

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Materialien

ABI 310 automatisches Sequenziergerät	Perkin Elmer
Autoklav	Münchner Medizin
Bakterienkulturschüttler	Certomat, Fa. B. Braun
Blot-Filterpapier	Whatman
Blotkammern	Hauswerkstatt
Computer	Apple Macintosh
Eismaschine	Scotsman
Einmalpipetten (5 und 10 ml)	Sarstedt
Elektrophoresekammern	Werkstatt
FACScan	Becton & Dickinson
FACS Röhrchen	Hartenstein
Feinwaage	Sartorius
Filme, X-ray Retina XBD	Fotochemische Werke GMBH, Berlin
Gefrierschrank	Bosch
Geltrockner	BioRad
Heizblock	Thermostat 5320, Eppendorf
Inkubatoren	Heraeus
Kühlschrank	Bosch
Laborwaage	Precisa 800 M-200 C, Vibra
Magnetrührer	Assistent & Variomag
Mikrowellenherd	M702, Philips
Neubauer-Zählkammer	GLW
Nitrozellulosemembran	Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech
PCR-Gerät	Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler
pH-Meter	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
Phosphorimager	Molecular Dynamics

Pipettenspitzen	div./ Hartenstein
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Pipettierhilfe	Pipetboy plus, Technomara
Plastikmaterial	Eppendorf, Greiner, Nunc
Quarzküvetten	Hellma
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Eppendorf
Spannungsgeräte	Consort E455, Hartenstein
Spektralphotometer	Pharmacia
Sterilbank	Biological Safety Cabinets, Nuaire
Sterilfilter (0,2 und 0,45 µm)	Millipore, Schleicher & Schüll
Ultrazentrifugenröhrchen	Ultratube, Nalgene
UV-Handlampe	Bachhofer
UV-Leuchttisch mit Foto-Drucker	MWG-Biotech
Vortexer	GLW
Wasserbäder	IKA TER 2
Wippe	Hettich
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417C, Eppendorf
Zellkulturzentrifuge	Rotanta RPC, Hettich
Großzentrifuge	RC5C, Sorvall (SS-34, GS-3 Rotoren, Sorvall)
Ultrazentrifuge	Combi Plus, Sorvall (TH641 Rotoren, Sorvall) L8-55 Beckman (TH641 Rotoren, Sorvall)

2.1.2. Chemikalien

An dieser Stelle wird darauf verzichtet, alle für dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien einzeln aufzulisten. Alle verwendeten Reagenzien werden entweder unter Punkt Lösungen erwähnt oder im jeweiligen Unterpunkt des Methodenteils angesprochen. Sofern nicht anders vermerkt, wurden die angegebenen Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Merck, Darmstadt; Sigma, Deisenhofen; Serva, Heidelberg; Roth, Karlsruhe; Applichem, Darmstadt; Gibco Life Technologies, USA; ICN, USA. Vereinzelt wurde besonderer Wert darauf gelegt, das Produkt einer bestimmten Firma zu verwenden. In solchen Fällen sind im Text jeweils Katalognummer und Hersteller vermerkt.

2.1.3. Enzyme und Kits

CIAP (calf intestine alkaline phosphatase) MBI Fermentas

EndoGlycosidase H	ICN Biochemicals (Katalognummer: 39-131)
Klenow Enzym	MBI Fermentas
Panscript Polymerase	PAN-Systems
Powerscript Polymerase	PAN-Systems
Restriktionsenzyme	NEB, MBI Fermentas, Roche
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
AmpliTaqFS zur automat. Sequenzierung	Perkin-Elmer
ECL-Kit	Amersham
Geneclean Kit III	Bio 101 Inc., USA
MERmaid Kit	Bio 101 Inc., USA
QIAmp Tissue Kit	Qiagen

2.1.4. Radiochemikalien

³⁵S-Methionin/Cystein Promix

Amersham, Readyview: 7,15mCi/500 µl; 285mBq (Bestellnummer: AGQ0080)

2.1.5. Protease Inhibitoren

Inhibitor	Stammlösung	Gebrauchskonzentration
PMSF	10 mg/ml (in Isopropanol)	170 µg/ml
Na₂-EDTA	0,5 M	1,5 mM
Pepstatin	700 µg/ml	0,7 µg/ml
Leupeptin	0,5 mg/ml	0,5 µg/ml

2.1.6. Antiseren und andere Nachweisreagenzien

α-HFV Gag-Serum Polyklonales Hasenserum gegen Baculovirus exprimiertes HFV Gag
(Hahn et al., 1994)

α-HFV-SU-Serum Polyklonales Hasenserum gegen Baculovirus exprimiertes HFV SU
(Lehrmann et al.,)

α-HFV Env-Serum Polyklonales Hasenserum gegen Baculovirus exprimiertes HFV SU
(Lehrmann et al.,)

„Franka-Serum“ Serum eines FV infizierten Schimpansen
(Lindemann und Rethwilm, 1998)

α -VSV-G	Polyklonales Hasenserum gegen das Glykoprotein von VSV (P. Clapham, R. Weiss)
α -MLV-SU	Hybridomaüberstand mit monoklonalen Antikörpern gegen MLV Env-SU (ATCC CRL1913)
α -MLV-TM	Hybridomaüberstand, mit monoklonalen Antikörpern gegen MLV Env-TM (ATCC CRL1893)
Swine α -Rabbit IgG-HRP	Dako, Dänemark
Streptavidin-HRP	Streptavidin gekoppelt an Meerrettich Peroxidase, Pierce (Produktnummer: 21126) Lösung: 1 mg/ml in H ₂ O, 100 μ l Aliquots bei -20°C lagern, 1:15000 verdünnt zum Nachweis bei Biotinylierungsexperimenten eingesetzt.

2.1.7. Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Gebrauchskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml (in H ₂ O)	100 μ g/ml
Penicillin	100 mg/ml (in H ₂ O)	100 μ g/ml
Streptomycin	100 mg/ml (in H ₂ O)	100 μ g/ml
G418	100 mg/ml (in PBS)	1 mg/ml

Alle Stammlösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.1.8. Bakterienstämme

Bakterienstamm	Verwendung	Information
E. coli DH5α	Zur Transformation von Ligationsansätzen	Appendix A in (Sambrook et al., 1989)
E. coli JM109	Zur präparativen Aufreinigung von Plasmiden	Appendix A in (Sambrook et al., 1989)
E. coli TopF'	Zur präparativen Aufreinigung von pHIT60, pHIT123, pHIT456	

2.1.9. Plasmide

pcHFVenv	HFV Env-Expressionskonstrukt mit intaktem internen Spleißdonor-, Spleißakzeptorpaar (Lindemann et al., 1997)
pVG-wt	VSV-G-Expressionskonstrukt (Pietschmann et al., 1999) mit dem gesamte VSV-G Leseraster aus pSVGL1 (Rose und Bergmann, 1983)
pHIT123	Expressionskonstrukt für das MLV Hüllprotein mit ecotroper Wirtsspezifität (Soneoka et al., 1995)
pMH62	Retroviraler HFV Vektor mit SFFV U3 getriebenem EGFP Markergen (Pietschmann et al., 1999)
pcHSVR2	Expressionsplasmid für ein CMV getriebenes, HFV Provirus (Moebes et al., 1997)
pcDL01	Retroviraler HFV Vektor mit HFV Gag/Pol, HFV Env mit der EM2 Mutation (Lindemann et al., 1998) sowie einem SFFV U3 getriebenen EGFP/Neo Markergen

2.1.10. Lösungen

2.1.10.1. Bakterienkultur

5x LB-Medium

50 g	Bacto Tryptone	
25 g	Bacto-Yeast-Extrakt	
50 g	NaCl	
5 g	Glucose	
ad	1000 ml mit H ₂ O,	autoklavieren

LB-Platten

10 g	LB Broth Base
5 g	Bacto-Yeast-Extract
10 g	Agar
ad	1000 ml mit H ₂ O

Nach dem Autoklavieren und vor dem Gießen der Platten, wird bei einer Temperatur von ca. 50°C Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) zugegeben.

2.1.10.2. Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA

Transformationspuffer I (vgl. 2.2.1.1)

30 mM	Kaliumazetat
100 mM	RbCl ₂
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15%	Glycerin (99%)
pH 5,8	

Chemikalien in ca. 300 ml H₂O lösen, pH mit 10% Essigsäure einstellen, 75 ml Glycerin (99%) zugeben und ad 500 ml mit H₂O auffüllen. Durch 0,2 µm Filter filtrieren.

Transformationspuffer II

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl ₂
100 mM	RbCl ₂
15%	Glycerin (99%)
pH 6,5	

Chemikalien in ca. 70 ml H₂O lösen, pH mit 1 M KOH einstellen, 15 ml Glycerin (99%) zugeben und ad 100 ml mit H₂O auffüllen. Durch 0,2 µm Filter filtrieren.

Mini/Midi-Lösung I (vgl. 2.2.1.3)

25 mM	Tris HCl pH 8,0
50 mM	Glukose
10 mM	EDTA

Direkt vor der Verwendung wurde Lysozym in einer Endkonzentration von 5 mg/ml zugesetzt. Der Puffer (ohne Lysozym) kann bei 4°C gelagert werden.

Mini/Midi-Lösung II

0,2 M	NaOH
1%	SDS

Mini/Midi-Lösung III (Kaliumazetatlösung)

3 M	Kalium	60 ml	5 M	Kaliumazetat
5 M	Azetat	11,5 ml		Eisessig
		28,5 ml		H ₂ O

Die resultierende Lösung enthält Kalium und Azetat in einer Konzentration von 3 M bzw. 5 M. Lagerung bei 4°C.

50x TAE (Stammlösung für Agarosegelpuffer)

2 M	Tris-Azetat	242 g		Tris Base
50 m M	EDTA	100 ml		0,5 M EDTA
		57,1 ml		Eisessig
		ad 1000 ml	mit	H ₂ O

6x DNA Probenpuffer

0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylencyanol FF
40% (w/v)	Saccharose (in H ₂ O)

4 M Ammoniumazetat (vgl. 2.2.1.7)

3 M Natriumazetat pH 5,2 (vgl. 2.2.1.10)

3 M Natriumazetat
pH 5,2

Der pH Wert der Lösung wird durch Zugabe von Eisessig auf einen Wert von 5,2 eingestellt. Anschließend wird der Puffer aliquotiert und autoklaviert.

2.1.10.3. DNA Transfektion

2x HBS

50 mM	HEPES	5,95 g	HEPES
10 mM	KCl	0,373 g	KCl
12 mM	Glucose	1,19 g	Glucose
280 mM	NaCl	8,18 g	NaCl
1,5 mM	Na ₂ HPO ₄	5 ml	150mM Na ₂ HPO ₄ Lösung
pH 7,05			
		ad	500 ml mit H ₂ O

Der pH Wert der Lösung wird mit 1 M HCl eingestellt (ca. 17 ml). Die Lösung wird filtriert (0,2 µm), aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Transfektionseffizienz ist stark vom pH-Wert des 2 x HBS abhängig. Deshalb sollten am besten 3 Ansätze mit unterschiedlichen pH-Werten (7,00, 7,05, 7,1) hergestellt werden und auf ihre Transfektionseffizienz geprüft werden.

2 M CaCl₂

2 M CaCl₂ Sigma, Bestellnummer: C7902

Die Lösung wird filtriert (0,2 µm), aliquotiert und bei -20°C gelagert.

50x Natriumbutyrat (vgl. 2.2.2.1)

500 mM n-Buttersäure, Natriumsalz, Merck Katalognummer: 817500

Die Lösung wird in sterilem PBS⁻ angesetzt, filtriert (0,2 µm) und bei 4°C gelagert.

