlei Unterschiede in Bezug auf ihre Wirkung.) bzw. verschiedenen Kombinationen derselben stimuliert. Die Stimulantien wurden in Konzentrationen von 1 bis 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kultur eingesetzt. Die Zelldichte zu Beginn der Stimulation lag bei $0,5 \times 10^5$ bis 1×10^5 Zellen/ml.

3.1.7 Kultivierung der Zelllinien

WEHI 231 Zellen (s.o.) wurden in jeweils 5 ml RPMI⁺ in 50ml Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und alle zwei bis drei Tage 1:10 verdünnt (Zelldichten bewegten sich zwischen 5×10^4 und 6×10^5 Zellen/ml). Dem Medium infizierter, EGFP bzw. EYFP exprimierender Zellen wurde zu Beginn der Kultur G418 (1 mg/ml) bzw. Zeocin (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt. Diese Antibiotika wurden nach erfolgreicher

Selektion abgesetzt (mit fortlaufender Kultur ausverdünnt). Zum Erhalt größerer Zellzahlen wurden die Zellen in RPMI⁺ in 50 ml oder 250 ml Kulturflaschen ausgesät und bis zum Erreichen der erforderlichen Zelldichte im Brutschrank kultiviert.

293T-Zellen wurden in 25 ml Petrischalen in Kulturmedium (Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit Glutamax-1 (GibcoBRL) sowie 10 % FCS und Antibiotika) gehalten und alle drei bis vier Tage mit ATV von der Platte abgelöst und 1:10-1:20 verdünnt.

3.1.8 Transfektion/Infektion

Rekombinante, replikationsdefekte retrovirale Partikel wurden unter Benutzung des pHIT Verpackungssystems wie von Soneoka et al. hergestellt [118].

293T Zellen wurden in Transfektionsmedium (DMEM mit Pyridoxin (GibcoBRL) sowie 10 % FCS und Antibiotika) transient mit dem Expressionskonstrukt für Gag/Pol (pHIT60) und Env (pHIT123) des Murinen Leukämie Virus (MuLV) kotransfiziert. Die Kotransfektion wurde zusammen mit dem entweder leeren Vektorplasmid oder dem Vektor mit der jeweiligen für das angegebene Protein kodierenden cDNA durchgeführt. Es wurde die Standard Calciumphosphat Methode verwendet². Nach 16 h wurde die Transfektionslösung durch DMEM ersetzt. Die viralen Überstände wurden 24 und 48 Stunden später abgenommen und filtriert (0,45 µm). Zum Filtrat wurde Polybrene (Sigma) zugegeben (Endkonzentration: ≤ 10 µg/ml).

5x10⁵-3x10⁶ WEHI 231 Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden für 3 h mit 1-2 ml des infektiösen Überstandes inkubiert, mit RPMI⁺ gewaschen und wieder in Kultur genommen. Um hohe Infektionsraten zu erzielen, wurden die Zellen während der Inkubation mit dem infektiösem Überstand zentrifugiert (3-4 h bei 32 °C mit 1000 x g). Die Identifizierung EGFP bzw. EYFP-exprimierender, d.h. erfolgreich infizierter Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

3.1.8.1 Anreicherung erfolgreich infizierter Zellen

Eine Anreicherung von erfolgreich infizierten Zellen wurde wahlweise durch Sortierung oder Antibiotika-Selektion erreicht. Die Sortierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie

² Vgl. Ausubel et al. (Eds.) "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons, Inc.

(siehe 3.1.9), basierend auf der Fluoreszenz des transduzierten Markerproteins. Im Falle der Antibiotika-Selektion wurde dem Medium ein der jeweils transduzierten Resistenz entsprechendes Antibiotikum in geeigneter Konzentration zugegeben. (G418: 1mg/ml bzw. Zeocin: 250µg/ml). Die Zellen wurden in Anwesenheit des Antibiotikums für 2-7 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Zellkultur normal fortgesetzt, was eine allmähliche Ausverdünnung des Antibiotikums zur Folge hatte.

3.1.9 Analyse der Zellproliferation

3.1.9.1 Proliferationstest

Beim Proliferationstest wird die Menge des Tritium (^3H)-markierten, in die zelluläre DNA eingebauten Thymidins bestimmt und dient als Maß für die Zellproliferation, da die ^3H -Thymidin-Einbaurate proportional zur DNA-Synthese und damit zur Proliferationsaktivität ist. Allerdings sind Aussagen auf Einzelzellniveau hierbei nicht möglich.

Lösungen: ^3H -Thymidin: 10µCi/ml in RPMI⁺ (1mCi/ml Stammlösung (spez. Aktivität 6,7 Ci/mmol))

$1-2 \times 10^5$ stimulierte primäre B-Zellen bzw. $1-2 \times 10^4$ WEHI 231 Zellen in 100-200 µl RPMI⁺ wurden in Triplets in 96-Napf-Flachbodenplatten bis zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Stimulantien kultiviert. Hierzu wurde zu Beginn jeweils die Hälfte des Endvolumens mit der doppelten Konzentration an Zellen einerseits und der doppelten Konzentration des entsprechenden Stimulans andererseits vereinigt. Es folgte die Zugabe von 50µl der ^3H -Thymidinlösung zu den Zellen wonach die Kulturen für weitere 6 Stunden im Brutschrank gehalten wurden.

