

## 2 Methoden und Materialien

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmiden erfolgte durch Elektroporation. 50 µl einer Suspension elektrokompenter Zellen wurden auf Eis in einer Elektroporationsküvette mit bis zu 2 µl Plasmidlösung gemischt und einem Elektroschock von 4-5 ms unterzogen. Die Einstellungen am Gerät betragen dabei 25 µF, 200 Ω und 1.8 kV. Die Suspension wurde mit 350 µl SOC-Medium versetzt, für 1 h bei 37 °C geschüttelt und anschließend auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert.

#### *Geräte*

Elektroporator: Gene Pulser (Biorad), Thermoblock: Thermomixer Standard (Eppendorf)

#### *Puffer und Lösungen*

SOC-Medium (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose, LB-Agar (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar), 1000× Ampicillin (100 mg/ml Ampicillin), 1000× Kanamycin (50 mg/ml Kanamycin)

#### 2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Aus Über-Nacht-Kulturen mit einem Volumen von 5 ml (Mini), 150 ml (Midi) oder 1.5 l (Mega) wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe von Qiagen Plasmid-Kits nach der Standardvorschrift isoliert, wobei mit dem Mini-Kit bis zu 20 µg, mit dem Midi-Kit bis zu 100 µg und mit dem Mega-Kit bis zu 2 mg DNA erhalten wurde.

#### *Kits*

QIAspin Plasmid Mini Kit (Qiagen), QIAprep Plasmid Midi Kit (Qiagen), QIAprep Plasmid Mega Kit (Qiagen)

#### 2.1.3 DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmiden und mit PCR erzeugten DNA-Fragmenten wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet, die an spezifischen, meist 4–8 bp langen Erkennungssequenzen schneiden.

Die Kombination von Puffern und Enzymen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Ein typischer analytischer 10 µl-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10× Puffer	1.0 µl
DNA (100-200 ng/µl)	1.0 µl
10× BSA (falls erforderlich)	1.0 µl
Wasser	6.0-7.0 µl
Restriktionsendonuklease (1-2 U/µl)	1.0 µl

Ein typischer präparativer 30 µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10× Puffer	3.0 µl
10× BSA (falls erforderlich)	3.0 µl
DNA (100-200 ng/µl)	23.0-26.0 µl
Restriktionsendonuklease (10 U/µl)	1.0 µl

Analytische Ansätze wurden, soweit für bestimmte Enzyme vom Hersteller nicht anders angegeben, für 1-3 h bei 37 °C inkubiert, präparative Ansätze für 5-24 h.

#### *Enzyme*

*Aat* II, *Afl* II, *Avr* II, *Bam* HI, *Bgl* II, *Bst* BI, *Dpn* I, *Eco* RI, *Fok* I, *Fsp* I, *Kas* I, *Nde* I, *Nhe* I, *Nsi* I, *Sma* I, *Sph* I, *Xho* I, *Xma* I (alle New England Biolabs), *Eam* I104I (Stratagene)

#### *Puffer und Lösungen*

Puffer 1, Puffer 2, Puffer 3, Puffer 4, *Eco* RI-Puffer, *Nsi* I-Puffer, *Bam* HI-Puffer (alle New England Biolabs)

### **2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente mit einer Länge von 100-10000 bp wurden elektrophoretisch in 0.7-2.0 %igen Agarosegelen getrennt. Die Agarose wurde in 1× TAE-Puffer unter Erwärmen gelöst und nach Zugabe von 5000× Ethidiumbromid-Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die Elektrophorese wurde spannungslimitiert bei 90 V (7×8 cm-Gele) bzw. bei 110 V (12×14 cm-Gele) durchgeführt und war nach 45-60 min beendet.

#### *Geräte*

Horizontal-Gelelektrophoresekammern: B1A und B2 (Owl Scientific),  
Spannungsquelle: EPS 600 (Pharmacia)

#### *Puffer und Lösungen*

50× TAE-Puffer (2 M Tris, 1 M Essigsäure, 100 mM EDTA, pH 8.1 (stellt sich ein)),  
Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerol, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2 (HCl)), 5000× Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml Ethidiumbromid), 1 kb DNA-Marker (New England Biolabs), 100 bp DNA-Marker (New England Biolabs)

### 2.1.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente mit einer Länge bis 100 bp wurden in vertikalen 12-18%igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Für ein 12%iges Gel wurde folgende Mischung angesetzt:

PAA 40	3 ml
5× TBE Puffer	2 ml
Wasser	4.9 ml
TEMED	10 µl
APS-Lösung	100 µl

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen und hatten eine Dicke von 0.75 mm (analytische Gele) bzw. von 1.5 mm (präparative Gele). Die Elektrophorese lief über 80-140 min bei 130 V. Zur Detektion der Banden wurden die Gele für 10 min in SYBR-Gold-Färbelösung geschüttelt.

#### *Geräte*

Vertikal-Gelelektrophoresekammer: Mighty Small SE260 (Hoefler), Spannungsquelle: EPS 600 (Pharmacia)

#### *Puffer und Lösungen*

PAA 40 (40 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid, Roth), 5× TBE Puffer (0.45 M Tris, 0.45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8.0 (stellt sich ein)), APS-Lösung (10 % (w/v) APS), Probenpuffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 50 % (w/v) Glycerol, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 7.2 (HCl)), SYBR-Gold Färbelösung (0.1 µl/ml SYBR-Gold)

### 2.1.6 Reinigung und Aufkonzentrierung von DNA

#### *Präparative Gelelektrophorese*

Aus einem Gemisch von DNA unterschiedlicher Länge, das z.B. durch einen Verdau mit Restriktionsendonukleasen erzeugt wurde, wurden einzelne Fragmente durch präparative Elektrophorese gereinigt. Für größere Fragmente wurden dazu Agarosegele verwendet, kleinere (< 100 bp) konnten besser mit Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. Nach der Elektrophorese wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert.

Bei Agarosegelen wurde dafür das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet, wobei nach der Vorschrift des Herstellers verfahren wurde. Für die Extraktion von DNA, die aus Polyacrylamidgelen ausgeschnitten worden war, wurde das Gelstück zunächst fein zerkleinert durch Zentrifugation (13000 ×g, 5 min) in ein 2 ml-Eppendorfgefäß durch ein ca. 1 mm großes Loch in einem 500 µl-Eppendorfgefäß. Danach wurden 300-700 µl EB-Puffer zugegeben, und die Mischung wurde für 2-10 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Mit Zentrifugation bei 13000 ×g für 15 min wurden die Polyacrylamidreste

abgetrennt; die extrahierte DNA befand sich im Überstand und konnte z.B. mit Hilfe einer Ethanol-fällung weiter aufkonzentriert werden.

#### *Reinigung und Aufkonzentrierung mit QIAquick-Kits (Qiagen)*

Zum Entfernen von Puffersubstanzen oder Enzymen aus DNA-Lösungen und zum Aufkonzentrieren (bis auf 30 µl) wurden QIAquick-Kits verwendet. Dabei wurde die DNA in Puffern hoher Ionenstärke an eine Silikatmatrix gebunden und nach einem oder mehreren Waschschritten mit einem Puffer niedriger Ionenstärke eluiert.

Es wurde das Nucleotide Removal Kit (Fragmente < 100 bp) und das PCR Purification Kit (Fragmente > 100 bp) eingesetzt, wobei nach der Vorschrift des Herstellers verfahren wurde.

#### *Fällung mit Ethanol/Glycogen*

Eine Aufkonzentrierung von DNA auf Volumina < 30 µl wurde durch eine Ethanol-fällung erreicht, wobei die DNA gleichzeitig sterilisiert wurde. Der Zusatz von Glycogen vervollständigt die Fällung und erhöht vor allem bei kleineren Fragmenten die Ausbeuten. Das Glycogen verbleibt dabei teilweise in der DNA-Lösung, stört jedoch bei nachfolgenden Schritten nicht.

Für die Ethanol/Glycogen-Fällung wurde die DNA-Lösung auf ein Volumen von 200 µl gebracht, ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

DNA-Lösung	200 µl
Glycogen	3 µl
Ammoniumacetat-Lösung	100 µl
Ethanol (absolut)	700 µl

Der Ansatz wurde gründlich gemischt und für 1 h bei -80 °C inkubiert. Das DNA/Glycogen-Präzipitat wurde bei 13000 ×g für 30 min abzentrifugiert, mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13000 ×g für 15 min abzentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in dem gewünschten Volumen Wasser oder Puffer resolubilisiert.