2.1.10.4. Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Natriumazid (Stammlösung)

10% Natriumazid (w/v in H₂O)

Natriumazid ist sehr toxisch. Alle Lösungen sollten deutlich gekennzeichnet und nur mit Handschuhen gehandhabt werden.

5x EndoH Puffer (vgl. 2.2.2.8)

0,1 M	Na ₂ HPO ₄	10 ml	1 M	Na ₂ HPO ₄ pH 6,5
0,5%	SDS	5 ml	10%	SDS
0,1%	Natriumazid	1 ml	10%	Natriumazid
pH 6,5		ad 100 ml mit		H ₂ O

20% Saccharose in TSE (vgl. 2.2.2.6)

100 mM	Tris HCl pH 8,0
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA
20%	Saccharose (w/v)

Die Lösung wird filtriert (0,2 µm) und bei 4°C gelagert.

Lysispuffer (vgl. 2.2.2.2)

	Proteaseinhibitoren (Stammlsg.)	Endkonz.
10 mM Tris HCl pH8,0	EDTA 0,5 M	1,5 mM
140 mM NaCl	PMSF 10 mg/ml	160 µg/ml
0,025% NaN ₃	Leupeptin 0,5 mg/ml	0,5 µg/ml
1% Triton X 100	Pepstatin 700 µg/ml	0,7 µg/ml

(0,1% SDS, nur bei Lysaten, die für Biotinylierungsexperimente verwendet wurden)

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert. Die Proteaseinhibitoren wurden direkt vor der Verwendung des Puffers frisch hinzugegeben.

RIPA Puffer (vgl. 2.2.2.4, 2.2.2.5)

0,3 M	NaCl
20 mM	Tris HCl pH 8,0
1%	Natriumdesoxycholat
0,1%	SDS
1%	Triton X 100

Lagerung bei 4°C.

NP-40 Waschpuffer (vgl. 2.2.2.5)

10 mM	Tris HCl pH 8,0
0,1%	NP-40

Lagerung bei 4°C.

2xPPP (Protein Proben Puffer, vgl. 2.2.2.3)

125 mM	Tris HCl pH 6,8
4%	SDS
20%	Glycerin
10%	β-Mercaptoethanol
0,1%	Bromphenolblau

Lagerung bei 4°C

Tricin Gelpuffer (vgl. 2.2.2.3)

3 M	Tris HCl pH 8,45
0,3%	SDS

10x Anodenpuffer (vgl. 2.2.2.3)

2 M	Tris HCl pH 8,9
-----	-----------------

5x Kathodenpuffer (vgl. 2.2.2.3)

0,5 M	Tris
0,5 M	Tricine
0,5%	SDS

Transferpuffer (vgl. 2.2.2.4)

50 mM	Tris
40 mM	Glycin
0,037%	SDS
20%	Methanol

Gelfixierlösung (vgl. 2.2.2.5)

10%	Essigsäure
50%	Methanol

2.1.10.5. Zellkultur

DMEM High Glucose (Gibco, Katalognummer: 41966-029)

500 ml	DMEM
50 ml	FCS
0,6 ml	Penicillin/Streptomycin Mix (100 mg/ml, in H ₂ O, Medienküche)

MEM (Hausmedium)

500 ml	MEM (9,6 g/l H ₂ O, Gibco, Katalognummer: 41500-083; 2,2 g/l NaHCO ₃)
3,5 ml	Glutamin [5% (w/v), in H ₂ O, Medienküche]
25-50 ml	FCS (je nach Zelltyp)
0,6 ml	Penicillin/Streptomycin Mix (100 mg/ml, in H ₂ O, Medienküche)

Markierungsmedium (Hausmedium) (vgl. 2.2.2.5)

500 ml	MEM Methionin/Cystein ⁻ (Medienküche, Zusammensetzung wie MEM, nur ohne Methionin und Cystein)
--------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------

20 ml	NaHCO ₃ (5,6%, Medienküche)
5-10%	dFCS (Gibco, Katalognummer: 10110-153)
(10%	MEM (nur bei über Nacht andauernden Markierungsphasen)
5-7,5 µl/ml	³⁵ S-Methionin/Cystein Promix, Amersham Readyview, 7,15mCi/500 µl 285mBq, Bestellnummer: AGQ0080)

Hungermedium (Hausmedium) (vgl. 2.2.2.5)

500 ml	MEM Methionin/Cystein ⁻ (Medienküche, Zusammensetzung wie MEM, nur ohne Methionin und Cystein)
20 ml	NaHCO ₃ (5,6%, Medienküche)

ATV (Medienküche) (vgl. 2.2.3.1)

8 g	NaCl
0,4 g	KCl
1 g	D(+) Glucose
0,58 g	NaHCO ₃
0,5 g	Trypsin
0,2 g	Versene
ad 1000 ml	H ₂ O

Glutamin (Medienküche)

5 g	L(+) Glutamin, Fluka
ad 100 ml	H ₂ O

Filtrieren und in Aliquots zu je 7 ml bei -20°C lagern. Je 3,5 ml pro 500 ml Zellkulturmedium einsetzen.

Penicillin/Streptomycin-Mix (Medienküche)

5 g	Penicillin
5 g	Streptomycin
ad 50 ml	H ₂ O

Filtrieren und in Aliquots zu je 1,2 ml bei -20°C lagern. Je 600 µl pro 500 ml Zellkulturmedium einsetzen.

FACS Puffer

PBS, 0,1% BSA (Medienküche)
0,05% Natriumazid

FCS

FCS (Biochrom KG, Berlin, Katalognummer: S0115)
Tiefgefrorenes FCS wurde bei 37°C aufgetaut und anschließend zur Inaktivierung des Complements für 30 Minuten bei 56°C inkubiert.

Methionin (Medienküche) (vgl. 2.2.2.7)

250 mM L(+) Methionin

Cystein (Medienküche) (vgl. 2.2.2.7)

100 mM L(+) Cystein

X-Gal (vgl. 2.2.3.5)

20 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galctosid), Roth
Die Lösung wird in Dimethylformamid angesetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

LacZ-Färbelösungen (vgl. 2.2.3.5)

400 mM Ferricyanid, 100x Stammlösung
400 mM Ferrocyanid, 100x Stammlösung

Die Salze werden zur Herstellung der beiden Stammlösungen in H₂O gelöst. Die Lösungen werden unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur gelagert. Direkt vor der Verwendung wird die Gebrauchslösung in PBS angesetzt:

4 mM Ferricyanid
4 mM Ferrocyanid
2 mM MgCl₂
0,4 mg/ml X-Gal

LacZ-, Fixierlösung (vgl. 2.2.3.5)

0,5% Glutaraldehyd in PBS (frisch angesetzt)

2.1.10.6. Standardlösungen und Puffer

1 M Tris

121,1 g Tris Base
800 ml H₂O
pH 7,4 70 ml HCl (konz.)
pH 7,6 60 ml HCl (konz.)
pH 8,0 42 ml HCl (konz.)
ad 1000 ml H₂O

Der Puffer wird aliquotiert und autoklaviert.

10% SDS

100 g SDS
ad 1000 ml H₂O

Beim Ansetzen der Lösung erwärmt man das Gemisch auf 68°C, um den Lösungsprozeß zu erleichtern.

PBS⁺ (Medienküche)

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g Na₂HPO₄ 2x H₂O
0,2 g KH₂PO₄
0,167 g CaCl₂ 4x H₂O
0,1 g MgCl₂ 6x H₂O

PBS⁻ (Medienküche)

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g Na₂HPO₄ 2x H₂O
0,2 g KH₂PO₄

0,5 M EDTA

186,1 g EDTA 2x H₂O
800 ml H₂O
ca. 20 g NaOH Plätzchen, pH auf 8,0 einstellen
ad 1000 ml H₂O

EDTA löst sich erst bei einem pH Wert von ungefähr 8. Die Lösung wird aliquotiert und autoklaviert.

10x TE

100 mM Tris HCl pH 7,4
10 mM EDTA

2.2. Methoden

2.2.1. Analyse und Klonierung von DNA

2.2.1.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

2.2.1.2. Transformation

Die meisten Methoden zur Transformation von Bakterien beruhen auf der Tatsache, daß Bakterien, die mit eiskalten CaCl_2 -Lösungen behandelt wurden und anschließend einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt waren, mit einer hohen Effizienz fremde DNA aufnehmen können. Offenbar wird auf diese Weise ein transients Zustand der „Kompetenz“ erreicht, der die Bakterien in die Lage versetzt, DNA aufzunehmen (Sambrook et al., 1989). Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde folgendermaßen verfahren: Aus einer bei -70°C gelagerten Glycerolstammkultur wurden 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm (z.B. JM109) angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert (Bakterienschüttler, 180 rpm). Am nächsten Morgen wurde 1 ml der Übernachtskultur verwendet, um 100 ml LB-Medium zu beimpfen. Diese Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 0,2-0,3 (Messung bei 595 nm) kultiviert, anschließend für 5 Minuten auf Eis gehalten, auf zwei 50 ml Falcon Röhrchen verteilt und 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert (2500 rpm, Hettich Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, die Sedimente in jeweils 20 ml Transformationspuffer 1 aufgenommen, vereinigt und erneut für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert (2500 rpm, Hettich Zentrifuge). Der Überstand wurde erneut abgezogen und das Sediment in 4 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten auf Eis wurde die Bakteriensuspension in Aliquots zu je 300 μl auf Kryoröhrchen verteilt und bei -70°C eingefroren.

Klassische Transformation

Zu 100 μl frisch aufgetauten kompetenten *E. coli* Zellen wurden 10 μl eines Ligationsansatzes (entspricht einem halben Ansatz) pipettiert und das Gemisch für zehn Minuten auf Eis inkubiert, über 90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und anschließend für drei Minuten auf Eis gekühlt. Der Ansatz wurden dann mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt und über 45-60 Minuten bei 37°C gehalten. Abschließend wurden die Bakterien bei 3000 rpm (5 Minuten, Tischzentrifuge) sedimentiert, in ca. 100 μl resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmarker (z.B. Ampicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgestrichen.

Quick Transformation (nach Pope und Kent, 1996)

Diese Methode eignet sich zur schnellen Transformation von Plasmiden. Wegen der relativ niedrigen Transformationseffizienz sollten Ligationsansätze allerdings nicht auf diese Weise transformiert werden: 50-100 µl CaCl₂-kompetenter E. coli Zellen wurden mit 1 µl (0,5-2 µg/µl) Plasmid DNA vermischt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend direkt auf eine vorgewärmte (30 Minuten bei 37°C) LB-Agarplatte mit Antibiotikum ausgestrichen.

2.2.1.3. Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien (Mini-bzw. Midi-Präparation)

Sowohl die Aufbereitung kleiner Mengen Plasmid DNA aus Bakterien (3 ml Übernachtskultur, Mini-Präp-Ansatz) zu analytischen Zwecken als auch die präparative Reinigung größerer Mengen DNA (100 ml Übernachtskultur, Midi-Präp-Ansatz) wurden nach dem gleichen Prinzip, nämlich dem der alkalischen Lyse, durchgeführt (Birnboim und Doly, 1979). Dabei wird die Bakteriensuspension zunächst abzentrifugiert und die Bakterien anschließend mit Lysozym und NaOH/SDS Lösung lysiert. Hierbei führen die alkalischen Bedingungen zur Denaturierung der bakteriellen Proteine, der chromosomalen DNA und auch der Plasmid DNA. Das alkalische Lysat wird anschließend mit 3 M Kaliumazetat Lösung neutralisiert. Bei der sich einstellenden hohen Salzkonzentration präzipitieren die bakteriellen Proteine und Zelltrümmer mitsamt der chromosomalen DNA, während die Plasmid DNA in renaturierter Form in Lösung bleibt und abgetrennt werden kann. Im einzelnen sind die Methoden unten beschrieben.