Die Zellen wurden dann mittels eines Zellerntegerätes (Beta-Plate-Harvester, Pharmacia) mit Wasser aus der 96-Napf-Flachbodenplatte gesaugt und deren radioaktiv markierte, genomische DNA auf einen Glasfaserfilter aufgebracht. Nicht in die DNA eingebautes ^3H -Thymidin wurde ausgewaschen. Der Filter wurde dann bei 37°C getrocknet, zusammen mit ca. 10ml Szintillationsflüssigkeit in Plastikfolie eingeschweißt und in einem Beta-Counter ausgewertet, wobei jeder Wert 60 Sekunden lang gezählt wurde.

3.1.10 Luciferase Assay und Chemilumineszenz Assay

Hier wird die Aktivität eines Transkriptionsfaktors in Zellen mithilfe eines Luciferasereportergens bestimmt, dessen Expression von diesem Faktor – hier NFκB - abhängig ist. Als Maß für die Aktivität des Transkriptionsfaktors dient die Luciferaseaktivität in Extrakten aus diesen Zellen.

Lösungen: Lysepuffer: 50 mM Tris/MES
1 mM DTT
0,1 % Triton X-100

Assaypuffer: 125 mM Tris/MES
25 mM Magnesiumacetat
5 mM ATP

Meßlösung: 250 µM Luciferin in 5 mM KH₂PO₄ aq, pH=7,8

Stabil mit einer NFκB-abhängigen Luciferase transduzierte WEHI 231 Zellen in einer Konzentration von 2×10^4 bis 2×10^5 in 100 µl RPMI⁺ wurden in Dupletts auf 96-Napf-Rundbodenplatten pipettiert und über Nacht in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Stimulantien kultiviert. Die Platten wurden dann für 2 min bei 2000 U/min zentrifugiert und der Medienüberstand verworfen. Die Zellpellets wurden dann mit je 100µl PBS gewaschen und wieder wie angegeben zentrifugiert. Das PBS wurde vollständig verworfen und die Zellpellets durch leichtes seitliches Klopfen der Platte gelockert. Die Zellen wurden dann mit jeweils 75 µl Lysepuffer versetzt und für 5 min bei Zimmertemperatur geschüttelt und anschließend 5 min lang bei 2500 U/min zentrifugiert. Jeweils 50 µl vom Überstand wurden in einer 96-Napf-Testplatte mit 50 µl vorgelegtem Assaypuffer vereinigt und in einem Luminometer (Microlumat, EG&G Berthold) mit 100 µl einer luciferinhaltigen Meßlösung versetzt und die Luciferaseaktivität in den Proben bestimmt.

Um sicherzustellen, dass ein Rückgang der NFκB-Aktivität nicht auf eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Zellen zurückzuführen ist, wurden die Luciferase exprimierenden Zellen stabil mit SEAP (Secreted form of human placental alkaline phosphatase), der sezernierbaren Form einer alkalinen Phosphatase kotransduziert.

Die Expression des SEAP Gens stand unter der Kontrolle des wildtypischen MuLV LTR und war somit unabhängig von der NF κ B-Aktivität. Für SEAP ist gezeigt, dass Konzentrationsänderungen im Mediumüberstand direkt proportional zu Änderungen der intrazellulären Gen- und Proteinexpression in den transduzierten Zellen sind [119, 120].

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben behandelt und die Luciferaseaktivität ermittelt. Parallel dazu wurde die Phosphataseaktivität im Mediumüberstand mithilfe eines Kits (Great EscAPETM SEAP Kit von Clontech) bestimmt. Es wurde hierbei nach den Angaben des Herstellers verfahren, die eingesetzten Lösungen jedoch im Verhältnis 1:4 verdünnt und die Ansätze um den Faktor acht verkleinert. Die Lumineszenzmessung wurde ebenfalls in einem Luminometer durchgeführt.

3.1.11 Durchflusszytometrie

Zellen, die eine Farbfluoreszenz aufweisen, können mit Durchflusszytometrie untersucht werden. Die Fluoreszenz kann hierbei entweder von einer vorher durchgeführten Färbung herrühren oder durch die Expression eines Fluoreszenzproteins, das durch Transfektion/Infektion in die Zelle eingeführt wurde, verursacht sein. Färbungen können sowohl intrazellulär sein, wie z.B. bei der Detektion von DNA durch Propidiumiodid (PI, s.u.) als auch extrazelluläre Strukturen betreffen. Im letzteren Fall kann z.B. die Expression von Zelloberflächen-Molekülen durch die Verwendung spezifischer Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert sind, auf Einzelzellniveau untersucht werden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laserstrahl im „Fluorescence Activated Cell Scan“ (FACScan, Becton-Dickinson) angeregt und emittieren anschließend Licht charakteristischer Wellenlänge, welches von dem Gerät detektiert wird. Das verwendete Gerät ist in der Lage bis zu drei verschiedene Farbstoffe gleichzeitig zu detektieren. Zum Beispiel können die Farbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat, Phycoerythrin und Red 670 bzw. Cychrom zusammen bestimmt werden. Zusätzlich zu den drei Fluoreszenzen gibt das Laserlicht, welches direkt an den Zellen gestreut wird, Aufschluss über deren Größe („forward scatter“) und Granularität („side scatter“). Über diese Parameter können Anhaltspunkte bezüglich des Überlebenszustandes von Zellen gewonnen werden.