#### *Geräte*

Vakuum-Saugeinrichtung (Promega), Kühlzentrifuge: Fresco (Heraeus)

#### *Kits*

QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick Nucleotide Removal Kit, QIAquick PCR Purification Kit (alle Qiagen)

#### *Puffer und Lösungen*

Ammoniumacetat-Lösung (10 M Ammoniumacetat), EB-Puffer (10 mM Tris), Glycogen (Roche)

### 2.1.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden wird von dem Enzym Alkalische Phosphatase (CIP) katalysiert. Diese Reaktion ist wichtig, um bei Klonierungen in einen linearisierten Vektor mit kompatiblen Enden eine Selbstligation des Vektors als dominante Nebenreaktion zu verhindern.

Die Dephosphorylierung erfolgte immer direkt nach einer präparativen Spaltung mit Restriktionsendonukleasen. Da die Alkalische Phosphatase in allen Puffern der Restriktionsenzyme aktiv ist, wurde dem Ansatz 1 µl CIP (1 U/µl) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

#### *Enzyme*

CIP: Alkalische Phosphatase aus Kälberpankreas (New England Biolabs)

### 2.1.8 DNA-Ligation

Mit Hilfe von T4-DNA-Ligase werden DNA-Enden unter ATP-Hydrolyse kovalent miteinander verknüpft. Mindestens ein 5'-Ende der DNA muss dabei phosphoryliert sein. Ein typischer 10 µl-Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10× T4-DNA-Ligase-Puffer	1.0 µl
Fragment 1/Vektor (20-50 ng/µl)	1.0-3.0 µl
Fragment 2 (50 ng/µl)	2.0-4.0 µl
Wasser	1.0-5.0 µl
T4-DNA-Ligase (400 U/µl)	1.0 µl

Für die Ligation zweier Fragmente zu einem linearen DNA-Strang wurden diese äquimolar eingesetzt; für die Insertion eines Fragmentes in einen Vektor wurde das Fragment mindestens in einem 4-fachen molaren Überschuss zum Vektor eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 1-16 h bei 16 °C inkubiert.

#### *Geräte*

Thermoblock: Thermomixer comfort (Eppendorf)

#### *Enzyme*

T4-DNA-Ligase (New England Biolabs)

#### *Puffer und Lösungen*

10× T4-DNA-Ligase-Puffer (New England Biolabs)

### 2.1.9 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Eine Phosphorylierung an 5'-DNA-Enden wird unter ATP-Hydrolyse von dem Enzym Polynukleotidkinase katalysiert. 5'-Phosphatgruppen sind für eine Ligation von DNA-

Enden erforderlich. Ein typischer 20  $\mu$ l-Phosphorylierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 $\times$ T4-DNA-Ligase Puffer	2.0 $\mu$ l
DNA-Lösung	10.0-17.0 $\mu$ l
Wasser	0-7.0 $\mu$ l
Polynukleotidkinase (0.5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert.

#### *Enzyme*

Polynukleotidkinase (New England Biolabs)

#### *Puffer und Lösungen*

10 $\times$  T4-DNA-Ligase-Puffer (New England Biolabs)

### **2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion**

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lässt sich durch eine sich zyklisch wiederholende Abfolge von Reaktionsschritten ein DNA-Segment amplifizieren, das von bekannten Sequenzen begrenzt wird (Mullis *et al.*, 1986, Saiki *et al.*, 1988, Lachmund & Sachse, 1994)).

Die PCR wurde sowohl zur analytischen Amplifikation bestimmter Gensegmente als auch zur präparativen Amplifikation von Genen verwendet. Analytische Ansätze wurden mit *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt, präparative Ansätze aufgrund der geringeren Fehlerrate mit *Pfu*-DNA-Polymerase. Ein typischer 50  $\mu$ l-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen (analytische Ansätze wurden analog im 10  $\mu$ l Maßstab durchgeführt):

10 $\times$ Polymerase Puffer	5.0 $\mu$ l
Templat-DNA (5-50 ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
dNTP-Mix (100 mM)	0.8 $\mu$ l
5'-Oligonukleotid (20 pmol/ $\mu$ l)	2.0 $\mu$ l
3'-Oligonukleotid (20 pmol/ $\mu$ l)	2.0 $\mu$ l
Wasser	38.2 $\mu$ l
<i>Pfu</i> -/ <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (3 U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l

Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	45 s	1
Denaturierung	95 °C	45 s	} 25-30
Annealing	50-60 °C	45 s	
Extension	72 °C	60-600 s *	
Finale Extension	72 °C	600 s	1

\* Extensionszeit nach Größe des zu amplifizierenden Fragments: 2 kb/min (*Pfu*), 1 kb/min (*Taq*)

### Geräte

Thermocycler: Mastercycler gradient (Eppendorf)

### Enzyme

*Pfu*-DNA-Polymerase (Promega), *Taq*-DNA-Polymerase (Promega)

### Puffer und Lösungen

10× *Pfu*-DNA-Polymerase-Puffer (Promega), 10× *Taq*-DNA-Polymerase-Puffer (Promega), dNTP-Mix (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP)

#### 2.1.11 Blunt End-Klonierung von PCR-Produkten

Eine Subklonierung von *Blunt End* PCR-Produkten erfolgte in den Vektor pCR-BluntII Topo, der bereits linearisiert und mit einer Topoisomerase aktiviert vorlag, so dass keine DNA-Ligase benötigt wurde. Die Stelle der Insertion befand sich im Leseraster für einen letalen DNA-Gyrase-Inhibitor (*ccdB*), so dass nur solche Zellen überleben konnten, die das Fragment erfolgreich in den Vektor integriert hatten, wodurch eine hocheffiziente Selektion positiver Klone erreicht wurde.

Die Ligationreaktion und anschließende Transformation erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

### Kits

Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit (Invitrogen)

#### 2.1.12 Ortsgerichtete Mutagenese

Zum Einbringen von Punktmutationen oder Insertionen in eine DNA-Sequenz wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide verwendet, die die veränderte Sequenz enthielten. In einer PCR-ähnlichen Reaktion wurde die Templat-DNA kopiert, so dass Plasmide mit der neuen Sequenz synthetisiert wurden. Die Templat-DNA wurde dann in einem zweiten Schritt spezifisch mit dem Enzym *Dpn* I verdaut, das an einer methylierten 4 bp-Sequenz schneidet (Abbildung 7). Ein Teil des Ansatzes wurde zur

Transformation von *E. coli* verwendet, wobei die verbleibenden Einzelstrangbrüche in der synthetisierten DNA geschlossen wurden.



Abbildung 7. Prinzip der ortsgerichteten Mutagenese.

Die Synthese des Plasmids mit der veränderten Sequenz erfolgte im 25  $\mu$ l-Maßstab. Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10 $\times$ <i>Pfu</i> -Polymerase Puffer	2.5 $\mu$ l
Templat-DNA (50-100 ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
dNTP-Mix (100 mM)	0.5 $\mu$ l
Oligonukleotid 1 (20 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Oligonukleotid 2 (20 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Wasser	18.5 $\mu$ l
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (3 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l

Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	30 s	1
Denaturierung	95 °C	30 s	} 18
Annealing	52 °C	60 s	
Extension	68 °C	600-1200 s *	

\* Extensionszeit nach Templat-Größe: 2 kb/min

Danach wurden 0.5  $\mu$ l *Dpn* I (10 U/ $\mu$ l) zugegeben und für 1 h bei 37 °C und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Mit 2  $\mu$ l des Ansatzes wurden *E. coli* TOP10-Zellen transformiert.

#### Geräte

Thermocycler: Mastercycler gradient (Eppendorf)

#### Enzyme

*Pfu*-DNA-Polymerase (Promega), *Dpn* I (New England Biolabs)



*Puffer und Lösungen*

10× *Pfu*-DNA-Polymerase-Puffer (Promega), dNTP-Mix (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP)

**2.1.13 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierreaktion wurde mit einer thermostabilen Polymerase durchgeführt, so dass die einzelnen Elongationszyklen zur Verringerung der erforderlichen Templat-Konzentration bis zu 30 Mal wiederholt werden konnten (cycle sequencing, Krishnan *et al.*, 1991). Dabei wurden mit einem Infrarot-Farbstoff markierte Primer eingesetzt, die eine simultane Detektion der Fragmente bei einer anschließenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglichten.

Für die Sequenzierreaktionen wurde das Sequitherm Excel II Long-Read Kit nach der Standardvorschrift verwendet. 1.2-1.5 µl der einzelnen Reaktionen wurden auf ein 0.25 mm dickes und 40×25 cm großes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 °C, 1500 V und war nach ca. 6-8 h abgeschlossen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Base ImagIR (LI-COR) ausgewertet. Die Leseweite betrug bis zu 1000 bp.