Mini-Präparation

- Lösung 1: 25 mM Tris HCl (pH 8,0), 50 mM Glucose, 10 mM EDTA (pH 8,0)
5 mg/ml Lysozym (frisch eingewogen)
- Lösung 2: 0,2 M NaOH, 1% SDS
- Lösung 3: 3 M Kaliumazetat (pH 4,8)

Nach der Transformation wurden mit Hilfe von sterilen Zahnstochern jeweils ein Klon in 3 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (z.B. 100 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurde bei 7000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge) und das Sediment in 100 µl Lösung 1 aufgenommen. Um die bakterielle RNA zu verdauen wurden 3 µl RNase A [10 µg/µl] zugegeben und der Ansatz 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Lösung 2 wurden die Bakterien 5 Minuten bei RT lysiert. Daraufhin wurden je 150 µl Lösung 3 zugefügt und nach weiteren 5 Minuten Zelltrümmer und chromosomale DNA abzentrifugiert (15 Minuten bei 13000 rpm, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Plasmid DNA

durch die Zugabe von 200 µl Isopropanol ausgefällt und durch eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 13000 rpm sedimentiert. Das DNA Sediment wurde mit 400 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen. Anschließend wurden je 3 µl für analytische Restriktionsverdau oder Sequenzierungsreaktionen eingesetzt.

Midi-Präparation

100 ml LB Medium (mit z.B. 100 µg/ml Ampicillin) wurde mit sterilen Zahnstochern von einer LB-Agarplatte oder von Glycerolkulturen mit einem Klon beimpft und über Nacht (nicht länger als 15h) bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Durch eine 5 minütige Zentrifugation bei 4°C und 7000 rpm in einem GS3 Rotor (Sorvall) wurden die Bakterien geerntet, in 5 ml Lösung 1 resuspendiert und zusammen mit 50 µl RNase A [10 µg/µl] für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde 5 ml Lösung 2 zugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach 5 Minuten wurde die Fällung der Zelltrümmer und der chromosomalen DNA durch die Zugabe von 7,5 ml Lösung 3 eingeleitet. Wiederum nach 5 Minuten wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 16000 rpm (SW 34 Rotor, RT) zentrifugiert und der Überstand durch Gaze in ein neues Gefäß filtriert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die Plasmid DNA ausgefällt und über eine weitere Zentrifugation bei 16000 rpm (SW 34 Rotor, 15 Minuten, RT) sedimentiert. Nach einer Waschung mit 5 ml 70% Ethanol wurde das Sediment getrocknet, in 1 ml H₂O aufgenommen, in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit 5 µl RNase A [10 µg/µl] einem weiteren RNA Verdau unterzogen (45 Minuten bei 37°C). Anschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung der RNase A und zur Abtrennung von anderen Proteinen einmal mit 900 µl Phenol und zweimal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Die so gereinigte DNA Lösung wurde mit 600 µl Isopropanol versetzt, gut gemischt und bei 13000 rpm für mindestens 15 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 400 µl 70% Ethanol nachgewaschen, getrocknet, in 500 µl H₂O resuspendiert und photometrisch vermessen.

2.2.1.4. Isolierung von DNA aus Säugerzellen mit dem Qiamp-Tissue Kit

Zur Aufreinigung von DNA aus Säugerzellen wurden die Zellen aus einer ca. 80% konfluenten 75 cm² Kulturflasche (nicht mehr als 1x10⁷ Zellen) abgelöst, für 5 Minuten bei 2000 rpm sedimentiert, in 200 µl PBS resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Dem Ansatz wurden 40 µl RNase A (10 mg/ml) zugegeben. Nach 30 Minuten bei 37°C wurden dem Ansatz 25 µl Proteinase K Lösung sowie 200 µl Puffer AL zugesetzt (Kit Komponenten), kräftig gemischt (Vortexer) und dann für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Daraufhin wurden 210 µl Ethanol zugegeben, erneut kräftig gemischt und der Ansatz dann für 1 Minute bei 13000 rpm über die mitgelieferten Zentrifugationssäulen filtriert (Tischzentrifuge). Bei zwei weiteren Zentrifugationen (1 Minute,

13000 rpm) wurden die Säulen mit je 500 µl AW- Puffer (Kit Komponente) gewaschen. Dann wurden 200 µl H₂O (mit einer Temperatur von 70°C) aufgetragen und die an die Säule gebundene DNA durch eine Inkubation von 5 Minuten bei 70°C gelöst. Durch eine weitere kurze Zentrifugation (1 Minute, 13000 rpm) wurde die DNA schließlich in einem neuen Gefäß aufgefangen.

2.2.1.5. Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in einer Lösung läßt sich mit Hilfe eines Spektrophotometers bestimmen. Hierbei wird die Extinktion einer Probe bei der Wellenlänge 260 nm, dem Absorptionsmaximum des Π -Elektronen Bindungssystems der DNA Basen, bestimmt. Bei einer solchen Messung entspricht eine OD Einheit (OD = optical density) 50 µg/ml dsDNA, beziehungsweise 40 µg/ml ssDNA und 35 µg/ml RNA. In der Regel wurden die Proben 1:200 in H₂O verdünnt und nach dem H₂O-Nullwert-Abgleich vermessen. Die DNA Konzentration berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\text{OD-Wert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionsfaktor (50, 40 oder 35)} = x \text{ µg/ml}$$

Da auch andere Π -Elektronen Bindungssysteme bei dieser Wellenlänge absorbieren (z.B. Phenol, Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten, d.h. Proteine), ist es ratsam die Probe auch bei einer Wellenlänge von 280 nm zu vermessen. Für reine DNA sollte der Quotient aus den beiden Meßwerten im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.1.6. Sequenzierung von Plasmid DNA mit AmpliTaqFS

DNA Sequenzierungen wurden mit dem von Applied Biosystems vertriebenen „Ready Reaction Cycle Sequencing Kits“ mit Ampli Taq®FS Polymerase nach folgendem Protokoll durchgeführt: Für eine Sequenzierung wurden üblicherweise 500 ng Plasmid DNA zusammen mit 10 pmol Primer und 2 µl Big-Dye Mix in einem 10 µl Ansatz eingesetzt und im Thermocycler über 25 Zyklen amplifiziert:

Denaturierung	30''	96°C
Hybridisierung	15''	50°C
Elongation	4'	60°C

Nach der PCR Reaktion wurde der Ansatz mit H₂O auf 100 µl erweitert, mit 10 µl 3 M Na-Azetat (pH 5,2) und 250 µl Ethanol versetzt, gut gemischt und dann für 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge). Der Überstand wurde hierbei sowie bei den zwei weiteren folgenden Waschschritten (mit jeweils 250 µl 70% Ethanol, 20 Minuten Zentrifugation bei 13000

rpm) sorgsam abgesaugt. Anschließend wurde das Sediment kurz getrocknet (3-5 Minuten), in 15 µl TSR Puffer aufgenommen, 2 Minuten bei 95°C denaturiert und direkt auf Eis gestellt. Daraufhin wurde der Ansatz in ein Sequenziergefäß überführt und mit dem ABI 310 Kapillarsequenziergerät analysiert.

2.2.1.7. Sequenzierung von PCR Produkten

Vor der Verwendung von PCR Produkten für Sequenzierungen wurden diese einer Fällung mit Ammoniumazetat unterzogen. Dabei werden kleine Moleküle (z.B. Primer), die unter diesen Bedingungen nur schlecht ausfallen, entfernt. Ein Volumen des PCR Produkts wurde mit der gleichen Menge 4 M Ammoniumazetat und 6 Volumina Ethanol versehen, gemischt und für 30 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge). Nach zwei Waschschritten mit je 250 µl 70% Ethanol wurde das Sediment getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Für die Sequenzierung wurden dann zwischen 2 und 4 µl eingesetzt.

2.2.1.8. Restriktionsverdau

Um Plasmid DNA an definierten Stellen zu spalten, werden sogenannte Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die spezifische DNA Sequenzen erkennen und an dieser Stelle oder in der Nähe davon schneiden. In der Praxis werden diese Enzyme zu analytischen Zwecken (zur Identifizierung eines speziellen Plasmids anhand des resultierenden charakteristischen Bandenmusters) oder zu präparativen Zwecken (zur Gewinnung eines spezifischen Spaltprodukts im Rahmen einer Klonierung) eingesetzt. Ein typischer Reaktionsansatz sieht etwa wie folgt aus:

0,5-10 µg DNA

1/10 des Gesamtvolumens 10x Reaktionspuffer gemäß den Angaben des Herstellers

x U des Enzyms

ad 30-50 µl H₂O

Eine Enzymeinheit U ist definiert als die Menge des Enzyms, die benötigt wird unter optimalen Bedingungen innerhalb von einer Stunde 1 µg λ-DNA zu verdauen. In der Regel gibt man einen leichten Überschuß des jeweiligen Enzyms zu (also zum Beispiel 15 U für den Verdau von 3 µg DNA). Allerdings muß hierbei darauf geachtet werden, daß das Enzymvolumen nicht 1/10 des Gesamtvolumens übersteigt, weil das im Lagerpuffer des Enzyms enthaltene Glycerin sich negativ auf die Effizienz und Spezifität der Spaltung auswirken kann.

2.2.1.9. Agarose Gelelektrophorese

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von Nukleinsäuren wurde die Agarose Gelelektrophorese verwendet. Bei diesem Verfahren lassen sich Fragmente verschiedener Länge

wegen ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, bequem voneinander trennen. Besonders vorteilhaft ist der große Auftrennungsbereich von Agarosegelen, der bei einem 1%igen Gel zwischen 1 kB und 10 kB liegt. Zur Trennung von DNA Stücken mit weniger als 1000 Basen wurden höhere Agarose Konzentrationen gewählt (bis ca. 2,5% bei 100 bp DNA Stücken), während bei zunehmend größeren Fragmenten die Agarose Konzentration verringert wurde (z.B. 0,6% ab 4 kB). Die entsprechende Menge an Agarose wurde eingewogen und durch Aufkochen in TAE Puffer gelöst. Kurz vor dem Gießen des Gels wurde Ethidiumbromid in das noch flüssige Gel pipettiert (5 µl [10 mg/ml] für 100 ml Gel). Das erkaltete Gel wurde bei einer Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand zur Auftrennung der DNA verwendet. Anschließend konnte die DNA aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids mit einem UV Transilluminator sichtbar gemacht werden.

2.2.1.10. Präzipitation von DNA

Zur Aufkonzentrierung von DNA Lösungen oder gegebenenfalls zum Pufferwechsel oder zur Entsalzung wurden Ethanolfällungen durchgeführt. Dabei entzieht Ethanol in Verbindung mit erhöhter Salzkonzentration den DNA Molekülen die Hydrathülle, was zu deren Aggregation und Präzipitation führt. Ein typischer Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen: Der DNA Lösung wurde 1/10 Vol. 3 M Natriumazetat (pH 5,8) und 2,5 Vol. Ethanol zugegeben. Anschließend wurde die Lösung gut gemischt und mindestens 15 Minuten bei RT und 13000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge, längere Zentrifugationszeiten erhöhen die Ausbeute). Danach wurde der Überstand verworfen, das Sediment einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in der gewünschten Menge H₂O aufgenommen.