Ausgewertet wurden die FACS-Daten mit der Cell Quest-Software für Apple-Macintosh.

3.1.12 Zellzyklusanalyse

Lösungen: -FACS Puffer: PBS mit 0.1% (w/v) BSA und 0.02% (w/v) Natriumazid

-Färbepuffer: 0,1% (w/v) Natriumcitratlösung mit 0.1% (w/v) Saponin und 10 µg/ml Propidiumiodid (PI)

2×10^5 Zellen pro Ansatz wurden in FACS-Röhrchen überführt und 3 ml FACS Puffer zugegeben. Nach Sedimentierung (4min/425xg) wurden die Zellen in 50 µl Färbepuffer resuspendiert und für 4-24 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Es wurden dann 300 µl FACS-Puffer zugegeben und die Proben anschließend am FACScan (Becton-Dickinson) analysiert.

3.1.13 Analyse der intrazellulären Produktion von radikalischen Sauerstoffverbindungen

Zum Nachweis radikalischer Sauerstoffverbindungen innerhalb der Zelle wurde Dihydroethidium (HE) [3,8-Diamino-5,6-dihydro-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridin] (Fluka) verwendet. HE wird durch radikalische Sauerstoffverbindungen zu Ethidium oxidiert. Ethidium kann dann durchflusszytometrisch im roten Spektralbereich nachgewiesen werden. Es wurde zu diesem Zweck den Zellkulturen nach Stimulation, zusätzlich zu den jeweiligen Stimulantien, HE zugegeben (Endkonzentration: 2µM). Dafür wurde die Stammlösung (0,2 M in DMSO) zunächst mit Kulturmedium 1:100 vorverdünnt. Die Zellen wurden dann für 15 min bei 37°C in Anwesenheit von HE inkubiert und im Anschluß durchflusszytometrisch analysiert.

3.2 RNA Techniken

3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Lösungen:

- Chloroform, RNase-frei
- Isopropanol, RNase-frei
- 70% (v/v) Ethanol in DEPC-H₂O
- DEPC-H₂O: H₂O bidest. wurde 1:1000 mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Stammlösung versetzt, 12-24 Stunden unter Rühren im Abzug inkubiert und anschließend 3-4x autoklaviert.

Eukaryontische Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des Trizol-Reagens (GibcoBRL) isoliert, dabei wurde nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll vorgegangen. Es wurden ausschließlich RNase-freie Plastikwaren und Lösungen verwendet.

2×10^5 - 1×10^8 Zellen wurden zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeitpunkten geerntet, sedimentiert, nach möglichst vollständigem Absaugen des Überstandes in 1 ml Trizol resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das Trizol wurden die Zellen lysiert und sämtliche Proteine aufgrund des enthaltenen Guanidiniumisothiocyanats sofort denaturiert, so dass ein enzymatischer Abbau der RNA nicht erfolgen konnte. Anschließend wurde das Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt, gut durchmischt und nach zweiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei 4°C zentrifugiert (15 min, 13000 Upm (12000 x g)), um klar getrennte Phasen zu erhalten. Die wässrige, RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, ohne die organische Phenol/Chloroform-Phase sowie die das gefällte Protein enthaltende weiße Interphase zu berühren. Anschließend wurde die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei Raumtemperatur gefällt, sedimentiert (10 min, 13000 Upm, 4°C) und nach Verwerfen des Überstandes mit 1ml 70% Ethanol gewaschen (10 min, 13000 Upm, 4°C). Der Überstand wurde erneut vollständig entfernt, die sedimentierte RNA getrocknet und in 12-20 µl DEPC-H₂O in Abhängigkeit von der zu erwartenden RNA-Menge gelöst und dann bei

-20°C gelagert.

3.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationen wurden fotometrisch durch die Messung der Absorption einer 1:70 Verdünnung in einer Mikroküvette (70µl Volumen) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Hierbei entspricht eine A260-Einheit einer Konzentration von 40µg/ml RNA. Die Angabe der Konzentration am Fotometer (Ultrospec Plus 4045, Pharmacia) erfolgte in µg/ml und wurde nach $c(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = c(\mu\text{g}/\text{ml}) \times \text{Verdünnungsfaktor}/1000$ in die gebräuchlichere Einheit µg/µl umgerechnet.

Der Erhaltungszustand der RNA wurde durch Gelelektrophorese mithilfe eines formaldehydhaltigen Agarosegels bestimmt.