*Geräte*

DNA Sequencer: LI-COR 4000 (LI-COR), Thermocycler: Omn-E (Hybaid)

*Kits*

Sequitherm Excel II Long-Read DNA Sequencing Kit (Epicentre Technologies)

*Puffer und Lösungen*

Sequenziergel-Lösung (30 ml Sequagel XR-Lösung, 7.5 ml Sequagel-Puffer, 400 µl DMSO, 300 µl 10 % (w/v) APS), 5× TBE (0.45 M Tris, 0.45 M Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8.0 (stellt sich ein))

**2.2 Expression, Reinigung und Analytik von Proteinen****2.2.1 Bakterienanzucht zur Expression rekombinanter Proteine**

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* erfolgte durch Animpfen einer 5-20 ml Vorkultur mit einer Kolonie von einer frisch ausgestrichenen LB-Agar Platte oder einer Glycerolkultur. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt und zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Dazu wurde die Vorkultur 100 bis 200-fach in frischem LB-Medium in 1 l (bis zu 300 ml Medium) oder 5 l (bis zu 2 l Medium) Schüttelkolben verdünnt. Die Kolben wurden dann bei 37 °C geschüttelt bis die Zellen eine Dichte OD<sub>600</sub> von 0.6 bis 1.5 erreicht hatten. Danach wurde die Expression der rekombinanten Proteine durch Zugabe von 1000× IPTG-Lösung induziert. Die Kolben wurden je nach Expressionssystem entweder weiter bei 37 °C für 4 h geschüttelt oder über Nacht bei 15 °C.

*Geräte*

Kulturschüttler: HT (Infors), SM30/TM30 (Edmund Bühler)

*Puffer und Lösungen*

LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.0-7.4 (stellt sich ein)),  
1000× IPTG-Lösung (1 M IPTG)

**2.2.2 Gewinnung des Zellrohextraktes**

Die Zellen wurden zunächst für 20 min bei 5000 ×g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 30 bis 100 ml Puffer100 resuspendiert. Die Zellen wurden durch Hochdruck-Dispersion bei 1200 bar aufgeschlossen. Anschließend wurde die Suspension für 1 h bei 48000 ×g zentrifugiert, so dass ein klarer Rohextrakt erhalten wurde.

*Geräte*

Hochdruckhomogenisator: APV (Manton-Gaulin), Zentrifugen: JA-20, JA-30 (Beckman)

*Puffer und Lösungen*

Puffer100 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH))

**2.2.3 Proteinspleißen und Chitin-Affinitäts-Chromatographie**

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proteine wurden als C-terminale Fusionen mit einem Intein und einer Chitin-Bindungsdomäne exprimiert, was eine Proteinreinigung in einem Schritt ermöglicht (Chong *et al.*, 1997). Inteine sind selbst-spleißende Elemente in Proteinen, die bereits in einigen Spezies entdeckt wurden (Perler *et al.*, 1997). Proteinspleißen ist definiert als das Ausschneiden einer Proteinsequenz (Intein) und die Ligation der flankierenden Proteinfragmente (Exteine), so dass ein reifes Extein Protein und das freie Intein gebildet wird (Perler *et al.*, 1994). Fusionskonstrukte eines rekombinanten Proteins mit einer Mutante des Inteins aus dem *Saccharomyces cerevisiae* VMA1 Gen, das keine Endonuclease- und Ligationsaktivität mehr besitzt, kann zum *in vitro*-Spleißen verwendet werden (Chong & Xu, 1997, Chong *et al.*, 1996). Die Peptidbindung des Cysteins am N-Terminus des Inteins steht im Gleichgewicht mit einer Thioesterbindung, die durch nucleophile Substanzen, wie z.B. Hydroxylamin oder DTT, gespalten werden kann, so dass eine Spaltung des Fusionsproteins erfolgt. Für eine Affinitätsreinigung befindet sich am C-Terminus des Inteins zusätzlich eine Chitinbindungsdomäne aus *Bacillus circulans*, die eine starke Bindung des Fusionsproteins an eine Chitinmatrix ermöglicht (Chong *et al.*, 1997).

Für die Chitin-Affinitäts-Chromatographie wurde eine Chitinsäule mit einem Volumen von 10 bis 15 ml verwendet. Die Chromatographie erfolgte im Kühlraum bei 6 bis 8 °C nach folgendem Schema:

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
Äquilibrieren	Puffer100	2 ml/min	3 V <sub>t</sub>
Probenauftrag	Rohextrakt	0.5 ml/min	30 bis 100 ml
Waschen	Puffer100	2 ml/min	3 V <sub>t</sub>
	0-100 % Puffer2000 in Puffer100		5 V <sub>t</sub>
	Puffer2000		10 V <sub>t</sub>
	Puffer100		3 V <sub>t</sub>
Spaltung	Spaltungspuffer 1 oder 2	2 ml/min	3 V <sub>t</sub> , 14 h
Elution	0-50 % Puffer2000 in Puffer100		4 V <sub>t</sub>
Regenerierung	Regenerierungspuffer	1 ml/min	3 V <sub>t</sub>

Nach dem Spülen mit Spaltungspuffer wurde die Säule für 14 h inkubiert, um die Spaltung des Fusionsproteins zu ermöglichen. Während der Elution wurden Fraktionen gesammelt, die durch SDS-PAGE analysiert wurden. Die Regenerierung der Säule wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, um eine Präzipitation des SDS im Regenerierungspuffer zu vermeiden.

#### Geräte

Chromatographiesäule: XK16/20 (Pharmacia), FPLC-Anlage: AEKTA Explorer (Pharmacia)

#### Puffer und Lösungen

Chitin Beads (New England Biolabs), Puffer100 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH)), Puffer2000 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH)), Spaltungspuffer 1 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 50 mM Hydroxylamin, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH)), Spaltungspuffer 2 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 30 mM Hydroxylamin, 30 mM DTT, 100 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 8.0 (NaOH)), Regenerierungspuffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 % (w/v) SDS, pH 7.2 (NaOH))

#### 2.2.4 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltrations-Chromatographie diente zur Analyse der Kapsidassemblierung und zur präparativen Isolation von Kapsiden. Es wurden HPLC-Säulen mit einem Volumen von 14 ml verwendet, die Ausschlussgrenzen von 20 MDa (TSKgel 5000PW<sub>xl</sub>) bzw. 40 MDa (TSKgel 6000PW<sub>xl</sub>) besaßen. Die Chromatographie wurde wie folgt durchgeführt:

Vorgang	Puffer	Flussrate	Dauer
initiale Äquilibration	SEC-Puffer 1 oder 2	0.7 ml/min	3 $V_t$
Äquilibration	SEC-Puffer 1 oder 2		0.3 bis 1 $V_t$
Probenauftrag	Kapsid-/Pentamer-Lösung	0.7 ml/min	50 $\mu$ l bis 1 ml
Elution	SEC-Puffer 1 oder 2	0.7 ml/min	1.3 $V_t$

Vor jedem Probenauftrag wurde erneut mit 0.3 bis 1  $V_t$  äquilibriert, um eine stabile Basislinie zu erhalten und um später eluierende Substanzen, wie z.B. DTT aus dem vorherigen Lauf, von der Säule zu spülen. Für Assemblierungsanalysen wurden 50 bis 100  $\mu$ l Probe aufgetragen, für eine präparative Kapsidisolierung wurde bis zu 1 ml Probe eingesetzt, wobei gleichzeitig während der Elution Fraktionen gesammelt wurden.

#### Geräte

HPLC-Säulen: TSKgel 5000PW<sub>xl</sub> und TSKgel 6000PW<sub>xl</sub> (Toso Haas), HPLC-Anlage: Biocad Vision (Perseptive Biosystems)

#### Puffer und Lösungen

SEC-Puffer 1 (20 mM HEPES, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH)), SEC-Puffer 2 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH)), beide Puffer wurden sterilfiltriert und entgast

### 2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in denaturierter Form in einem Polyacrylamidgel im elektrischen Feld getrennt (Laemmli, 1970). Das anionische Detergens SDS bindet mit einem konstanten Verhältnis von 1.4 g SDS pro 1 g Protein, so dass die elektrophoretische Beweglichkeit nur noch von der Molekularmasse der Proteine abhängt (Reynolds & Tanford, 1970).

Die hier verwendeten Gele hatten eine Größe von 8×10 cm und waren 0.75 mm dick. Ein 12 %iges Trenngel setzte sich folgendermaßen zusammen (Lösung ausreichend für zwei Gele):

PAA 30	3 ml
4× Trenngelpuffer	2 ml
Wasser	4.9 ml
TEMED	10 $\mu$ l
APS-Lösung	100 $\mu$ l

Nach dem Gießen der Trenngele wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet, bis das Gel polymerisiert war. Danach wurde das Isopropanol entfernt und die 6%ige Sammelgellösung angesetzt (ausreichend für zwei Gele) und über das Trenngel gegossen:

PAA 30	3 ml
4× Sammelgelpuffer	2 ml
Wasser	4.9 ml
TEMED	10 µl
APS-Lösung	100 µl

Die Proben wurden mit mindestens 25 % ihres Volumens mit Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 98 °C erhitzt. Die Elektrophorese lief in Tris/Glycin-Puffer bei 35 mA pro Gel und war nach 50 bis 60 min beendet. Die Gele wurden dann zunächst 10 min in PAGE-Fixierer fixiert und dann 30 min mit PAGE-Färber gefärbt. Anschließend wurden sie in 10 % (v/v) Essigsäure gelagert.