2.2.1.11. Extraktion von DNA mit Phenol bzw. Chloroform

Zur Abtrennung von Proteinkontaminationen aus wässrigen DNA Lösungen und zur Inaktivierung von Enzymen wurden Extraktionen mit Phenol und Chloroform durchgeführt. Dabei wurde die DNA Lösung zunächst mit dem gleichen Volumen Phenol versetzt, intensiv durchmischt (vortexen für 15 Sekunden), und anschließend 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge). Die obere, wäßrige Phase wurde sorgfältig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dann in gleicher Weise noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Hier wurde ebenfalls jeweils nach der Zentrifugation die obere wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurde die extrahierte DNA Lösung zur Konzentrierung mit Ethanol präzipitiert.

2.2.1.12. Dephosphorylierung von DNA mit CIAP

Um bei Klonierungen zu verhindern, daß der linearisierte Vektor mit sich selber religieren kann, ohne das gewünschte Insert aufzunehmen, wurden die 5' Enden des Vektors mit dem Enzym „calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)“ dephosphoryliert. Da das Enzym in allen gängigen Restriktionspuffern aktiv ist wurde jeweils am Ende des Restriktionsverdau 1 µl (1 U/µl, MBI) des Enzyms in den Reaktionsansatz pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde der Ansatz auf eine EDTA Konzentration von 5 mM gebracht und die CIAP für 10 Minuten bei einer Temperatur von 75°C inaktiviert.

2.2.1.13. Auffüllen von überhängenden 5' Enden mit dem Klenow Enzym

Für bestimmte Klonierungsstrategien war es erforderlich, einzelsträngige 5' Überhänge mit dem Klenow Enzym aufzufüllen. Dabei verwendet die 5'-3'-Polymerase Aktivität des Klenow Enzyms die im Reaktionsansatz vorhandene dNTP's, um das rezessive Ende aufzufüllen. Das entstehende glatte DNA Ende („blunt end“) kann anschließend mit einem anderen glatten Ende ligiert werden. Zunächst wurde ein typischer Restriktionsverdau (3-7 µg DNA in einem Volumen von 30 µl H₂O) mit dNTP's versetzt (Endkonzentration [0,5 mM]), gut gemischt und der Ansatz für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde 0,5-1 µl Klenow Polymerase (10 U/µl, MBI) zupipettiert und der Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur gehalten. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz abschließend mit H₂O auf ein Volumen von 200 µl erweitert, mit Phenol und Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

2.2.1.14. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht es, in kurzer Zeit große Mengen eines ganz spezifischen DNA Stücks herzustellen. Zunächst wird die DNA in einer Denaturierungsphase durch hohe Temperatur (95°C) in Einzelstränge zerlegt. Daraufhin bindet ein Paar von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) in der Hybridisierungsphase der Reaktion bei geeigneten Temperaturen (z.B. 55°C) über komplementäre Basenpaarung an die Zielsequenz. In der Elongationsphase synthetisiert eine thermostabile Polymerase (z.B. Taq) die Zielsequenz zwischen den Primern. Dieser Reaktionszyklus wird mehrfach hintereinander (typischerweise 25-35 Mal) wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Anreicherung der Zielsequenz im Reaktionsgemisch kommt, die dann für Klonierungen weiterverwendet werden kann. Je nach Bedarf ist es möglich über geeignete Primerwahl spezifische Mutationen in die Zielsequenz einzuführen, oder über zusätzlich kodierte Schnittstellen an den Enden der Primer die nachfolgende Klonierung der Sequenz zu erleichtern. Nachfolgend ist ein typischer Reaktionsansatz beschrieben, wie er für Klonierungszwecke verwendet wurde.

100 ng Plasmid DNA (500 ng genomischer DNA)
5 µl Opti Perform buffer III (10x)
10 µl Opti Zyme Enhancer (5x)
1,5 µl MgCl₂ [50 mM]
1 µl dNTP's [10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP]
1 µl Primer 1 [50-100 pmol]
1 µl Primer 2 [50-100 pmol]
0,5 µl Power Script (1 U/µl, Pan Systems)
ad 50 µl mit H₂O

Diese Komponenten wurden möglichst auf Eis in ein PCR Eppendorfgefäß überführt, gegebenenfalls mit Mineralöl überschichtet und dann in der PCR Maschine zum Beispiel nach folgendem Protokoll amplifiziert:

45'' 95°C Denaturierung
45'' 55°C Hybridisierung ("Annealing")
1'/kB 72°C Elongation

Bei genomischer DNA als Ausgangsmaterial für die PCR Reaktion wurde dem Reaktionszyklus eine 3-5 Minuten lange Denaturierungsphase vorgeschaltet, um die DNA möglichst vollständig zu denaturieren. Nach der Amplifikation wurde das PCR Produkt mit Chloroform extrahiert, Ethanol gefällt und dann zum Beispiel in einen Restriktionsverdau eingesetzt.

2.2.1.15. Elution von DNA Fragmenten mit dem Geneclean Kit

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde das von BIO101 vertriebene Geneclean III Kit verwendet, das sich für die Aufbereitung von DNA Stücken mit einer Größe von mehr als 200 bp eignet. Dabei wurde zunächst das gewünschte DNA Fragment mit einer Rasierklinge aus dem Agarosegel geschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 3 Volumina NaI-Lösung zugegeben und der Agaroseklumpen bei 55°C eingeschmolzen. Je nach Menge der in der Probe vorhandenen DNA wurden 5 µl EZ-Glasmilch (Geneclean III Kit Komponente) zugegeben (für Lösungen mit 5 µg oder weniger DNA), das Reaktionsgefäß wiederholt geschüttelt und für mindestens 5 Minuten auf Eis gehalten. Unter diesen Bedingungen bindet die DNA selektiv an die Silikatmatrix. Danach wurde der Ansatz kurz zentrifugiert (10 Sekunden 13000 rpm, Tischzentrifuge), der Überstand verworfen und das Sediment insgesamt dreimal mit je 700 µl New-Wash-Puffer (Geneclean III Kit Komponente) gewaschen und dann getrocknet. Schließlich wurde das Sediment in 10 µl H₂O aufgenommen und die DNA während einer 3 minütigen Inkubation bei 55°C aus der Glasmilch gelöst, durch Zentrifugation von der

Glasmilch getrennt und in ein neues Gefäß überführt. Um die Ausbeute zu erhöhen wurde die Elution mit 10 µl H₂O wiederholt und die beiden Ansätze vereinigt.

2.2.1.16. Elution von DNA Fragmenten mit dem MERmaid Kit

Zur Aufreinigung von kurzen DNA Stücken mit einer Länge zwischen 10 und 200 bp wurde das MERmaid Kit von BIO101 verwendet. Hierbei wurde das ausgeschnittene Agarosestück zusammen mit dem dreifachen Volumen High Salt Binding Solution (Kit Komponente) und 5 µl MERmaid Glassfog (pro µg zu reinigender DNA) in ein Eppendorfgefäß überführt und für 10-15 Minuten kräftig geschüttelt. Unter diesen Bedingungen und unterstützt durch das starke Schütteln löst sich das Agarosegel auf und die freigesetzte DNA bindet an die Silikatmatrix. Nach der Bindungsphase wurde zentrifugiert (10 Sekunden bei 13000 rpm, Tischzentrifuge), das Sediment einmal mit 200 µl High Salt Binding Solution und zweimal mit 300 µl Ethanol Wash gewaschen, anschließend getrocknet und in 10 µl H₂O resuspendiert. Zur Elution der DNA wurde das Gemisch 3 Minuten bei 55°C gehalten, abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Um die Effizienz der Elution zu steigern wurde der Vorgang einmal mit 10 µl H₂O wiederholt und die Ansätze vereinigt.

2.2.1.17. Ligation linearer DNA Fragmente mit T4 Ligase

In Klonierungsexperimenten wurden mit Hilfe der T4 DNA Ligase verschiedene lineare DNA Fragmente miteinander verbunden. Die T4-Ligase eignet sich hierfür besonders gut, weil sie unter Standardbedingungen sowohl glatte als auch kohäsive Enden miteinander verknüpfen kann. Bei der ATP abhängigen Reaktion wird eine neue Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-Hydroxyl und der 5'-Phosphatgruppe zweier DNA Stücke geschlossen. In der Regel wurden 100 ng Vektor DNA im molaren Verhältnis 1:1 bis 1:3 mit der Insert DNA ligiert:

100 ng Vektor DNA
x µl Insert DNA (molares Verhältnis 1:1-1:3)
2 µl Ligase Puffer (10x)
1 µl T4 Ligase (1 U/µl, MBI)
ad 20 µl mit H₂O

Die Reaktion wurde über Nacht bei 16°C (kohäsive Enden) bzw. bei 14°C (glatte Enden) inkubiert.

2.2.2. Proteinexpression und Analyse in eukaryotischen Zellen

2.2.2.1. CaPO₄ Transfektion

Unter Transfektion versteht man das Einbringen fremder Nukleinsäuren (z.B. DNA in Plasmidform) in eukaryotische Zellen. Gelangen die fremden Nukleinsäuren unter geeigneten

Bedingungen in die Zielzelle, erfolgt, wenn die entsprechenden cis-aktiven Sequenzen vorhanden sind, unter Verwendung des zellulären Transkriptions- bzw. Translationsapparates die Expression der neu in die Zellen eingebrachten Gene. Allerdings handelt es sich hierbei nur um eine vorübergehende (transiente) Expression, da die fremden Nukleinsäuren im Laufe der fortlaufenden Zellteilungen verloren gehen. Bei der CaPO₄ Transfektionsmethode präzipitiert die DNA im Reaktionsgemisch gebunden an CaPO₄ Kristalle und wird über einen im einzelnen noch nicht verstandenen Mechanismus in die Zelle aufgenommen und dort zur Expression gebracht. Für die Proteinexpressionsstudien und andere in dieser Arbeit durchgeführte Experimente wurden 293T Zellen nach der CaPO₄ Methode in Anlehnung an die von Pear bzw. Soneoka beschriebene Vorgehensweise transfiziert (Pear et al., 1993; Soneoka et al., 1995). Die 293T Zellen sind von 293 Zellen (Humane embryonale Nierenzellen, ATCC: CRL-1573) abgeleitet und exprimieren stabil das SV40 Large-T-Antigen (Du Bridge et al., 1987). Dadurch werden Plasmide mit dem SV40-Replikationsursprung (ORI) in diesen Zellen zusätzlich durch das T-Antigen repliziert und damit die auf diesen Plasmiden kodierten Protein noch stärker exprimiert. Eine typische Transfektion wurde wie bei Pear oder Soneoka beschrieben (Pear et al., 1993; Soneoka et al., 1995), durchgeführt: Am Tag vor der Transfektion wurden 2×10^6 293T Zellen in 6 cm Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Morgen wurde direkt vor der Transfektion das Kulturmedium abgesaugt und gegen 4 ml Medium, das vorher über Nacht im Brutschrank in bezug auf Temperatur und pH Wert voräquilibriert wurde, ausgetauscht. Anschließend wurde der Transfektionsmix hergestellt, mit 500 µl 2x HBS (ca. 20°C) vermischt und direkt danach tropfenweise (293T Zellen lösen sich leicht ab) aufgetragen.

Transfektionsmix: 15 µg Plasmid DNA
62 µl 2 M CaCl₂ steril
ad 500 µl mit H₂O steril

Frühestens 8 Stunden nach Transfektionsbeginn, in der Regel gegen Abend, wurde die Transfektion durch einen erneuten Mediumwechsel gestoppt. Bei der Transfektion von Plasmiden mit einem CMV Promotor wurde die Expression durch die Induktion mit Na-Butyrat zusätzlich stimuliert. Dazu wurde dem Kulturmedium 24 h nach Transfektionsbeginn Na-Butyrat in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Weitere 8 Stunden später wurde die Induktion durch einen weiteren Mediumwechsel beendet. Zu diesem Zeitpunkt, also 32 h nach Transfektionsbeginn und für die nächsten ca. 24 h, erreicht die Expression von den transfizierten Plasmiden ihre maximale Stärke. Aus diesem Grund wurden die transfizierten Zellen in diesem Zeitfenster für die verschiedenen anschließenden Experimente verarbeitet.