3.2.3 Ribonuklease-Protektion

3.2.3.1 Allgemeine Bemerkungen

Nach vorliegenden spezifischen DNA-Sequenzen (Matrizen) werden mithilfe von RNA-Polymerasen radioaktiv markierte "anti-sense RNA-Sonden" definierter Länge hergestellt. Diese können dann durch eine Hybridisierungsreaktion mit entsprechenden Sequenzen aus einer gegebenen RNA-Population doppelsträngige RNA-Segmente bilden. Eine anschließende Behandlung des Reaktionsgemisches mit Ribonukleasen eliminiert dann überschüssige freie Sonden, sowie andere einzelsträngige RNA. Die verbleibenden RNA-Stränge sind durch die Hybridisierung mit der spezifischen Sonden-RNA doppelsträngig und radioaktiv markiert. Sie sind durch ihre Doppelsträngigkeit vor der Zerstörung durch die Ribonukleasen geschützt und können mithilfe eines denaturierenden Polyacrylamidgels analysiert werden. Die Sondenpolymere werden hierfür so konstruiert, dass sie etwas länger sind als die zu detektierende RNA-Sequenz und bei der Hybridisierung kurze einzelsträngige Überhänge bilden. Diese werden dann durch die Ribonukleasen eliminiert. Die geschützten Sequenzen sind daher nach der Ribonuklease-Behandlung etwas kürzer als die freie Sonde und können dadurch auf dem Gel von dieser unterschieden und identifiziert werden.

3.2.3.2 Durchführung

Für die vorliegende Arbeit wurde das “RiboQuant® Multi-Probe RNase Protection Assay System” der Firma Pharmingen verwendet. Es handelt sich dabei um einen Kit, der alle notwendigen Reagenzien für die Durchführung von Sondensynthese, Hybridisierung und Ribonuklease-Behandlung enthält und zusammen mit verschiedenen “Sonden-Sets” (“Multi-Probe Template Sets”) desselben Herstellers verwendet wird. Diese dienen zur gleichzeitigen Identifizierung mehrere mRNA Species aus einer einzigen Probe von Gesamt-RNA und enthalten außerdem Sonden zur Erkennung von Haushaltsgenen als interne Standards. Hier wurden die Matrizen-Sets “mApo2” zur Identifizierung von Mitgliedern der Bcl2-Familie und “mMyc” zur Detektion einer Reihe von Proto-Oncogenen der Maus verwendet.

Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren, wobei bei der Reinigung von Sonde bzw. von geschützten Proben auf Phenol und Isoamylalkohol verzichtet und stattdessen reines Chloroform verwendet wurde.

Die geschützten Proben wurden im Anschluss über ein sechsprozentiges denaturierendes Polyacrylamidgel (Acrylamid : Bisacrylamid =19 : 1; 8 M Harnstoff) aufgetrennt: Nach einem 45 minütigen Vorlauf bei 40 W wurde das Gel beladen und die Proben für ca. 70 min bei 50 W aufgetrennt. Unbehandeltes SONDENGEMISCH wurde aufgetragen um eine Identifikation der geschützten Proben zu ermöglichen.

Nach dem Trocknen (1h bei 80°C unter Vakuum) wurde das Gel mithilfe von Phosphorimaging bzw. Autoradiographie analysiert. Expositionszeiten lagen zwischen 16 Stunden und 14 Tagen.

3.2.4 **Reverse Transkription von Gesamt-RNA**

Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von Oligo-dT-Primern (Boehringer Mannheim), welche mit den 3'-poly(A)-Enden eukaryontischer mRNAs hybridisieren, revers transkribiert. Folgende Komponenten wurden zunächst zusammengefügt:

1µg Gesamt-RNA in DEPC-H₂O
1µl Oligo-dT-Primer (500ng/µl)
1µl RNase-Inhibitor (40u/µl)
ad 12.5µl (DEPC-H₂O)

Das Gemisch wurde 10 min auf 70°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Nach dem Sammeln der Flüssigkeit durch kurzes Anzentrifugieren wurden folgende Komponenten hinzugefügt:

4µl 5x First Strand Buffer (GibcoBRL)

2µl 100mM DTT (GibcoBRL)

0.5µl 10mM dNTP-Mix (GibcoBRL)

Anschließend wurde der Ansatz zur Hybridisierung der Primer 2 min bei 42 °C inkubiert, dann 1 µl Superscript II (200 units) zugegeben und weitere 50 min bei 42 °C inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Denaturierung der Transkriptase mittels 15minütigen Erhitzens des Ansatzes auf 70°C. Um RNA Verunreinigungen zu entfernen wurde der Reaktionsansatz mit 2U RNase H (MBI) versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Dies ist insbesondere bei nachfolgender Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von Fragmenten mit einer Größe von mehr als 1 Kb von Bedeutung. Gelagert wurden die cDNAs bei -20°C.

3.3 DNA-Techniken

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.3.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Polymerase-Kettenreaktion basiert auf der Verwendung einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase und erlaubt die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die durch die in der Reaktion verwendeten 5'- und 3'-Primer festgelegt sind. Die PCR besteht aus einer wiederholten Abfolge von Zyklen bestehend aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Nach der in der Regel bei 94-96°C stattfindenden Denaturierung der DNA wird das Reaktionsgemisch bis zu derjenigen Temperatur abgekühlt, bei der die Primer spezifisch mit den zu amplifizierenden DNA-Fragmenten hybridisieren. Diese Temperatur, die für jedes Primerpaar getrennt bestimmt werden muß, hängt von der Länge der verwendeten Primer und ihrem Gehalt an den Basen A und T bzw. G und C ab **. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 72°C erhitzt, so dass die bei dieser Temperatur optimal aktive thermostabile DNA-Polymerase (Taq) in Gegenwart von Mg^{2+} die Primer unter Verwendung der cDNA als Matrize elongieren kann. Mit jedem solchen Zyklus verdoppelt sich theoretisch die Menge erhaltener DNA-Fragmente, so dass die Anzahl vorhandener Kopien exponentiell zunimmt.