#### Geräte

Vertikal-Elektrophoresekammer: Mighty small SE200 (Hoefer), Netzteil: EPS-200 (Pharmacia)

#### Puffer und Lösungen

PAA30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid, Roth), 4× Trenngelpuffer, 4× Sammelgelpuffer, TEMED (Roth), APS-Lösung (Ammoniumperoxodisulfat, gesättigt), 5× Tris/Glycin-Puffer (15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 2.5 g SDS, pH stellt sich ein), Probenpuffer, PAGE-Fixierer (10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol), PAGE-Färber (10 % Essigsäure, 0.006 % Coomassie Brilliant Blue G250), 10 % (v/v) Essigsäure

### 2.2.6 Konzentrationsbestimmung

Proteine absorbieren Licht im UV-Bereich bei 280 nm durch aromatische Aminosäuren und Disulfidbrücken. Die Absorption ist von der Anzahl der im Protein vorhandenen Tryptophan- und Tyrosinreste sowie der Anzahl der Disulfidbrücken abhängig. Bei bekannter Sequenz kann der Absorptionskoeffizient näherungsweise berechnet werden (Pace *et al.*, 1995):

$$\epsilon_{280 \text{ nm}} [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}] = 5500 \times n_{\text{Tryptophan}} + 1490 \times n_{\text{Tyrosin}} + 125 \times n_{\text{Disulfidbrücken}}$$

Somit kann durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetz die Proteinkonzentration bestimmt werden:

$A_{280\text{ nm}} = \epsilon_{280\text{ nm}} \times c \times d$	A280 nm	gemessene Absorption bei 280 nm
	$\epsilon_{280\text{ nm}}$	berechneter Absorptionskoeffizient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]
	c	Proteinkonzentration [M]
	d	Schichtdicke der Küvette [cm]

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Varianten des Polyomavirus-Hüllproteins VP1 sind die Absorptionskoeffizienten in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7. Molare Absorptionskoeffizienten verschiedener VP1-Varianten

Protein	Molarer Absorptionskoeffizient
VP1-wt, VP1- $\Delta$ C61, VP1-2C, VP1-3C, VP1-1RGD150, VP1-1RGD292	55015 $M^{-1}cm^{-1}$
VP1-CallS, VP1-CallS-T248C	54890 $M^{-1}cm^{-1}$
VP1-WW150, VP1-WW292	73340 $M^{-1}cm^{-1}$
VP1-WW14, VP1-3C-WW150	73465 $M^{-1}cm^{-1}$

#### Geräte

UV/Vis-Spektrometer: DU7400 (Beckman), Quarzküvetten (Hellma)

### 2.2.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit und Molekularmasse von nativem VP1-Pentamer wurde durch native diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Dazu wurden analog zur SDS-PAGE Tris/Glycin-gepufferte Gele gegossen, die jedoch kein denaturierendes SDS enthielten (Bryan, 1977). Die hier verwendeten Gele hatten eine Größe von  $8 \times 10$  cm und waren 0.75 mm dick. Ein 6 %iges Trenngel setzte sich folgendermaßen zusammen (Lösung ausreichend für zwei Gele):

PAA 30	3 ml
4× Nativ-Trenngelpuffer	2 ml
Wasser	4.9 ml
TEMED	10 $\mu$ l
APS-Lösung	100 $\mu$ l

Nach dem Gießen der Trenngele wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet, bis das Gel polymerisiert war. Danach wurde das Isopropanol entfernt und die 4 %ige Sammelgellösung angesetzt (Lösung ausreichend für zwei Gele) und über das Trenngel gegossen:

PAA 30	2 ml
4× Nativ-Sammelgelpuffer	2 ml
Wasser	5.9 ml
TEMED	10 µl
APS-Lösung	100 µl

Die Proben wurden mit mindestens 25 % ihres Volumens mit Probenpuffer versetzt und für 5 min auf 98 °C erhitzt. Die Elektrophorese lief in Tris/Glycin-Puffer bei 35 mA pro Gel und war nach 50 bis 60 min beendet. Die Gele wurden dann zunächst 10 min in PAGE-Fixierer fixiert und dann 30 min mit PAGE-Färber gefärbt. Anschließend wurden sie in 10 % (v/v) Essigsäure gelagert.

Die Bestimmung der Molekularmasse erfolgte durch einen nativen Proteinstandard und Auswertung über Ferguson Plots (Ferguson, 1964). Dazu mussten zur Erstellung einer Eichgerade, Trenngele unterschiedlicher Konzentration verwendet werden.

#### Geräte

Vertikal-Elektrophoresekammer: Mighty Small SE200 (Hoefer), Netzteil: EPS-200 (Pharmacia)

#### Puffer und Lösungen

PAA30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid, Roth), 4× Nativ-Trenngelpuffer, 4× Nativ-Sammelgelpuffer, TEMED (Roth), APS-Lösung (Ammoniumperoxodisulfat, gesättigt), 10× Nativ-Tris/Glycin-Puffer (15 g Tris-Base, 72 g Glycin, pH stellt sich ein), Probenpuffer, PAGE-Fixierer (10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol), PAGE-Färber (10% Essigsäure, 0.006 % Coomassie Brilliant Blue G250), 10 % (v/v) Essigsäure

### 2.2.8 Western-Blot

Bei einem Western-Blot werden Proteine zuerst durch SDS-PAGE aufgetrennt, elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und dort mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Die anschließende Behandlung mit einem sekundären Antikörper und Aktivierung der gekoppelten Peroxidase ermöglicht einen spezifischen Proteinnachweis durch einen Farbniederschlag oder Chemilumineszenz (Coligan *et al.*, 1995).

Zum spezifischen Nachweis von VP1 bzw. Intein wurde das Protein von einem 12 %igen SDS-Gel auf eine PVDF-Membran geblottet (Gültekin & Heermann, 1988). Das Gel wurde auf eine mit Methanol äquilibrierte PVDF-Membran gelegt und zwischen zwei Stapel aus je drei Filterpapieren, die zuvor in 1× Tris/Glycin-Puffer mit 20 % (v/v) Methanol vorinkubiert worden waren, gebracht. Dieser Stapel wurde in eine Semi-Dry-Blotting Apparatur gelegt. Der Blot erfolgte für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA. Nach dem Blot wurde die Membran in Ponceau-Lösung gefärbt und der mitgeführte Molekularmassenmarker für einen späteren Größenvergleich gekennzeichnet. Die Ponceau-Färbung wurde durch kurzes Spülen mit Wasser wieder entfernt. Anschließend wurde die Membran in 1× TBT-Puffer mit 5 %

(w/v) Magermilchpuffer für 30 min geschüttelt, um den Membranhintergrund mit Proteinen abzusättigen. Zu dieser Lösung wurde dann der primäre Antikörper 1000-fach verdünnt zugegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Durch dreimaliges Waschen mit 1× TBT-Puffer wurde überschüssiger, ungebundener Antikörper entfernt. Danach wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (1000-fach verdünnt) in 1× TBT-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für 1 bis 2 h inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen der Membran erfolgte die Detektion über die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase.

#### *Detektion durch Chemilumineszenz*

Die Detektion der Banden erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem über eine Oxidation von Luminol durch die Peroxidase, wodurch eine Chemilumineszenz ausgelöst wird (Kricka, 1991, Fowler, 1995). Dazu wurde die Membran zunächst mit Wasser abgespült. Danach wurden 2 ml einer frisch zubereiteten ECL-Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt und für 2 min inkubiert. Die Peroxidaseaktivität wurde durch Exposition eines Röntgenfilms auf der Membran und anschließende Entwicklung des Films nachgewiesen. Die Expositionszeit lag zwischen 15 s und 10 min.