2.2.2.2. Herstellung von Zellysaten

Zellysate für Western Blots

Um die Proteinexpression in eukaryotischen Zellen mit Hilfe von Western Blots zu überprüfen, wurden folgende Bedingungen bei der Zellyse eingesetzt. Auf die Verwendung von Proteaseinhibitoren wurde verzichtet, da die Proben direkt nach der Lyse entweder eingefroren oder direkt aufgetragen wurden. Zunächst wurden die Zellen (z.B. 293T Zellen nach Transfektion in einer 6 cm Kulturschale) mit 1 ml PBS gewaschen und dann anschließend auf Eis mit 1 ml RIPA Puffer für mindestens 10 Minuten lysiert. Anschließend wurden 400 µl des Lysats in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 400 µl 2x PPP versetzt, 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und anschließend eingefroren oder auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (50 µl).

Zellysate für Radioimmunopräzipitationen (RIPA)

Für eine erfolgreiche Immunopräzipitation ist die Zellyse von entscheidender Bedeutung. Ziel ist es, Bedingungen zu finden, welche die Solubilisierung des Zielantigens in strukturell intakter und somit immunoreaktiver Form ermöglichen. Verschiedene Variablen beeinflussen diesen Prozeß und können je nach Bedarf auf das jeweilige Antigen angepaßt werden (Salzkonzentration, pH-Wert des Lysispuffers, Art und Konzentration des Detergenz). Da während des Lyseprozesses Proteasen in aktiver Form aus der Zelle freigesetzt werden, ist es wichtig, bei der Lyse selbst und bei der anschließenden Immunopräzipitation möglichst zügig und auf Eis zu arbeiten. Zusätzlich empfiehlt es sich, den Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren zu versehen, um der Degradation des Zielproteins vorzubeugen. Bei der initialen Zellyse wurde in dieser Arbeit bewußt auf den Einsatz der Detergentien SDS und Na-Deoxycholat verzichtet, um zu vermeiden, daß genomische DNA in größeren Mengen aus dem Zellkern freigesetzt wird, da dies durch eine drastische Erhöhung der Viskosität des Lysats zu Schwierigkeiten bei der Weiterverarbeitung der Proben führen kann. In der Regel wurde unter folgenden Bedingungen lysiert: 48 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen (z.B. 293T Zellen in einer 6 cm Kulturschale) einmal mit 600 µl PBS gewaschen und anschließend durch die Zugabe von 600 µl Lysispuffer auf Eis für mindestens 10 Minuten lysiert.

Lysispuffer	Proteaseinhibitoren /ml Puffer		
Endkonz.			
10 mM Tris HCl pH8,0	EDTA 0,5 M	3 µl	1,5 mM
140 mM NaCl	PMSF 10 mg/ml	16 µl	160 µg/ml
0,025% NaN ₃	Leupeptin 0,5 mg/ml	1 µl	0,5 µg/ml
1% Triton X 100	Pepstatin 700 µg/ml	1 µl	0,7 µg/ml

(0,1% SDS, nur bei Lysaten, die für Biotinylierungsexperimente verwendet wurden)

Das Lysat wurde von der Platte in ein Eppendorfgesäß überführt und 3 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Daraufhin wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, in dem 60 µl 10% Na-Deoxycholat- 1% SDS Lösung vorgelegt war, gemischt und bei -80°C eingefroren oder direkt für die Immunopräzipitation eingesetzt (100-300 µl).

2.2.2.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Zum Auftrennen von Proteinen nach ihrer Größe wurde die diskontinuierliche Tricine SDS-PAGE verwendet. Dabei wurden die Proben zunächst durch Aufkochen in Probenpuffer komplett denaturiert und anschließend elektrophoretisch durch das diskontinuierliche Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Porengröße des Gels und damit den Bereich optimaler Trennung kann man bei dieser Art von Gelen durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid ("crosslinker") sowie durch die absolute Menge dieser beiden Reagenzien variieren. Bei den für dieser Arbeit verwendeten Gelen wurde immer bereits fertig angesetzte Acrylamid/Bisacrylamid Lösung verwendet (Acrylamid: Bisacrylamid 37,5:1, Gel 30 Rotiphorese, Roth) und die Porengröße des Gels deshalb über die absolute Konzentration eingestellt:

Acrylamidkonzentration (%) (Acrylamid:Bisacrylamid 29:1)	Linearer Trennungsbereich (kD)
15	12-43
10	16-68
7,5	36-94
5	57-212

In der Regel wurden 7,5% Gele nach folgendem Schema gegossen (Ansatz für ein Gel):

	Trenngel 7,5%	Sammelgel 4%
30% PAA (Gel 30, Roth)	5 ml	2,65 ml
Tricine Gelpuffer	6,6 ml	5 ml
Glycerol	2,2 ml	-
H₂O	6,25 ml	12,3 ml

Nachdem alle Komponenten gut vermischt waren, wurde die Polymerisierung des Trenngels durch die Zugabe von 200 µl APS (Radikalbildner) in Verbindung mit 20 µl TEMED (katalysiert

Radikalbildung des APS) gestartet und das noch flüssige Gel in die vorgesehene Kammer gegossen und mit etwas H₂O überschichtet. Nach der Auspolymerisierung des Trenngels (mindestens 1 Stunde) wurde die H₂O Schicht entfernt, beim Sammelgel in gleicher Weise die Polymerisierung eingeleitet, und das flüssige Gel bis zum Rand der Kammer eingefüllt. Schließlich wurde zur Ausbildung von Geltaschen ein Kamm eingeschoben. Nach einer weiteren Stunde Polymerisierungszeit wurden die Pufferreservoirs mit Kathodenpuffer (obere Kammer) bzw. Anodenpuffer (untere Kammer) gefüllt, die Proben 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht, in die Geltaschen geladen und anschließend bei 30-35 mA (pro Gel) über Nacht aufgetrennt.

2.2.2.4. Western Blot

Beim Western Blot Verfahren werden die im SDS-Polyacrylamid-Gel nach der Elektrophorese aufgetrennten Proteine durch elektrischen Strom aus dem Gel gelöst und auf eine Nylon- oder Nitrozellulosemembran überführt ("geblottet"). Auf dieser Membran können im Anschluß daran, spezifische Proteine mit den entsprechenden Antikörpern detektiert werden. Dabei wird das gesuchte Protein indirekt nachgewiesen: Zunächst bindet ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) das gesuchte Protein. Im Anschluß daran wird wiederum der gebundene Primärantikörper durch einen gegen die Fc-Region gerichteten Sekundärantikörper erkannt. Der Nachweis dieser Bindung erfolgt über eine an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase, die unter Emission von Lichtquanten einen im Detektionsreagenz enthaltenen Stoff oxidiert (z.B. ECL-Kit, Luminol). Die Lichtemission wird durch die Exposition mit einem Röntgenfilm festgehalten. Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurde der Western Blot nach dem „semidry“-Verfahren durchgeführt. Die Apparatur wurde in horizontaler Stellung folgendermaßen aufgebaut:

Kathodenplatte (im Deckel der Apparatur)

2 Lagen Whatmanpapier (vorher 10 Minuten in Blotpuffer getränkt)

Gel

Nitrozellulosemembran (vorher 10 Minuten in Blotpuffer getränkt)

2 Lagen Whatmanpapier (vorher 10 Minuten in Blotpuffer getränkt)

Anodenplatte (Basis der Apparatur)

Durch das Anlegen einer Stromstärke von 150 mA über 90 Minuten hinweg wurden die Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert. Nach dem „Blotten“ wurde die Apparatur abgebaut, die Membran kurz mit PBS gespült und dann für 1 Stunde in PBS mit 5% Magermilchpulver eingelegt und leicht geschwenkt. Dabei werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit Proteinen aus der Milch abgesättigt. Nach diesem "Blockierungsschritt" wurde die Membran kurz in PBS mit 0,5% Tween 20 gespült und dann mit dem Primärantikörper inkubiert (1:100-1:1000 Verdünnung des Antikörpers in PBS+5%Milchpulver, für 1 Stunde bei leichtem Schwänken).

Danach wurde dreimal für je 10 Minuten mit PBS+0,5% Tween 20 gewaschen und die Membran anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert (z.B. 1:1000 Verdünnung eines HRP gekoppelten Schwein α -Hase-IgG Antikörpers in PBS+5% Milch, für 1 Stunde bei leichtem Schwänken). Wiederum wurde dreimal für je 10 Minuten mit PBS+0,5% Tween gewaschen. Nach kurzem Spülen der Membran in PBS wurde durch ersten und zweiten Antikörper spezifisch markiertes Protein über das ECL Kit und Chemolumineszenz nachgewiesen.

2.2.2.5. Radioimmunopräzipitation (RIPA)

Bei der Radioimmunopräzipitation wird radioaktiv markiertes Protein selektiv in nativer Form über eine spezifische Antikörperbindung erkannt. Anschließend wird der Antigen-Antikörperkomplex durch die Bindung an Protein A-Sepharose Kügelchen (Protein A SepharoseTM CL-4B, Amersham) aus dem Gesamtzellsat präzipitiert, in mehreren Waschschritten gewaschen und schließlich über SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Gel getrocknet und die spezifisch erkannten Proteine über Autoradiographie detektiert. Als Ausgangsmaterial für die RIPA wurden in der Regel transfizierte 293T Zellen eingesetzt.

Radioaktive Markierung zellulärer Proteine

32 Stunden nach Transfektionsbeginn, also am Ende der Proteininduktionsphase durch Na-Butyrat, wurden die 293T Zellen (in einer 6 cm Kulturschale) radioaktiv markiert. Dazu wurden die Zellen zunächst für eine Stunde in 3 ml "Hungermedium" (MEM Meth⁻, Cyst⁻) gehalten und anschließend durch einen Mediumwechsel über Nacht in 2 ml "Markierungsmedium" kultiviert.

Markierungsmedium:

MEM komplett, Meth⁻, Cyst⁻

10% dFCS

10% MEM komplett

5-7,5 μ l Promix pro ml Medium

(³⁵S-Methionin, ³⁵S-Cystein, 14,3 μ Ci/ μ l, Amersham)

Je nach Bedarf wurde die Markierungsphase unter Umständen auch verkürzt und die Zellen bereits früher nach dem oben beschriebenen Protokoll lysiert.

Präzipitation spezifischer Proteine aus Zellsaten

Für die Präzipitationen wurden jeweils 100-300 μ l des RIPA Lysats eingesetzt und zunächst mit 3 μ l eines Präimmunserums (möglichst aus der gleichen Spezies wie das später verwendete Immunserum) versetzt und daraufhin bei 4°C für 1 Stunde auf einem Rotor gedreht. Unspezifisch an Antikörper bindende Proteine wurden dann durch eine Präzipitation der Antikörper des

Präimmunserums mit Hilfe von Protein A Sepharose Kügelchen (Protein A Sepharose™ CL-4B, Amersham) aus dem Lysat gefällt. Dazu wurden die Protein A Sepharose Kügelchen zunächst in einem Falcon Röhrchen in 10 ml RIPA Puffer auf dem Rotor bei 4°C vorgequollen (ca. 10 Minuten), anschließend abzentrifugiert (2000 rpm, 5 Minuten, Hettich Zellkulturzentrifuge) und mit RIPA Puffer aufgenommen, so daß eine 1:1 Mischung (v/v) entsteht. Insgesamt wurden bei den Präzipitationen jeweils 5 mg Protein A Sepharose pro Probe verwendet. Die Ansätze wurden wieder für 1 Stunde auf dem Rotor bei 4°C gedreht, danach 3 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert (Tischzentrifuge), und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Diese voradsorbierten Lysate wurden dann mit jeweils 3 µl des spezifischen Immunserums versehen (z.B. polyklonale Hasenserum, oder Serum infizierter Schimpansen) und erneut unter den oben genannten Bedingungen für 2 Stunden gedreht. Anschließend wurden die spezifischen Antigen-Antikörperkomplexe wie oben beschrieben mit Protein A Sepharose (2 h auf dem Rotor) präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (3 Minuten 13000 rpm, Tischzentrifuge) wurde der Überstand verworfen und das Protein A Sepharose Sediment dreimal mit je 1 ml RIPA Puffer und einmal mit 1 ml NP-40 Puffer gewaschen, in 50 µl 2x PPP aufgenommen und 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht, um die präzipitierten Antigene zu denaturieren und von Antikörpern und Protein A Sepharose zu lösen. Abschließend wurden die Proben auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt.