Der entscheidende Schritt jeder PCR ist das spezifische Binden der Primer an die Matrize. Neben der Temperatur sind hierfür auch der pH-Wert der Lösung, die Magnesiumchlorid-Konzentration und das etwaige Vorhandensein von DMSO von entscheidender Bedeutung und können sich bei verschiedenen Primern unterscheiden. Die Optimalbedingungen müssen daher für jede PCR neu bestimmt werden.

3.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion von Gesamt-cDNA

Lösungen: 10x PCR-Puffer: 500mM KCl, 100mM Tris/HCl pH 9.0, 1% (v/v)
Triton X-100

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR für Gesamt-cDNA verwendet. Sämtliche Plastikmaterialien, sowie das verwendete Wasser wurden zunächst 10 min mit UV-Licht bestrahlt, um eventuell vorhandene kontaminierende Nukleinsäuren zu zerstören. Anschließend wurden die nachfolgend aufgezählten Komponenten in 0,5ml PCR-Reaktionsgefäßen vereinigt, wobei zunächst für alle zu analysierenden cDNAs ein gemeinsamer Reaktionsmix hergestellt wurde. Hiervon wurde dann jeweils ein Aliquot zu der entsprechenden cDNA zugegeben um folgende Zusammensetzung pro Reaktionsansatz zu erzielen:

1-2 µl cDNA
1 µl Primermix (5´- und 3´-Primer je 10 µM in H₂O)
3 µl 10x PCR-Puffer
2 µl 25 mM MgCl₂
0,375 µl 200 µM dNTP-Mix
0,3 µl Taq-Polymerase (1 u/µl)
ad 30 µl (H₂O)

Zur Vermeidung unspezifischer Primer-Hybridisierungen während des ersten Erhitzens wurden die Reaktionen erst bei Erreichen der Denaturierungstemperatur in das PCR-Gerät (Perkin-Elmer Thermo Cycler 9600) gestellt.

Folgendes Grundprogramm wurde verwendet:

Zeit [min]	Temp. [°C]
“Hot Start” *	
5	94
1	60**
1	72
Einzelzyklus	
1	94
1	60**
2	72
Abschluss	
10	72

* Bei sog. “Hot Start” PCR`s. (Die “Hot Start” PCR erlaubt in der Regel die Herstellung reinerer PCR-Produkte: DNA-Matritze und Primer werden mit allen Reaktionskomponenten außer der hitzestabilen Polymerase zusammengegeben und bei einer Temperatur oberhalb der Schwellentemperatur für die Bindung zwischen Primern und DNA gehalten. Direkt vor Beginn der Zyklen wird die Polymerase zugegeben. Somit werden aufgrund fehlender unspezifischer Hybridisierung zwischen Primern und DNA meist reinere Produkte erzielt.)

** Die „Annealing temperature“ T_{An} wurde für die Primer mit $T_{An} = n(AT) \times 2^{\circ}C + n(GC) \times 4^{\circ}C$ angenähert. Es steht n(AT) bzw. n(GC) für die jeweilige Anzahl der entsprechenden Basen im Primer.

Für jede PCR wurde dabei die Anzahl der Einzelzyklen so gewählt, dass die erhaltenen PCR-Produkte in der linearen Amplifikationsphase entstanden und somit die Mengen entstandener Produkte bezugnehmend auf den Aktin-Standard verglichen werden konnten. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelanalyse identifiziert (vgl. 3.3.2.2).

3.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

3.3.2.1 Allgemeine Bemerkungen

DNA-Fragmente (bzw. Nukleinsäuren im allgemeinen) sind aufgrund der negativen Ladungen ihrer Phosphatgruppen im Phosphodiesterückgrat bei neutralem pH polyanionisch und bewegen sich in einem elektrischen Feld daher in Richtung Anode. In einer als Molekularsieb wirkenden Gelmatrix können sie entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei die Trennschärfe von der Porosität des Gels und damit von der Agarosekonzentration abhängig ist. 1 %ige Agarosegele eignen sich für die Auftrennung

von Nucleinsäuren im Bereich von 1-10 kb, während für kleinere Fragmente im Bereich von 0,1-1kb 3 %ige Agarosegele Verwendung finden. Nach erfolgter Auftrennung werden die Nucleinsäuren aufgrund des zwischen die Basen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 265 nm visualisiert. Durch den Vergleich von Nucleinsäure-Standards bekannter Größe lässt sich die Größe der Fragmente bestimmen. Hierbei gilt, dass die zurückgelegte Wegstrecke umgekehrt proportional zum Logarithmus der Basenpaare ist.