#### *Detektion durch einen Farbniederschlag*

Die Peroxidaseaktivität lässt sich auch direkt auf der Membran sichtbar machen, wobei durch Umsatz von DAB ein Farbniederschlag gebildet wird. Dazu wurde je eine Tablette der beiden Komponenten des Sigma Fast DAB-Kits in 5 ml 1× TBT-Puffer gelöst. In dieser Lösung wurde die Membran so lange inkubiert (5 bis 10 min), bis die Banden gut sichtbar waren. Abschließend wurde die Membran mit Wasser abgespült, getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

#### *Geräte*

Semi-Dry-Blotting-Apparatur: SEMI-PHOR (Hoefer), Netzteil: EPS-200 (Pharmacia)

#### *Puffer und Lösungen*

5× Tris/Glycin-Puffer (15 g Tris-Base, 72 g Glycin, 2.5 g SDS, pH stellt sich ein), Ponceau-Lösung (2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) TCA), 1× TBT-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.2 % (v/v) Tween 20, pH 7.4 (HCl))

#### *Antikörper*

Anti-Intein-Serum (New England Biolabs), Anti-VP1 (Davids Biotechnologie), AntiRabbit IgG (Sigma), AntiChicken IgG (Sigma)

#### *Kits*

ECL Western Blotting analysis system (Amersham), Sigma Fast DAB with metal enhancer (Sigma)



### 2.2.9 Fluoreszenzmarkierung

Zur thiol-spezifischen Fluoreszenzmarkierung wurde eine Spatelspitze des Farbstoffs in 100  $\mu\text{l}$  eines geeigneten Lösungsmittels gelöst (Tabelle 8). Von dieser Lösung wurde durch eine Absorptionmessung die Konzentration bestimmt. Der Farbstoff wurde dann zu einer Protein- oder Peptidlösung gegeben, so dass der Farbstoff in einem 10-fachen molaren Überschuss zu den vorhandenen freien SH-Gruppen vorlag. Die Mischung wurde für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde DTT in einem 10-fachen molaren Überschuss zugegeben, das mit seinen freien SH-Gruppen sehr schnell mit dem noch vorhandenen Farbstoff reagiert. Die Kopplung des Farbstoffs konnte mit SDS-PAGE kontrolliert werden; überschüssiger Farbstoff wurde entweder durch Dialyse mit häufigem Pufferwechsel oder durch Gel-filtrations-Chromatographie entfernt.

#### Geräte

Thermomixer: Comfort (Eppendorf)

#### Reagenzien

Fluorescein-C5-Maleinimid, Texas Red-C2-Maleinimid, Alexa-594-C2-Maleinimid (alle Molecular Probes), DMF (Sigma), DMSO (ICN)

Tabelle 8. Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe zur Thiolmarkierung (Angaben der Fa. Molecular Probes)

Farbstoff	Lösungsmittel	Ex/Em [nm]	$\epsilon$ [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	$M_r$ [Da]
Fluorescein-C5-Maleinimid	DMF	492/515	83 000	427.37
Texas Red-C2-Maleinimid	DMSO	582/600	108 000	728.83
Alexa Fluor-594-C2-Maleinimid	Wasser	588/612	96 000	908.97

### 2.2.10 Fluoreszenzspektroskopie

Bei der Fluoreszenzspektroskopie handelt es sich um eine Spektroskopieform, bei der von der Probe absorbiertes Licht teilweise als Licht niedrigerer Energie wieder abgestrahlt wird (Galla, 1988). Fluoreszenz tritt auf, wenn durch das eingestrahlte Licht  $\pi$ -Elektronen in einen höheren Zustand angeregt werden, die nicht durch strahlungslose Übergänge, sondern unter Lichtemission in den Grundzustand zurückkehren.

Die Messung des emittierten Fluoreszenzlichts im Fluoreszenzspektrometer erfolgte im  $90^\circ$ -Winkel zu dem Anregungslicht. Die Proteineigenfluoreszenz durch Tryptophanreste wurde bei 290 nm angeregt, das Emissionsmaximum wurde bei 330 bis 340 nm detektiert. Die Messung von markierten Cysteinen erfolgte bei den in Tabelle 8 angegebenen Wellenlängen.

### Geräte

Fluoreszenzspektrometer: F-4500 (Hitachi), Fluoreszenzküvetten (Hellma)

#### 2.2.11 Zirkular-Dichroismus-(CD)-Spektroskopie

Chirale Moleküle Wechselwirken charakteristisch mit zirkular polarisiertem Licht, abhängig von der Wellenlänge und der Polarisationsrichtung des eingestrahlten Lichts. Auf diese Weise treten Absorptionsunterschiede zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht auf (Holtzhauer, 1996, Galla, 1988). Zirkular polarisiertes Licht wird aus linear polarisiertem Licht erzeugt, indem linear polarisiertes Licht durch ein  $\lambda/4$ -Plättchen gelenkt wird. Dies führt zu einer Polarisierung des linear polarisierten Lichts im Winkel von  $90^\circ$  und einer Phasenverschiebung um  $\lambda/4$ , so dass die Summe beider Vektoren (linear polarisiertes Licht und orthogonal polarisiertes Licht mit einer Phasenverschiebung um  $\lambda/4$ ) zirkular polarisiertes Licht ergibt. Im CD-Spektrometer wird die Probenküvette mit zirkular polarisiertem Licht durchstrahlt, das mit einer Frequenz im kHz-Bereich die Polarisationsrichtung von rechts und links zirkular polarisiertem Licht ändert, wobei die Absorption der Probe mit einem Photomultiplier gemessen wird. Die Messung und Berechnung des Absorptionsunterschieds zwischen links und rechts zirkular polarisiertem Licht erfordert eine äußerst genaue Optik und Auswertelektronik, da die gemessene Grundabsorption bereits sehr hoch und der Absorptionsunterschied sehr klein ist (Schmid, 1989).

Bei der CD-Spektroskopie von Proteinen lassen sich verschiedene Sekundärstrukturelemente durch charakteristische Spektren unterscheiden (Brahms & Brahms, 1980). Im Fern-UV-Bereich absorbieren die  $\pi$ -Elektronen der Amidgruppen des Proteins (Johnson, 1990). In diesem Wellenlängenbereich können Unterschiede im Proteinrückgrat und somit in den Sekundärstrukturelementen detektiert werden. Aus den Spektren lassen sich näherungsweise durch Dekonvolutionsprogramme die Sekundärstrukturgehalte der gemessenen Proben berechnen. Außerdem lassen sich mit Hilfe der CD-Spektroskopie thermische Proteinstabilitäten bestimmen, wobei während des Aufheizens der Probe die Abnahme des CD-Signals und somit das Entfalten des Proteins gemessen wird.

Die Messung von CD-Spektren erfolgte in Plättchenküvetten einer Schichtdicke von 0.1 mm in 1 nm-Schritten in einem Bereich von 260 bis 195 nm, wobei die Messzeit bei jedem Punkt 16 s betrug. Um möglichst rauscharme Spektren zu erhalten, wurden von jeder Probe fünf Spektren akkumuliert. Außerdem wurde auf die gleiche Weise der Puffer, gegen den die Probe zuvor dialysiert worden war, vermessen. Das daraus resultierende Spektrum wurde von dem Probenspektrum subtrahiert. Das korrigierte Probenspektrum ( $m_{deg}$  gegen Wellenlänge) wurde dann in ein normalisiertes Spektrum ( $\Delta\epsilon$  gegen Wellenlänge) umgerechnet:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot \frac{M_r}{N_A}}{c \cdot d} \qquad \Delta e = \frac{[\Theta]}{3300}$$

$\Theta$ : Elliptizität [mdeg], Messgröße

c: Probenkonzentration [mg/ml]

$M_r$ : Molekularmasse [Da]

d: Küvettendicke [cm]

$N_A$ : Anzahl der Aminosäuren

Die Dekonvolution der Spektren erfolgte mit dem Programm CDNN, das mit Hilfe eines neuronalen Netzwerks und eines Basisspektrensatzes die Sekundärstrukturgehalte berechnet (Böhm *et al.*, 1992).

Die Messung von thermischen Übergängen erfolgte in verschließbaren Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm. Die Probe wurde in 1 °C-Schritten von 20 auf 90 °C aufgeheizt, wobei zwischen jeder Messung eine Pause von 1 min zur vollständigen Temperierung der Probe lag. Bei jeder Temperatur wurde das CD-Signal bei 220 und 210 nm gemessen.

#### Geräte

CD-Spektrometer: 62A DS (Aviv), Quarzküvetten (Hellma)

#### Puffer und Lösungen

CD-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH))

### 2.2.12 Assemblierung virusanaloger Partikel

Die *in vitro*-Assemblierung polyomavirusanaloger Partikel erfolgte durch eine Dialyse, wobei der Puffer von Nichtassemblierungs- zu Assemblierungsbedingungen verändert wurde (Salunke *et al.*, 1986, Salunke *et al.*, 1989).