Detektion (Fluorographie)

Nach der Elektrophorese wurde das Gel sorgsam von den Glasplatten abgelöst, in eine Schale überführt und für 15-30 Minuten in 20-30 ml einer Fixierlösung eingeweicht. Im Anschluß daran wurde es für 30 Minuten in 20-30 ml Amplify (Amersham) eingelegt, unter Vakuum auf einem Gelrockner für 2 Stunden und 30 Minuten bei 80°C auf ein Whatmanpapier getrocknet und dann in einer lichtdichten Filmkassette gegen Röntgenfilm bei -80°C bis zur gewünschten Intensität der Signale exponiert.

2.2.2.6. Viruspartikelpräparation aus Zellkulturüberständen

Um die Freisetzung von HF-Viruspartikeln in den Kulturüberstand von Zellen biochemisch nachzuweisen, wurden die Überstände zunächst filtriert (Millipore Filter, Porengröße 0,45 µm), um grobe Zelltrümmer und Zellen abzutrennen. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig in Ultrazentrifugenröhrchen (Nunc, Ultra Tube 14x89 mm) auf ein 2 ml 20% Saccharosekissen aufgetropft. Die Röhrchen wurden in einem TH-641 Rotor für 3 Stunden bei 4°C und 25000 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugenlauf wurde die Flüssigkeit mit einer Pipette vorsichtig abgenommen, das Sediment (nicht sichtbar) mit 2x 25 µl 2x PPP resuspendiert und vor dem Laden in einem Eppendorfgefäß bei 95°C für 5 Minuten aufgeköcht. Je nach Ausgangsmaterial für die

Partikelpräparation wurde bei der Detektion unterschiedlich verfahren. Wurde der Überstand von transfizierten, radioaktiv markierten Zellen genommen (Bedingungen siehe 2.2.2.5), wurden die aufgereinigten Partikel über SDS-PAGE Gele aufgetrennt und die Signale über Fluorographie detektiert. Um ausreichend starke Signale zu erhalten, wurde der Überstand einer 6 cm Kulturschale mit transfizierten radioaktiv markierten 293T Zellen verwendet. Waren die Zellen dagegen nicht metabolisch mit ³⁵S Methionin/Cystein markiert, wurde der Überstand von 2-3 6cm Schalen vereinigt und in die Partikelpräparation eingesetzt. Freigesetzte Partikel wurden nach der Gelelektrophorese mit HFV Gag spezifischen Seren und Western Blot nachgewiesen.

2.2.2.7. „Pulse-Chase“ Analyse

Ziel einer „Pulse-Chase“ Analyse ist es, die Stabilität eines bestimmten Proteins in einer Zelle zu untersuchen. Dabei werden zunächst in mehreren Parallelansätzen unter gleichen Bedingungen für einen bestimmten Zeitraum (z.B. 1 Stunde) alle neu synthetisierten Proteine durch die Inkubation in ³⁵S-Methionin/Cystein-haltigem Medium markiert. Anschließend wird dieser „Pulse“ gleichzeitig bei allen Parallelansätzen beendet, indem durch einen Mediumwechsel die radioaktiven Aminosäuren entfernt werden. Daraufhin werden zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem „Pulse“ ein Parallelansatz nach dem anderen lysiert und eingefroren. Durch die RIP-Analyse der nach unterschiedlich langen Wartezeiten („Chase“, z.B. von 0, 4, 8 und 24 Stunden) genommenen Proben, ist es möglich die Stabilität des gewünschten Proteins im Zeitverlauf zu beobachten. Im einzelnen wurde für „Pulse-Chase“ Experimente folgendermaßen verfahren. Zunächst wurde ein Mehrfachtransfektionsansatz entsprechend der Anzahl der zu untersuchenden „Chase“ Zeitpunkte hergestellt (z.B. 4x Ansatz zur Analyse von 4 Zeitpunkten) und parallel in die verschiedenen Schalen (6 cm) transfiziert. Nach der Induktion der Proteinexpression durch Na-Butyrat (siehe 2.2.2.1) wurden die Parallelansätze zeitgleich mit 3 ml Hungermedium (MEM Meth⁻, Cyst⁻) gewaschen und dann für 1 Stunde in 3 ml Hungermedium gehalten. Danach wurde das Medium durch 2 ml Markierungsmedium ersetzt und die Zellen in der Regel für 1 Stunde bei 37°C markiert. Der Markierungs-„Pulse“ wurde bei den Parallelansätzen zeitgleich durch die Zugabe eines 10-fachen Überschusses der unmarkierten Aminosäuren Methionin und Cystein (Endkonzentrationen 1 mM, bzw. 2,5 mM; MEM enthält Methionin und Cystein normalerweise in einer Konzentration von 0,1 bzw. 0,25 mM), sowie durch Waschen mit 3 ml MEM (mit 10x Meth, Cyst Überschuss) beendet. Anschließend wurde die Probe für den 0 Stunden Wert nach dem RIPA Protokoll lysiert und eingefroren. Die übrigen Schalen wurden für die gewünschten Zeiten in MEM + 10x Meth, Cyst weiterkultiviert und erst dann lysiert. Vor der RIP-Analyse wurde die spezifische Aktivität der einzelnen Proben mit Hilfe eines β -Scintillationscounters (0,1 μ l Lysat auf 4 ml Rothiscint-

Lösung) bestimmt und dann jeweils gleiche Aktivitätsmengen in die RIPA eingesetzt, die nach oben beschriebenem Protokoll durchgeführt wurde (vgl. 2.2.2.5).

2.2.2.8. EndoH Verdau von Proteinen

Glykoproteine, die über das Endoplasmatische Retikulum in den sekretorischen Syntheseweg der Zelle gelangt sind, werden im Verlauf ihrer Reifung auf komplexe Weise durch das Anhängen von Zuckerresten modifiziert. Hierbei unterscheidet man N- bzw. O-verknüpfte Glykosilierungen, bei denen das Oligosaccharid mit Asparagin bzw. Serin oder Threonin verknüpft wird. Nach der kotranslationalen N-Glykosilierungen im ER werden die Kernoligosaccharide während des gerichteten Transports durch die einzelnen Zellkompartimente (ER, Cis-, Medial-, Trans-Golgi) durch das Abspalten und Anhängen von Zuckerreste umgeformt. Bei diesem Reifungsprozeß treten verschieden Zwischenformen auf, die unterschiedlichen zellulären Kompartimenten zugewiesen werden können und sich durch abweichende Sensitivität gegenüber dem Verdau mit spezifischen Glukosidasen auszeichnen. Diesen Sachverhalt macht man sich zunutze, um den intrazellulären Transport von Glykoproteinen zu untersuchen. So ist es beispielsweise durch die Verwendung des Enzyms Endoglukosidase-H möglich, gezielt unreife Zuckerketten von Glykoproteinen abzutrennen. Solange sich die untersuchten Proteine im ER und im Cis-Golgi aufhalten, liegen ihre Zuckerreste in einer Form vor, die durch EndoH abspaltbar ist. Gelangen sie allerdings in den medialen Teil des Golgikomplexes, werden ihre Zucker durch Mannosidase II oder III so verändert, daß sie ihre EndoH Sensitivität verlieren. Da sich die Abspaltung der Glykosilierung eines Proteins durch EndoH in Form von Mobilitätsänderungen bei SDS-PAGE Analysen bemerkbar macht, ist es möglich mit Hilfe dieses Enzyms, den Transport des jeweiligen Proteins aus dem ER heraus in den Golgikomplex zu beobachten. Um diesen Prozeß im Zeitverlauf studieren zu können, wurden die EndoH Verdaus mit „Pulse-Chase“ Experimenten verbunden (vgl.2.2.2.7). Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren: Zunächst wurden die Expressionskonstrukte der zu untersuchenden Proteine über Transfektion in 293T Zellen eingebracht. Im Anschluß an die „Pulse-Chase“ Markierungsphase wurde eine RIPA durchgeführt. Nach Abschluß der Waschstreps wurden den Protein A Sepharose Sedimenten 60 µl 5x EndoH Puffer zugegeben und die Ansätze für 2 Minuten bei 95°C aufgeköcht, um die präzipitierten Proteine von der Sepharose zu lösen und zu denaturieren. Nach einer kurzen Abzentrifugation des Kondensats (Tischzentrifuge) wurden 240 µl H₂O zugesetzt, erneut zentrifugiert (1', 130000 rpm) und dann der Überstand zu gleichen Teilen (je 140 µl) auf zwei neue Reaktionsgefäße überführt. Zu einem der beiden Parallelansätze wurden 4,5 µl EndoH (1x10⁻³ U/µl), zum anderen 4,5 µl H₂O pipettiert. Nach einer Inkubationsphase von 11-18 h bei 37°C wurden jeweils 4 µl Glykogen (20 mg/ml, Roche, Katalognummer: 901 393) und 1 ml EtOH (-20°C) zugegeben und gemischt. Die Ansätze wurden dann über Nacht bei -70°C

gefällt, das Präzipitat durch eine Zentrifugation (4', 4°C, 13000 rpm) sedimentiert und getrocknet. Abschließend wurden die Proben in 50 µl 2x PPP aufgenommen und über SDS PAGE aufgetrennt. Die Detektion wurde wie oben für die RIPA beschrieben durchgeführt.

2.2.2.9. Biotinylierung von Membranproteinen

Zur Analyse der Zelloberflächenexpression eines Proteins wurden Biotinylierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurden zunächst wie oben beschrieben (vgl. 2.2.2.1) 293T Zellen mit den Expressionskonstrukten für die jeweiligen Proteine transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen metabolisch mit ³⁵S-Methionin/Cystein markiert (vgl. 2.2.2.5). Vor der Zellyse nach dem RIPA Protokoll wurden durch den Einsatz von NHS-Biotin (Biotin-NHS, water soluble, Calbiochem, Kat.No 203118) alle an der Zelloberfläche befindlichen Proteine markiert. Bei dem verwendeten Reagenz handelt es sich um einen N-hydroxylsulfosuccinimidester (Sulfo-NHS) von Biotin, das unter Ausbildung einer neuen Amidbindung mit primären Aminogruppen von Proteinen reagiert und diese so mit einer Biotingruppe markiert. Die bei dem eingesetzten Biotinylierungsreagenz vorhandene Sulfonatgruppe bedingt zum einen die Wasserlöslichkeit, die dem experimentellen Einsatz der Verbindung sehr entgegenkommt, und zum anderen verhindert sie die Membrangängigkeit der Substanz. Auf diese Weise wird gewährleistet, daß nur Oberflächenproteine mit Biotin markiert werden (Cole et al., 1987). Biotinyliertes Protein wird später nach einem dem Western Blot ähnlichen Verfahren mit Hilfe von Streptavidin, einem Biotin bindenden Protein, detektiert. Da das verwendete Streptavidin (Streptavidin, Horseradish Peroxidase Conjugated, Pierce, Produktnummer: 21126) an Peroxidase gekoppelt ist, wurde auch hier, wie im Western Blot, zum Nachweis der Signale das ECL-Chemolumineszenz System verwendet.