3.3.2.2 DNA-Agarosegel

Lösungen: 10x Probenpuffer: 50% Glycerin, 14mM EDTA pH 8.0, 0.25% (w/v)
Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylencyanol

1x TAE: 40mM Tris-Acetat, 10mM EDTA (50x TAE: 242g
Tris, 57.1ml Eisessig, 100ml 0.5M EDTA pH 8.0, ad
1000 ml {H₂O})

Der Agarosegehalt der verwendeten Gele wurde unter Berücksichtigung der Länge der zu untersuchenden Fragmente variiert, Verwendung fanden 1-3 %ige Agarosegele. Die entsprechende Agarosemenge wurde eingewogen, in 1x TAE aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 50-60 °C mit Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml in H₂O) versetzt (1:10000) und in einen vorbereiteten Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es in eine mit 1x TAE gefüllte Laufkammer eingesetzt und mit den Proben, die zuvor mit 1/10 Volumen 5x Probenpuffer versetzt wurden, beladen. Die Elektrophorese erfolgte spannungskonstant bei 70-90 Volt. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht visualisiert und im Bedarfsfall fotografiert.

3.3.4 Klonierungen

Zur Vorbereitung des Vektors wurden Restriktionsenzyme für entsprechende Schnittstellen in der "multiple cloning site" (mcs) des eine Ampicillinresistenz tragenden Vektorplasmids ausgewählt. Das Plasmid wurde damit gemäß den Angaben des jeweiligen Enzymherstellers behandelt. Gegebenenfalls wurde dem Reaktionsansatz (50 µl) zur Erzeugung glatter Enden nach Ablauf der Inkubationszeit 5 U DNA-Polymerase I („Klenow“, New England Biolabs, Inc.), sowie 2,5 µl dNTP-Mix (0,5 mM) zugesetzt und für weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch 10minütiges Erhitzen auf 75 °C inaktiviert. Bei Vektoren mit glatten Enden oder nach Behandlung mit nur einer einzelnen Endonuclease wurde zur Verhinderung der Religation eine Dephosphorylierung der Enden durchgeführt. Hierfür wurden dem Restriktionsreaktionsansatz (50 µl) 0,5 µl MgCl₂ (1M) und 1 U SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) zugemischt und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Enzym durch 10minütiges Erhitzen auf 75 °C inaktiviert. Die Restriktionsreaktion wurde durch Agarosegelanalyse auf ihren Erfolg hin überprüft. Der Reaktionsansatz wurde dann elektrophoretisch über ein präparatives Agarosegel aufgetrennt, das gewünschte Fragment ausgeschnitten und eluiert. Elution bzw. Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des GENE CLEAN III KIT (s.o.) nach den Angaben des Herstellers.

Das in den Vektor einzusetzende DNA-Fragment wurde entweder aus einem bereits existierenden Plasmid ausgeschnitten („Umklonierung“) oder mittels PCR aus revers transkribierter RNA amplifiziert. Nach Restriktion und gegebenenfalls Klenow Reaktion wurden die Fragmente wie die Vektoren gereinigt.

Für die anschließende Ligation wurden geschnittenes Vektorplasmid und Fragment in einem molaren Verhältnis von eins zu drei eingesetzt und zusammen mit T4 DNA Ligase (MBI) in Ligationspuffer (MBI) für 6 Stunden bei 15 °C inkubiert. Begleitend wurde zur Kontrolle die gleiche Menge an Vektorplasmid ohne Fragment angesetzt.

Beide Ansätze wurden dann parallel in kompetente E.coli Bakterien (Top10F[']) transformiert. Hierzu wurden 50 µl Suspension kompetenter Bakterien (siehe 3.3.3) auf Eis mit 1,5 µl aus einem 10 µl Ligationsansatz versetzt und für 30 min inkubiert, dann 90 s lang auf 42 °C gebracht und für 1-2 min auf Eis wieder abgekühlt. In der Folge wurden die Ansätze in 1ml LB Medium aufgenommen und für 1h bei 37 °C mit 200 U/min geschüttelt. Die so gewonnenen Bakterienkulturen wurden dann auf ampicillinhaltigem (40

µg/ml) Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Verhältnis der Koloniezahlen auf den beiden Platten gab Aufschluss über den Erfolg der Ligation im Verhältnis zur Religation. Aus mutmaßlich positiven d.h. Vektor/Fragment exprimierenden Kolonien wurde anschließend die DNA isoliert und mittels geeigneter Restriktion und Sequenzierung verifiziert (s.u.).

3.3.5 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienklonen

Je 3 ml LB/Ampicillin (40 µg/ml) wurden mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (200 U/min). Die Bakterien wurden pelletiert, in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCL pH 8,0 und 10 mM EDTA) aufgenommen und durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 N NaOH und 1% SDS) sowie 150 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat und 2 M Essigsäure) lysiert. Die Lysate wurden dann zentrifugiert und die DNA aus den Überständen durch Zugabe von 2,2 Volumina Ethanol ausgefällt, sedimentiert und anschließend in Wasser oder TE pH=7,8 aufgenommen.

Restriktionsanalysen wurden mit entsprechenden Endonukleasen nach Angaben des jeweiligen Enzymherstellers durchgeführt. Die Richtigkeit der Klonierung wurde durch Sequenzierung des Vektors im Bereich des eingefügten Fragments überprüft.

3.3.6 Großpräparation von Plasmid DNA

Die Gewinnung größerer DNA-Mengen aus 600-800 ml Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des "NucleoBond Plasmid Maxi Kit" der Firma Clontech gemäß der mitgelieferten Vorschrift.