Nach der Chitinaffinitäts-Chromatographie wurde das VP1-Protein durch Zugabe von 40 % (w/v) Ammoniumsulfat quantitativ gefällt. Bei den Varianten VP1-wt/-2C/-3C wurden außerdem 50 mM DTT zugegeben. Die Fällung erfolgte unter leichtem Schütteln bei 4 °C für mindestens 1 h. Das ausgefällte Protein wurde danach für 20 min bei 20000 ×g abzentrifugiert und in Pentamer-Puffer 1 (cysteinfreies VP1) bzw. in Pentamer-Puffer 2 (VP1-wt/-2C/-3C) gelöst, so dass die Proteinkonzentration etwa 0.5 mg/ml betrug. Die Probe wurde in einen Dialyseschlauch gefüllt und gegen ein mindestens 100-faches Volumen Kapsidpuffer dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte mindestens drei Tage, wobei der Kapsidpuffer ein- bis zweimal pro Tag gewechselt wurde. Die auf diese Weise assemblierten Kapside konnten dann analysiert werden oder durch Gelfiltrations-Chromatographie weiter gereinigt werden.

*Geräte*

Dialyseschläuche: Spectrapor MWCO 6-8 kDa, Spectrapor MWCO 1 kDa (Roth)

*Puffer und Lösungen*

Pentamer-Puffer 1 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH)), Pentamer-Puffer 2 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, 50 mM DTT, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH)), Kapsidpuffer (10 mM HEPES, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 % (w/v) Glycerol, pH 7.2 (NaOH))

**2.2.13 Elektronenmikroskopie**

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde die Morphologie virusanaloger Kapside untersucht. Zur Verstärkung der Kontraste erfolgte eine Negativfärbung der Proben auf beschichteten Kupfernetzen.

Das Kupfernetz wurde mit der beschichteten Seite auf einen Tropfen Bacitracin-Lösung gelegt. Nach einer Minute wurde das Netz mit einem Filterpapier getrocknet und für 3 min auf einen Tropfen der Probe gelegt. Danach wurde es kurz in Wasser abgespült und mit Filterpapier getrocknet. Zur Negativkontrastierung wurde es dann für 15 s auf einen Tropfen Uranylacetat-Lösung gelegt. Das Netz wurde wieder mit Filterpapier getrocknet und konnte dann bis zur Betrachtung am Elektronenmikroskop im Trockenen bei Raumtemperatur gelagert werden. Die Betrachtung der Probe erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop mit bis zu 63000-facher Vergrößerung.

*Geräte*

Elektronenmikroskop: EM 912 (Zeiss)

*Puffer und Lösungen*

Bacitracin-Lösung (0.1 mg/ml Bacitracin), Uranylacetat-Lösung

**2.2.14 Oberflächenplasmonresonanz-Messung (Biacore)**

Mit einer Messung der Oberflächenplasmonresonanz lässt sich die Wechselwirkung zwischen Biomolekülen analysieren (BIAtechnology Handbook, 1994). Dafür wird ein Ligand an eine Sensoroberfläche immobilisiert. Das Messsignal entsteht durch Reflektion und Refraktion monochromatischen Lichts an einer Grenzfläche zweier Medien (Glas, Sensoroberfläche), die sich hinsichtlich ihrer Brechungsindizes unterscheiden. Ändert sich die Konzentration im Medium mit geringerem Brechungsindex durch Bindung eines Analyten an den immobilisierten Liganden, dann ändert sich ebenfalls der Brechungsindex dieses Mediums und somit der Winkel des reflektierten Lichts. Diese Änderung wird durch einen Detektor gemessen und in einem Sensogramm aufgezeichnet (Abbildung 8). Ein durch Biacore-Messungen aufgenommenes Sensogramm zeigt auf diese Weise die Bindung und Dissoziation eines Ligand-Rezeptor-Komplexes auf der Sensoroberfläche.

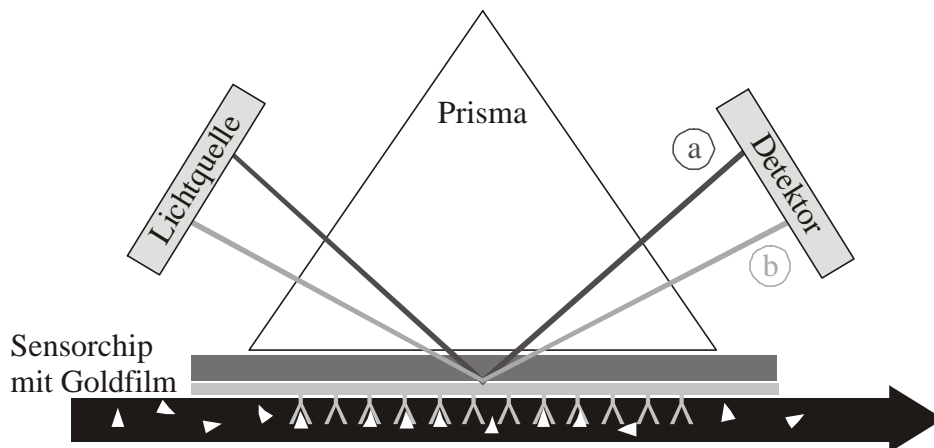


Abbildung 8. Prinzip der Biacore Messung, Winkel des reflektierten Lichts ohne Analyt (a) und mit Analyt-Ligand-Wechselwirkung (b); der Analyt wird in einem Pufferstrom über die Chipoberfläche geleitet (nach BIAapplication Handbook, 1994).

### *Herstellung eines Sensorchips*

Zur Kopplung des PPLP-Peptids an einen CM5-Sensorchip wurde die Methode der Aminokopplung durch reaktive Ester verwendet (BIAapplications Handbook, 1994). Dabei werden die auf der Chipoberfläche vorhandenen Carboxylgruppen mit EDC/NHS aktiviert, so dass eine Peptidbindung mit der N-terminalen Aminogruppe des Peptids gebildet werden konnte. Dafür wurde so viel der PPLP-Peptid-Lösung injiziert, bis ca. 200 RU auf den Chip gebunden worden waren (Abbildung 9). Freie reaktive Gruppen wurden durch Zusatz von Ethanolamin abgesättigt. Die Referenzoberfläche des Sensorchips wurde ebenfalls aktiviert und komplett mit Ethanolamin abgesättigt. Die erfolgreiche Kopplung des PPLP-Peptids wurde abschließend durch Injektion des GST-WW-Fusionsproteins überprüft (Abbildung 9).

### *Messung*

Die Messungen erfolgten bei 20 bis 30 °C und einer Flussrate von 20 µl/min. Die Proteinlösungen wurden vor der Messung gegen den Messpuffer dialysiert. Die Proben wurden vor der Injektion 20- bis 100-fach im Messpuffer verdünnt. Das Probenvolumen betrug 100 µl, wobei 60 µl auf den Chip injiziert wurden. Die Dissoziation wurde über einen Zeitraum von 5 bis 10 min gemessen. Danach wurde noch gebundener Analyt durch Injektion von 60 µl SDS-Lösung eluiert. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Biaevaluation Software.

### *Geräte*

BIACORE X (Biacore AB), Sensorchip CM5 (Biacore AB)

### *Puffer und Lösungen*

PPLP-Peptid-Lösung (5 mg/ml PPLP-Peptid (CSGP<sub>8</sub>LP), 10 mM Natriumacetat, pH 4.6 (Essigsäure)), EDC/NHS (200 mM EDC, 200 mM NHS), SDS-Lösung (1 % (w/v) SDS)