Nach der ³⁵S-Methionin/Cystein-Markierungsphase wurden die Platten (6 cm Schalen) zunächst dreimal mit je 2 ml PBS (4°C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf den Platten für 30 Minuten in einem Eisbad mit einem Volumen von 2 ml biotinyliert. Das für die Biotinylierung eingesetzte Sulfo-NHS-Biotin wurde dabei erst direkt vor der Verwendung frisch in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS gelöst. Die Reaktion wurde durch die Zugabe eines Überschusses an primären Aminogruppen gestoppt (200 µl Glycin 1 M, in PBS). 10 Minuten später wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 600 µl Lysispuffer, der zusätzlich 0,1 M Glycin und 0,1% SDS enthielt für 10 Minuten auf Eis lysiert. Die Radioimmunopräzipitation sowie die SDS-PAGE wurden daraufhin, wie oben beschrieben, durchgeführt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde die Proteine wie bei einem Western Blot üblich nach dem „semidry“ Verfahren aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Nach dem „Blotten“ wurde die Membran kurz mit PBS gespült, in PBS⁻ mit 10% Milchpulver eingelegt und dann für 1 h auf einer

Wippe inkubiert. Daraufhin wurde dreimal kurz mit PBS⁻ gespült und anschließend dreimal für je 10 Minuten mit PBS⁻, 0,1% Tween 20 auf der Wippe gewaschen. Zur Detektion der biotinylierten Proteine wurde Streptavidin-HRP in einer 1:15000 Verdünnung in PBS⁻, 1% Tween 20 gelöst und für 45 Minuten bei 4°C mit der Membran inkubiert. Daraufhin wurde erneut dreimal für je 10 Minuten gewaschen (in PBS⁻, 1% Tween 20) und einmal mit PBS⁻ gespült. Biotinylierte Oberflächenproteine wurden abschließend mit Hilfe des ECL Kits und Chemolumineszenz nachgewiesen. Nach dem Abklingen dieses Signals (8 h) wurde die Membran gegen Röntgenfilm abgelegt. Auf diese Weise war es möglich die Oberflächenexpression eines bestimmten Proteins (Biotinsignal, Chemolumineszenz), mit der gesamten zellulären Expression (radioaktives Signal, Autoradiographie) zu vergleichen. Dazu wurden die jeweiligen Signalstärken mit Hilfe eines Scanners (AGFA Snapscan 1236S) bzw. eines Phosphorimagers ermittelt, und über das Programm ImageQuant ausgewertet.

2.2.3. Zellkultur

2.2.3.1. Kultivierung von Säugerzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in Kulturflaschen kultiviert. Dabei wurden für die jeweiligen Zelllinien folgende Medien eingesetzt:

Zelllinie	Kulturmedium	Zusatz
293T	MEM	10% FCS Glutamin (Medienküche) Penicillin/Streptomycin-Mix (Pen-Strep)
HT1080, HT1080-NLS-LacZ	DMEM mit Na-Pyridoxin, GibcoBRL Katalognummer: 41966-029	10% FCS Pen-Strep
NIH-3T3	DMEM mit Na-Pyridoxin, GibcoBRL Katalognummer: 41966-029	10% CS Pen-Strep
BHK-LTR-LacZ	MEM	5% FCS Glutamin Pen-Strep

Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellen. Sobald die Zellen einen zu ca. 80% konfluenten Zellrasen bildeten wurden sie mit ATV abgelöst, 1:3-1:20 verdünnt und neu ausgesät.

Einfrieren eukaryotischer Zellen

Um eukaryotische Zellen über längere Zeiträume konservieren zu können, wurden diese eingefroren und in mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tanks aufbewahrt. Dazu wurden die adhärenenten Zellen zunächst durch ATV von der Kulturflasche abgelöst, in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und bei 1500 rpm in einer Hettich Zentrifuge 5 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen gegeben und zunächst bei -80°C eingefroren. Einen Tag nach dem Einfrieren wurden die Zellen in die Stickstofftanks überführt und dort gelagert.

Auftauen eukaryotischer Zellen

Beim Auftauen von eukaryotischen Zellen ist es wichtig, diese möglichst umgehend aus dem DMSO enthaltenden Einfriermedium in normales Kulturmedium zu überführen. Deshalb wurden die Zellen direkt nach der Entnahme aus dem Stickstofftank bei 37°C aufgetaut und sofort in ein vorbereitetes Falcon Röhrchen mit dem entsprechenden Kulturmedium pipettiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 Minuten, 1500 rpm, Hettich Zentrifuge), in frischen Kulturmedium aufgenommen und in Kulturflaschen angesät.

2.2.3.2. Generierung viraler Überstände zur Transduktion von Zielzellen

Zur stabilen Transduktion von Zielzellen wurde ein auf retroviralen Gentransfer durch replikationsdefekte murine Leukämieviren beruhendes System verwendet (Soneoka et al., 1995). Bei diesem Verfahren werden zunächst alle für die Viruspartikelbildung benötigten Komponenten durch Kotransfektion in 293T Zellen eingebracht (vgl. 2.2.2.1). Dabei sind die Bestandteile des Systems auf drei verschiedene Plasmiden aufgeteilt (Gag-Pol-Verpackungskonstrukt pHIT60, Env-Verpackungskonstrukt pHIT123, retroviraler Vektor mit dem jeweiligen Zielgen), um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, daß sich über Rekombinationsereignisse replikationsfähige Helferviren bilden. Die verwendeten Plasmide enthalten jeweils einen SV40 ORI, so daß es nach der Transfektion in 293T Zellen, die das SV40 T-Antigen exprimieren (Du Bridge et al., 1987), zu einer Replikation der transfizierten Plasmide kommt, was entsprechend zu einer gesteigerten Genexpression führt.

Achtundvierzig Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand der Zellen geerntet und verwendet, um die gewünschten Zielzellen zu infizieren. Acht Stunden später wurde die Infektion

durch einen Mediumwechsel beendet. Aufgrund des retroviralen Gentransfers kommt es durch die Integration des Vektors in das Genom der Zielzelle zur stabilen Expression des Zielgens. Der retrovirale Vektor, der zur Herstellung der in dieser Arbeit beschriebenen HT1080-NLS-LacZ Zellen eingesetzt wurde, ist in Abb. 7 dargestellt.

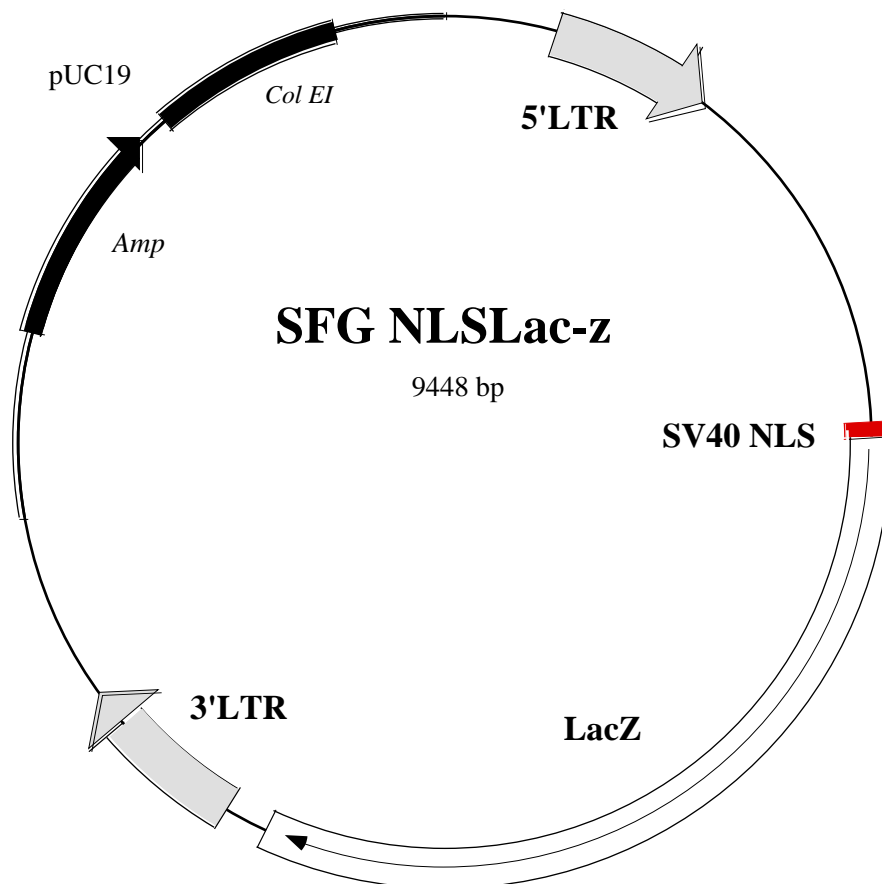


Abb. 7: Der pSFG-NLS-LacZ retroviraler Vektor

Der auf MLV Basis erstellte retrovirale Vektor basiert auf dem eukaryotischen Expressionsplasmid pUC19 und verfügt über ein durch den U3 Promotor des 5'LTR getriebenes β -Galaktosidasegen (LacZ). Das von diesem Vektor transduzierte LacZ Gen kodiert eine modifizierte Form der β -Galaktosidase welche am N-Terminus des Proteins ein Kernlokalisierungssignal trägt (SV40NLS), was wiederum dazu führt, daß das Protein in den transduzierten Zellen primär im Zellkern vorliegt.

2.2.3.3. Subklonierung eukaryotischer Zellen durch „limiting dilution“

Zur Herstellung von Einzelzellklonen aus einer Population transduzierter Zellen wurden diese mit Hilfe von ATV abgelöst und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen auf eine Dichte von 0,5-0,8 Zellen/ml verdünnt und in 96-Napf-Platten ausgesät. Ungefähr 4-8 Tage nach der Aussaat ließen sich die Nöpfe identifizieren, in denen ausgehend von

nur einer Zelle eine Kolonie herangewachsen war. Diese Einzelzellklone wurden weiterkultiviert und schrittweise in größere Kulturschalen überführt. Schließlich wurde eine Auswahl der Klone auf ihre Eigenschaften hin untersucht (z.B. NLS-LacZ Expression bei der Herstellung der HT1080-NLS-LacZ Zellklone) und eingefroren.

2.2.3.4. Generierung rekombinanter HFV Überstände

In verschiedenen Experimenten dieser Arbeit wurde die Funktion mutierter Formen des HFV Hüllproteins bei der Viruspartikelfreisetzung untersucht. Um diesen Aspekt studieren und auch um die Infektiosität der unter Umständen freigesetzten rekombinanten HF Viren bestimmen zu können wurden drei verschiedene Vektorsysteme eingesetzt, die zunächst über Transfektion in 293T Zellen eingebracht wurden (vgl. 2.2.2.1). So wurden je nach Fragestellung entweder replikationskompetente provirale HFV Konstrukte (pcHSRV2-Konstrukte) mit den jeweiligen Mutationen im *env* Gen, oder replikationsinkompetente HFV Vektoren verwendet. Bei den HFV Vektoren wurden zwei verschiedene Varianten benutzt, die über ein EGFP bzw. ein EGFP/Neo Markergen verfügen: Entweder wurde der pMH62 Vektor gemeinsam mit einem separaten Env-Expressionsplasmid kotransfiziert, oder pcZDL01 Vektoren mit unterschiedlichen Mutationen im *env* Gen wurden eingesetzt. Die verschiedenen Vektoren und ihre Besonderheiten sind in Abb. 8 dargestellt. Achtundvierzig Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die rekombinanten Überstände geerntet und je nach Fragestellung weiterverarbeitet (vgl. 2.2.2.6, 2.2.3.5, 2.2.3.6).