3.3.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Analog zur RNA-Konzentrationsmessung (vgl. 3.2.2) wurde die DNA-Konzentration ebenfalls fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Mikroküvette unter Verwendung einer adäquaten Verdünnung (1:9 bis 1:70 in H₂O, 70µl Volumen) gemessen. Hierbei entspricht eine A₂₆₀-Einheit einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

3.3.8 Sequenzierung mittels Fluorochrom markierter Nukleotide

Diese Methode der DNA-Sequenzierung basiert auf der Didesoxynucleotid-Methode nach Sanger³, erfordert aber keine getrennten, nukleotidspezifischen Einzelreaktion mehr, da der basenspezifische Strangabbruch durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Didesoxynucleotide erfolgt und die so entstandenen Fragmente daher anhand ihrer Farbe am 3'-Ende identifizierbar sind. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion ist dabei eine lineare PCR, da nur ein Primer verwendet wird. Dieser wird matrizenabhängig in jedem Zyklus von der eingesetzten Polymerase elongiert, die sowohl unmarkierte Desoxyribonucleotide als auch markierte Didesoxynucleotide als Substrate akzeptiert. Nach der Sequenzierungs-PCR wird die DNA gefällt und zur Analyse im Sequenziergerät in einem speziellen Puffer (TSR) aufgenommen. Im Sequenziergerät werden die Bruchstücke längenspezifisch aufgetrennt und die Farbmarkierung detektiert. Nach erfolgter Kapillarelektrophorese wird die Sequenz von der Software des Computers am Sequenziergerät als 4-Farbendiagramm ausgegeben, wobei jeder Base eine Farbe zugeordnet ist. Unter Optimalbedingungen können ca. 500 Basen gelesen werden.

3.3.8.1 Sequenzierungs-Polymerase-Kettenreaktion

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß hergestellt, wobei die Menge einzusetzender DNA entsprechend des Richtwertes (500 ng bei 3 kb) auf die reale Plasmid- bzw. Fragmentgröße umgerechnet wurde:

500 ng DNA in H₂O
0,5 µl 10 µM Primer
ad 7,5 µl (H₂O)
2,5 µl "Abi Prism Big Dye DNA Sequencing Kit" (Perkin Elmer)

Die Reaktion wurde für 30 Zyklen, bestehend aus 10 s bei 96°C, 5 s bei 50 °C und 4 min bei 60 °C, im PCR-Gerät inkubiert und abschließend auf 4°C abgekühlt.

³ Sryer, L.: *Biochemistry*, 4th edn.

3.3.8.2 Fällung und Analyse des DNA-Sequenzierungsansatzes

Der Reaktionsansatz wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 1 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) versetzt, die DNA durch Zugabe von 25 µl 100% Ethanol bei Raumtemperatur gefällt und 20 min bei 13000 Upm (10000 g) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert. Anschließend wurde das Präzipitat zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 15 µl TSR-Puffer (Perkin-Elmer) aufgenommen. Vor der Analyse im Sequenziergerät (310 Genetic Analyzer, ABI PRISM™) wurde die Probe 2 min bei 94°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in ein spezielles Sequenzanalyse-Reaktionsgefäß überführt.

3.3.9 Glycerinkulturen

Die Kulturen einzelner verifizierter Bakterienklone wurden mit 15 % Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Gesamtzellen

Lösungen: 6x Probenpuffer: 14 ml Puffer B (s.o.), 6 ml Glycerin, 2 g SDS,
2,5 mg Bromphenolblau, 1,85 g DTT

Um vergleichbare Proteinkonzentrationen zu erhalten wurde pro Probe jeweils die gleiche Zellzahl eingesetzt. In vitro stimulierte Zellen ($2,5 \cdot 10^5$) wurden sedimentiert (1 min, 13000 Upm). Das Medium wurde quantitativ abgesaugt und die sedimentierten Zellen dann in 25-50 µl 6x Probenpuffer aufgenommen und für 8 min bei 95°C lysiert. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert.

3.4.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

3.4.2.1 Allgemeine Bemerkungen

Proteinproben wurden in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli⁴ entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Hierbei werden die Polypeptidketten zunächst durch das negativ geladene, zwischen aliphatische Aminosäurereste interkalierende Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) entfaltet, aus Assoziationen mit anderen Proteinen oder Lipiden freigesetzt und in Abhängigkeit ihrer Größe negativ geladen, wobei ihre ursprüngliche Nettoladung vernachlässigbar wird. Als Trägermatrix werden chemisch inerte, als Molekularsiebe wirkende Polyacrylamidgele, die durch Polymerisation von Acrylamid und dem quervernetzenden N,N'-Methylenbisacrylamid in Anwesenheit von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) hergestellt werden, verwendet. Das TEMED katalysiert hierbei die Bildung freier Radikale aus APS, welche dann die Polymerisation initiieren. Damit alle SDS-Proteinkomplexe gleichzeitig ins Trenngel gelangen, ist diesem ein Sammelgel vorgelagert. Hier sind bei pH 6,8 aufgrund des zwitterionischen Glycins und des negativ geladenen Chlorids zwei Pufferfronten vorhanden, zwischen denen sich ein die SDS-Proteinkomplexe konzentrierender Feldstärkegradient ausbildet.