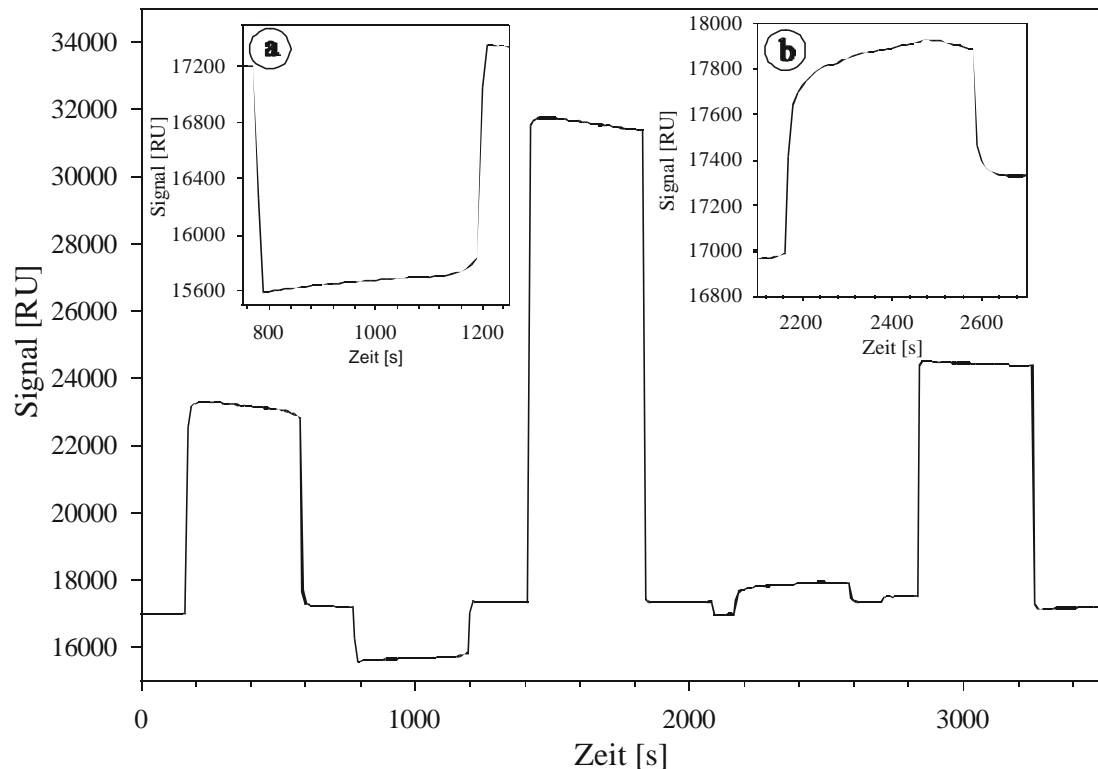


Abbildung 9. Herstellung des Biacore Sensorchips. Nach der Aktivierung der Oberfläche (200-600 s) wurde so lange PPLP-Peptid injiziert bis ca. 200 RU an die Oberfläche gebunden worden waren (800-1200 s, a). Danach wurden übrige reaktive Gruppen mit Ethanolamin abgesättigt (1200-1800 s) und der Chip mit GST-WW getestet (2200-2600 s, b). Abschließend wurde der Chip mit SDS-Lösung regeneriert (2900-3100 s).

## 2.3 Kultivierung und Analyse eukaryontischer Zellen

### 2.3.1 Kultivierung von *Monolayer*-Zellkulturen

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen erfolgte je nach Verwendungszweck in Flaschen oder Petrischalen, deren Kunststoffoberflächen ein adhärentes Wachstum der Zellen ermöglichten. Die Standardwachstumsbedingungen waren eine gesättigte Wasserdampf-atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (bzw. 10 % CO<sub>2</sub> für C127LT-Zellen).

Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium erneuert. Bevor eine Kultur vollständige Konfluenz erreicht hatte, erfolgte zur Verhinderung spontaner Transformation oder Differenzierung eine Passagierung der Kultur. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um abgestorbene Zellen und Reste des alten Mediums zu entfernen. Anschließend erfolgte die proteolytische Ablösung der Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung (0.1 ml pro cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche) für 30 bis 60 s. Danach wurde die Lösung entfernt, und die Zellen wurden so lange inkubiert, bis im Mikroskop ein Abrunden der Zellen beobachtet wurde. Die Zellen wurden dann durch leichtes Schlagen gegen die Gefäßwand vollständig von der Kulturoberfläche abgelöst und unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in 4 bis 8 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl in der Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt, wobei die Anzahl Zellen in einem Feld  $\times 10^4$  der Anzahl Zellen in 1 ml der Suspension entsprach.

Die Zellsuspension wurde dann so verdünnt und in frische Zellkulturgefäße verteilt, dass die Zellzahl 5000 bis 40000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  Kulturoberfläche entsprach. Danach wurden die Zellen weiter unter Standardwachstumsbedingungen kultiviert. Nach ca. 5 bis 6 h hatten sie sich wieder an die Kulturoberfläche angeheftet, und begannen sich zu teilen.

#### *Geräte*

Inkubatorschränke: HeraCell (Heraeus), Sterilbank: Herasafe (Heraeus), Neubauer Zählkammer (Brand), Absaugeinrichtung: Vacubrand (Brand), Pipettierhilfe: Accu-jet (Brand)

#### *Puffer und Lösungen*

Dulbecco's PBS (Gibco), Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco), C2C12/C127LT-Medium (DMEM mit Glutamax, 4.5 g/l Glucose, Natriumpyruvat (Gibco, Nr. 31966), 10 % (w/v) fötales Kälberserum (Gibco)), NIH 3T3-Medium (DMEM mit Glutamax, 4.5 g/l Glucose (Gibco, Nr. 61965), 10 % (w/v) Kälberserum (Gibco))

### **2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen**

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurden adhärent wachsende, eukaryontische Zellkulturen in  $8.8 \text{ cm}^2$ - oder  $21.5 \text{ cm}^2$  Petrischalen verwendet. Der Zellaufschluss wurde mit dem Guanidiniumisothiocyanat-haltigen Puffer RLT des zur RNA-Präparation verwendeten RNeasy Kits durchgeführt. Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation für 2 min bei  $13000 \times g$  durch eine Qiashredder-Säule homogenisiert. Die Reinigung der RNA aus dem Homogenisat erfolgte nach der Standardvorschrift des RNeasy-Kits. Abschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

#### *Kits*

Qiashredder (Quiagen), RNeasy Total RNA Isolation Kit (Quiagen)

### **2.3.3 Semiquantitative Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion**

Die hohe Sensitivität und Selektivität der PCR kann dazu verwendet werden, die Transkription eines bestimmten Gens quantitativ und qualitativ zu erfassen (Schulte, 1994). Mit Reverser Transkriptase werden zunächst aus den zellulären mRNAs cDNAs erzeugt, die als Templat für eine PCR dienen. Werden die PCR-Primer so geplant, dass sie Intronsequenzen der Gene mit einschließen (intron spanning) dann lässt sich mit dieser Methode auch das Spleißen der RNAs analysieren. Die Quantifizierung bestimmter Transkripte kann durch einen Vergleich mit der Amplifikation von Haushaltsgenen, z.B.  $\beta$ -Actin oder GAPDH erfolgen, die in allen Zellen in etwa gleich transkribiert werden. Dabei müssen jedoch die Templat-Konzentration und die Anzahl der Zyklen so eingestellt werden, dass die Amplifikation der cDNAs im linearen Bereich liegt, da ansonsten eine exakte Quantifizierung nicht möglich ist (Wang *et al.*, 1989).

Die reverse Transkription wurde mit 1-3 µg Gesamt-RNA durchgeführt. Als Primer diente das Oligonukleotid Oligo-dT<sub>25</sub>, das an die 3'-polyA-Enden der mRNAs hybridisierte. Ein typischer 20 µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

5× RT Puffer	4.0 µl
RNA-Lösung (1-3 µg)	2.0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0.5 µl
Oligo-dT <sub>25</sub> (25 pmol/µl)	1.0 µl
Wasser	11.5 µl
Reverse Transkriptase (100 U/µl)	1.0 µl

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und dann 10 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. 2 µl eines Ansatzes dienten als Templat für die anschließende PCR. Zur Quantifizierung wurde zusätzlich ein zweites Paar Oligonukleotide verwendet, um β-Actin- oder GAPDH-cDNAs zu amplifizieren. Ein typischer 10 ml-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

10× <i>Taq</i> -Polymerase Puffer	1.0 µl
cDNA-Lösung aus reverser Transkription	1.0 µl
dNTP-Mix (100 mM)	0.2 µl
5'-Oligonukleotid (20 pmol/µl)	0.5 µl
3'-Oligonukleotid (20 pmol/µl)	0.5 µl
RT-β-Actin/GAPDH-5' (20 pmol/µl)	0.5 µl
RT-β-Actin/GAPDH-3' (20 pmol/µl)	0.5 µl
Wasser	5.6 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (3 U/µl)	0.2 µl

Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	45 s	1
Denaturierung	95 °C	45 s	} 20-35
Annealing	50-60 °C	45 s	
Extension	72 °C	60-120 s *	
Finale Extension	72 °C	600 s	1

\* Extensionszeit nach Größe der zu amplifizierenden Fragmente: 1 kb/min

Bei der Analyse schwach transkribierter Gene, bei denen mehr als 20 Zyklen erforderlich waren, wurden die Primer für die Haushaltsgene erst später zugegeben, da für diese häufigen mRNAs nur 20 Zyklen durchgeführt werden konnten, um innerhalb des linearen Amplifikationsbereiches zu bleiben. Nach der PCR wurden 1-2 µl der Reaktionsgemische mit Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Die Banden wurden densitometrisch mit dem Programm Phoretix 1D quantifiziert.