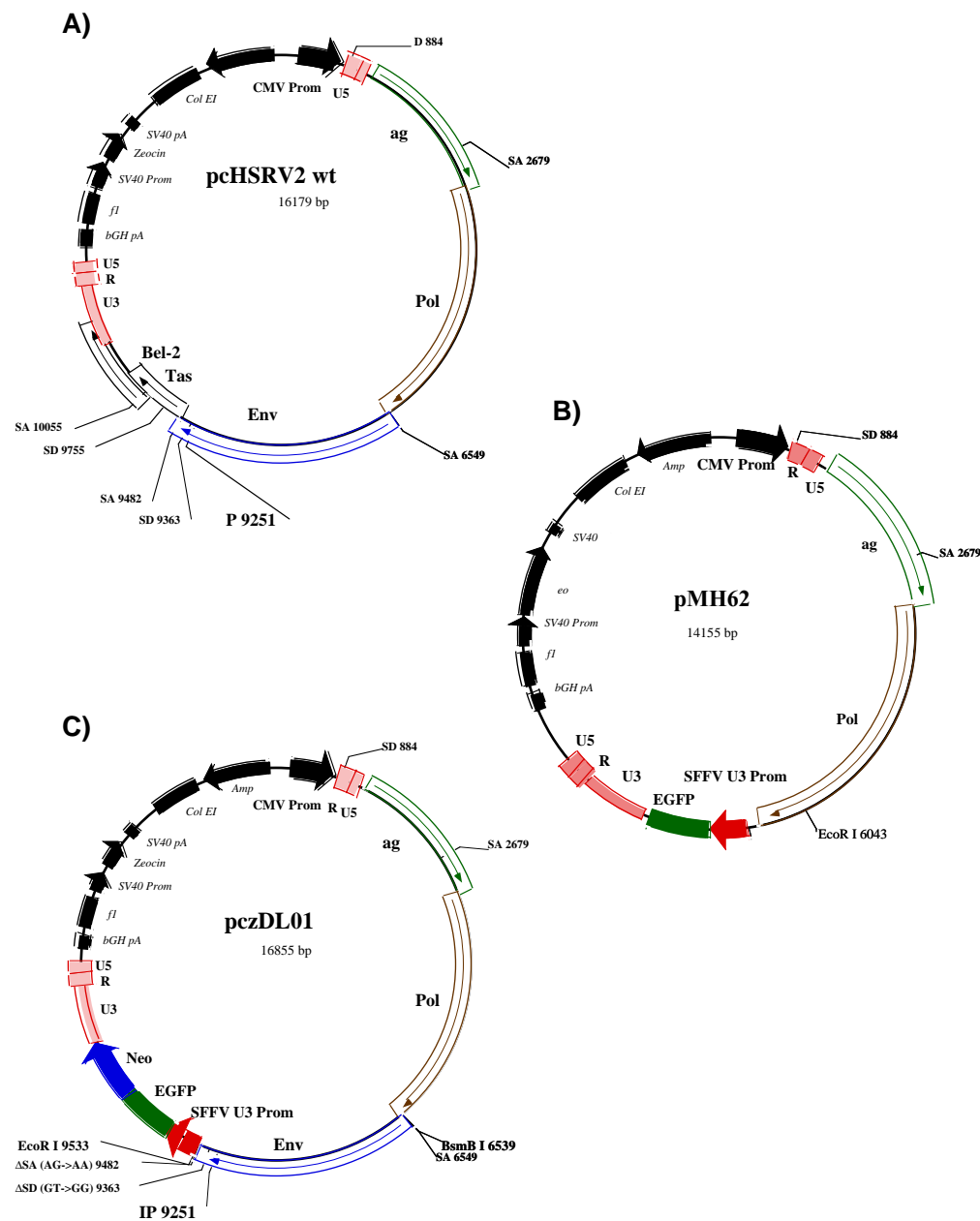


Abb. 8: Vektorsysteme zur Herstellung rekombinanter HFV Überstände.

Die eingesetzten Expressionsplasmide wurden mit Hilfe konventioneller Klonierungstechniken hergestellt und basieren auf den von Invitrogen vertriebenen Plasmiden pcDNA/Neo (B) bzw. pcDNA3.1.+ /Zeo (A,C). (A) pcHSRV2 enthält das komplette HFV Provirus mit allen Strukturgenen und akzessorischen Leserastern (Moebes et al., 1997). Im Bereich des 5'LTR ist der HFV U3 Promotor gegen einen CMV immediate early Promotor-Enhancer ausgetauscht. (B) pMH62 beinhaltet ein deletiertes HFV Provirus. Anstelle der HFV akzessorischen Gene und des HFV Env-Gens, liegt ein EGFP Markergen vor, das über einen internen Promotor (Spleen Focus Forming Virus U3 Promotor) exprimiert wird (Pietschmann et al., 1999). Die Konfiguration des 5'LTR entspricht der bei pcHSRV2. (C) pczDL01 enthält alle HFV Strukturgene sowie ein SFFV U3 getriebenes EGFP-Neo Markergen. Die Konfiguration des 5'LTR entspricht der bei pcHSRV2.

2.2.3.5. Titrierung von HFV-Virusüberständen

Zur Bestimmung des Virustiters nach Transfektion proviraler HFV Konstrukte wurden BHK-LTR-LacZ Zellen (Schmidt und Rethwilm, 1995) als Indikatorzellen verwendet. Diese Zellen enthalten ein HFV-LTR abhängiges LacZ Reporter gen und eignen sich, da der HFV-LTR Promotor nur in der Gegenwart des viralen Transaktivators Tas nennenswerte Aktivität zeigt, zur Messung von HFV Infektionsereignissen. Bei einer erfolgreichen Infektion der verwendeten Indikatorzellen führt nämlich die Bildung von Tas zur Stimulation des HFV-LTR Promotors und damit zur Expression des LacZ Reporter gens, die sich wiederum über eine enzymatische Farbreaktion nachweisen läßt. Auf diese Weise können infizierte Zellen leicht ausgezählt und der Virustiter im Überstand bestimmt werden. Im einzelnen wurden Titrationsexperimente folgendermaßen durchgeführt: 48 h nach Transfektion wurden die Überstände geerntet und durch Filter mit 0,45 µm Porenweite filtriert. Anschließend wurde in sterilen Eppendorfgläsern eine Verdünnungsreihe des Überstands in einem Volumen von 1,3 ml angelegt (unverdünnt bis 10⁻⁵). Daraufhin wurden BHK-LTR-LacZ Indikatorzellen, die am Vorabend mit einer Zelldichte von 2x10⁴ in die Näpfe einer 12er-Platte ausgesät worden waren, mit jeweils 1 ml pro Napf infiziert. Die Infektion wurde nach 6-8 h durch einen Mediumwechsel beendet.

Histochemischer LacZ Assay

Achtundvierzig Stunden nach Infektionsbeginn wurden infizierte Zellen durch einen histochemischen LacZ-Assay angefärbt. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen, die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und dann für 15 Minuten bei 4°C in 1 ml LacZ-Fixierlösung (0,5% Glutaraldehyd in PBS) fixiert. Vor der Enzymreaktion wurden die Näpfe je zweimal mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 2 ml LacZ-Färbelösung, die vorher frisch aus den Stammlösungen angesetzt worden war, aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Stunden bei 37°C war die Farbreaktion soweit fortgeschritten, daß mit der Auswertung unter dem Mikroskop begonnen werden konnte.

Färbelösung:

4 mM Ferricyanid
4 mM Ferrocyanid
2 mM CaCl₂
0,4 mg/ml X-Gal

Stammlösung:

400 mM
400 mM
100 mM
20 mg/ml (in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C)

2.2.3.6. Bestimmung von Infektionseffizienzen nach Transfektion von HFV Vektoren

Wie bereits in Abb. 8 gezeigt verfügen die eingesetzten HFV Vektoren pMH62 und pczDL01 über ein EGFP bzw. über ein EGFP-Neo Markergen. Nach der Infektion der Zielzellen und der Integration der Vektoren in das Wirtsgenom kommt es durch die Aktivität des SFFV-U3 Promotors, der den Markergen jeweils vorgeschaltet ist, zur Expression von EGFP. Diese wiederum läßt sich leicht über FACS („fluorescence activated cell sorting“) Analyse detektieren und quantifizieren. Achtundvierzig Stunden nach der Infektion der Zielzellen (zur Messung von Infektionseffizienzen wurden in der Regel HT1080 Zellen verwendet) wurden diese mit Hilfe von ATV abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt, in die 3 ml FACS-Puffer (PBS + 0,1% BSA + 0,05% Natriumazid) vorgelegt waren. Daraufhin wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment je nach Zellzahl in 100-400 µl FACS Puffer aufgenommen. Die Messungen wurden an einem Beckton Dickinson FACSScan durchgeführt und mit der CellQuest Software ausgewertet.

2.2.3.7. Fusionsassay

Um die Fusionsaktivität verschiedenen HFV Hüllproteinmutanten zu bestimmen wurde eine Methode entwickelt, die auf Zellfusion zwischen transfizierten 293T und HT1080-NLS-LacZ Partnerzellen basiert. Dabei wurden zunächst die 293T Zellen mit den jeweiligen HFV Hüllprotein Expressionskonstrukten alleine oder in Verbindung mit dem HFV Vektor pMH62 transfiziert (vgl. 2.2.2.1). Vierundzwanzig Stunden nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit ATV abgelöst und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurden $2,5 \times 10^5$ 293T Zellen in einem Verhältnis von 1:1 mit den HT1080-NLS-LacZ Zellen gemischt und in 6-Napfplatten angesät. Im Laufe einer Kultivierungsphase von 24 Stunden kam es zur Riesenzellbildung (Synzytienbildung) zwischen den 293T Zellen, die nach der Transfektion das HFV Hüllprotein exprimieren, und den HT1080-NLS-LacZ Partnerzellen, die über den Rezeptor von HFV verfügen. Vor der Auswertung des Fusionsassays wurden die Zellen fixiert und histochemisch gefärbt (vgl. 2.2.3.5). Aufgrund der in den HT1080-NLS-LacZ gebildeten nukleär lokalisierten β -Galaktosidase ließen sich auf diese Weise die Zellkerne der Synzytien, sofern HT1080-NLS-LacZ Zellen an der Riesenzellbildung beteiligt waren, blau anfärben, was die Quantifizierung unter dem Mikroskop erleichterte. Die Fusionsaktivität wurde folgendermaßen bestimmt: Unter dem Mikroskop bei einer 125x Vergrößerung wurde in 5 unabhängigen Gesichtsfelder die Anzahl von Synzytien bestimmt (als Synzytium gewertet wurden Zellverbände mit einer Anzahl von mehr als 4 Kernen). Abschließend wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Für einige schwach fusogene Mutanten des HFV Hüllproteins war es nötig die Sensitivität der Methode zu steigern. Dazu wurde die Kokultivierungsphase der beiden Zelllinien um weitere 24 Stunden auf 48h verlängert.

Zudem wurde die CMV getriebene Genexpression in diesem Zeitraum durch eine 12 h andauernde Inkubation mit 10 mM Natriumbutyrat enthaltendem Medium induziert. Unter diesen Bedingungen stellte sich eine ca. 10x gesteigerte Fusionsaktivität der schwachfusogenen Hüllproteinmutanten ein.