3.4.2.2 Herstellung der Gele

Lösungen:

Puffer A:	1,5M Tris/HCl pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
Puffer B:	0,5M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS
	30 % (w/v) Acrylamid / 0,8% (w/v) Bisacrylamid in H ₂ O
	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O

⁴ Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*; Wiley Interscience, 1994

Gelzusammensetzungen:

a) Trenngele (15ml):

Acrylamidkonzentration in %	10	12,5	15
Acrylamid/Bisacrylamid 30 % / 0,8 % (ml)	5	6,25	7,5
Puffer A (ml)	3,75	3,75	3,75
H ₂ O (ml)	6,25	5	3,75
10% Ammoniumperoxodisulfat (µl)	150	150	150
TEMED (µl)	25	25	25

b) Sammelgel (5 ml): 650 µl Acrylamid/Bisacrylamid 30 % / 0,8 %, 1,25 ml Puffer B, 3 ml H₂O, 50 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat, 5 µl TEMED

Mit 70% Ethanol gereinigte Minigelplatten wurden mit den zugehörigen Abstandshalter zusammengesetzt und in eine Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurde das Trenngel bis ca. 2,5 cm unter den oberen Rand gegossen und zur Ausbildung einer geraden Polymerisationskante vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels wurde das Wasser sorgfältig entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm zur Erzeugung von Geltaschen luftblasenfrei eingesetzt. Nachdem das Sammelgel ebenfalls polymerisiert war, wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und das Gel in die Vertikallaufkammer gespannt.

3.4.2.3 Durchführung der PAGE

Sowohl das obere als auch das untere Pufferreservoir der Vertikallaufkammer wurden mit 1x Laufpuffer gefüllt und im Bedarfsfall, zur Beseitigung von Luftblasen, die Geltaschen mit einer Spritze ausgespritzt. Die Proben wurden aufgetragen und stromkonstant bei 30 mA aufgetrennt. Um eine nachfolgende Identifizierung der Proteinbanden zu ermöglichen, wurden neben den Proben 3 µl der “BenchMark™ Prestained Protein Ladder”

(GibcoBRL) aufgetragen, einem Gemisch von 10 Proteinen bekannten Molekulargewichts zwischen 10 und 200 kDa.

3.4.3 Western Blotting

Mittels Western Blotting können bestimmte Proteine eines Gemisches spezifisch nachgewiesen werden. Dabei werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Blotmembran transferiert, damit sie für einen spezifischen Antikörper zugänglich werden. Dieser wird dann in einem zweiten Inkubationsschritt detektiert.

3.4.3.1 Transfer der Proteine auf Blotmembranen

Lösungen: Anodenpuffer: Roti-Blot A (Roth)
Kathodenpuffer: Roti-Blot K (Roth)

Nach der SDS-PAGE wurde das Sammelgel abgetrennt und das (Trenn-)Gel kurz mit Wasser gespült. Die Blotmembran (ImmobilonTM-P, PVDF-Membran, MILLIPORE) und 5 Whatman-Papiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten, die Membran kurz in 100% Methanol getaucht und direkt in Anodenpuffer überführt. Anschließend erfolgte der Aufbau des Transfers in einer Graphitkammer wie folgt:

Kathode

5 mit Kathodenpuffer getränkte Whatman-Papiere

Gel

Blotmembran

5 mit Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere

Anode

Der Transfer erfolgte über 2 Stunden stromkonstant mit 70 mA bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran kurz in 100 % Methanol getaucht und zur Fixierung der Proteine auf der Membran luftgetrocknet.

3.4.3.2 Immunologische Detektion

Lösungen: -PBS/TWEEN oder: TBS/TWEEN: 0,1% TWEEN-20 (Aplichem) in PBS bzw. TBS.

-Blockpuffer: 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS/TWEEN bzw. TBS/TWEEN.

Alle nachfolgend beschriebenen Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt: Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst entweder über Nacht bei 4°C oder für 1,5-4 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer geschwenkt, und dann entweder über Nacht bei 4°C oder 1,5-2 h bei Raumtemperatur mit dem 1. Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach dem Waschen der Membran (3x5 min mit PBS/TWEEN bzw. TBS/TWEEN) erfolgte die zweistündige Detektion des 1. Antikörpers mit einem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper in Blockpuffer. Anschließend wurde die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen und die Nachweisreaktion unter Verwendung des ECL-Systems (Amersham) durchgeführt.

3.4.3.3 Das ECL-System

Gebundene Antikörper-Peroxidase-Konjugate wurden in der Dunkelkammer mit dem ECL-System nachgewiesen. Bei der von der Peroxidase katalysierten Reaktion wird Licht erzeugt und mit diesem ein Röntgenfilm belichtet.

Die mitgelieferten Lösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt und die Membran für 1 min in dem Gemisch inkubiert. Anschließend wurde sie luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien gelegt. Es erfolgten dann verschieden lange Belichtungen (0,5-15 min) eines Röntgenfilms in einer lichtdichten Kassette. Der Röntgenfilm wurde sofort entwickelt. Die auf der Blotmembran sichtbare Proteinleiter (s.o.) wurde auf den Röntgenfilm übertragen, um eine Zuordnung der Banden zu ermöglichen.