*Geräte*

Thermocycler: Mastercycler Gradient (Eppendorf)

*Enzyme*

MMLV-Reverse Transkriptase (Promega), *Taq*-DNA-Polymerase (Promega)

*Puffer und Lösungen*

5× Reverse Transkriptase-Puffer (Promega), 10× *Taq*-DNA-Polymerase Puffer (Promega), dNTP-Mix (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 25 mM dTTP)

**2.3.4 Transfektion und Herstellung stabiler eukaryontischer Zelllinien**

Einen Tag vor der Transfektion wurden Zellen trypsiniert und mit einer Dichte von 30000-40000 Zellen pro cm<sup>2</sup>-Kulturoberfläche ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 40-60 % erreicht hatten. Die Transfektion erfolgte dann durch Calciumphosphat-Präzipitation, DNA-Dendrimer Komplexe oder nicht-liposomalen Lipide.

*Transfektion mit Calciumphosphat-Präzipitation*

Bei dieser Methode wird durch langsames Mischen von HBS-Puffer mit einer Lösung von DNA und Calciumchlorid ein Präzipitat aus Calciumphosphat und DNA hergestellt, das auf die Zelloberfläche sedimentiert und dann über einen noch nicht bekannten Mechanismus in die Zelle aufgenommen wird (Chen & Okayama, 1987, 1988).

2-4 h vor der Transfektion wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt. Die DNA (10-50 µg für drei 6 cm-Petrischalen) wurde mit sterilem Wasser auf ein Volumen von 450 µl gebracht und mit 50 µl CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt. In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 500 µl 2× HBS Puffer vorgelegt. Mit einer automatischen Pipettierhilfe wurde sterilfiltrierte Luft in den Puffer geblasen, während gleichzeitig mit einer Pasteurpipette die DNA/CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugetropft wurde. Die Mischung wurde 5 s mit einem Vortex-Rührer vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Mischung gleichmäßig über die Zellen verteilt. Die Inkubation mit dem Präzipitat erfolgte unter normalen Wachstumsbedingungen für 4-6 h. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

*Transfektion mit DNA-Dendrimer Komplexen*

Dendrimere sind kugelförmige Polymere, mit Verzweigungen, die von einem zentralen Bereich radial nach außen wachsen. Das hier verwendete Superfect Dendrimer besitzt an den Polymerenden positiv geladene Aminogruppen. In Gegenwart von DNA bilden sich kompakte Komplexe, die die Aufnahme der DNA in die Zelle ermöglichen. Die Nettoladung des Komplexes ist positiv, so dass eine Bindung an negativ geladene zelluläre Rezeptoren und die Zellmembran erfolgen kann. Innerhalb der Zelle puffert das Dendrimer die saure Umgebung in den Lysosomen, so dass die DNA vor

lysosomalen DNAsen geschützt ist und ins Zytoplasma bzw. den Zellkern gelangen kann (Tang *et al.*, 1996).

Für eine Transfektion wurde die DNA (5-10 µg für eine 6 cm-Petrischale) mit serum- und antibiotikafreiem Medium auf ein Volumen von 200 µl gebracht. Die Mischung wurde 1 s mit einem Vortex-Rührer gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 15 µl Superfect zur Ausbildung der Komplexe zugegeben. Der Ansatz wurde für 10 s mit einem Vortex-Rührer gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Zu der DNA/Dendrimer Lösung wurden 1.2 ml Medium (inklusive Serum und Antibiotika) zugegeben. Nachdem diese Mischung gleichmäßig über die Zellen verteilt worden war, wurde für 2h unter normalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

#### *Transfektion mit nicht-liposomalen Lipiden*

Bei der hier verwendeten Effectene-Methode wird die DNA in einem ersten Schritt mit einem Enhancer-Reagenz kondensiert. In einem zweiten Schritt werden Lipide (Effectene-Reagenz) zugegeben, die die kondensierte DNA mizellenartig umhüllen. Vorteile dieser Methode sind die geringen DNA-Mengen, die benötigt werden und die geringe Toxizität der Mizellen.

Zur Transfektion einer Zellkultur in einer 35 mm-Petrischale wurden 5 µl DNA-Lösung (ca. 100 ng/µl), 91 µl Buffer EC und 4 µl Enhancer gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 µl Effectene zugegeben. Die Lösung wurde 10 s mit einem Vortex-Rührer gemischt und zur Ausbildung der Micellen 10 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1.3 ml frischem Medium versetzt. Der DNA-Mizellen-Komplex wurde mit 400 µl Medium vermischt und gleichmäßig über die Zellen verteilt. Da Effectene nicht toxisch ist, erfolgte die Inkubation für ein bis zwei Tage.

#### *Herstellung stabiler Zelllinien*

Zur Erzeugung stabiler Zelllinien, d.h. die die eingebrachte DNA in ihre chromosomale DNA integriert haben, wurde die Transfektion mit einer der oben beschriebenen Methoden durchgeführt. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und in 6-Well-Platten oder 6 cm-Petrischalen mit einer Dichte von 10000-15000 Zellen pro cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche ausgesät. Dabei wurde dem Medium das entsprechende Selektionsantibiotikum zugefügt, dessen optimale Konzentration für jeden Zelltyp zuvor ermittelt wurde. Die Selektion erstreckte sich über 10-14 Tage, wobei das Selektionsmedium alle drei Tage erneuert wurde. Nach dieser Zeit hatten sich einzelne Kolonien gebildet, die mit Hilfe von *Cloning Discs* isoliert wurden. Dazu wurde eine *Cloning Disc* passender Größe in TE-Lösung getaucht und auf eine Kolonie gelegt. Nach ca. 10 min wurde die *Disc* zusammen mit Zellen der Kolonie mit einer Pinzette abgenommen und in frischem Medium in einer 24- oder 4-Well-Platte geschwenkt. Die nachfolgende Kultivierung der Zellen erfolgte stets in Medium, welches das Selektionsantibiotikum enthielt.

### Geräte

4-/6-/24-Well-Platten (Nunc), 35/60 mm-Pertrischalen (Nunc), *Cloning Discs* (Belart Products)

### Kits

Effectene Transfection Reagent (Qiagen), Superfect Transfection Reagent (Qiagen)

### Puffer und Lösungen

CaCl<sub>2</sub>-Lösung (2.5 M CaCl<sub>2</sub>), 2× HBS (50 mM HEPES, 0.28 M NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.05 (NaOH))

## 2.3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die spezifische Lichtemission von Fluoreszenzfarbstoffen, kann zur Anfärbung zellulärer Strukturen genutzt werden, die mit einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden können. Die Selektivität dieser Farbstoffe kann zum einen durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Antikörper (Immunfluoreszenz) vermittelt werden, die bestimmte zelluläre Strukturen erkennen, oder durch die individuellen Eigenschaften des Farbstoffes selbst bestimmt sein (DNA-Färbung, pH-Abhängigkeit, Membranpermeabilität, etc.). Daneben ist ebenfalls die direkte Fluoreszenzmarkierung von Proteinen möglich, sowie die Detektion der Eigenfluoreszenz von Proteinen wie z.B. dem grün fluoreszierendem Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* oder dem rot fluoreszierenden Protein (DsRed) aus *Discosoma sp.*

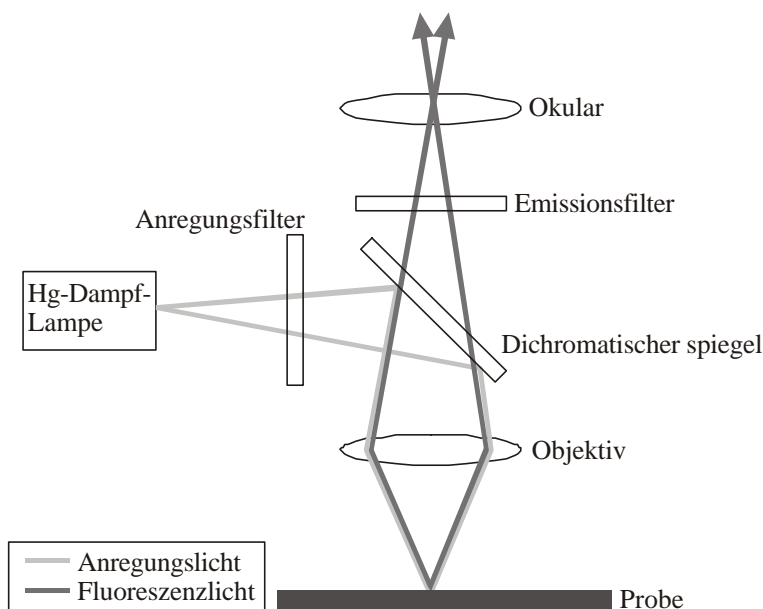


Abbildung 10. Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops.

Vereinfacht dargestellt besteht das optische System eines Fluoreszenzmikroskops neben den Linsensystemen aus einer Lichtquelle, einem Anregungsfilter, dem dichromatischen Spiegel und einem Emissionsfilter (Abbildung 10). Der Anregungsfilter lässt dabei selektiv nur Licht der Anregungswellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes durch. Der dichromatische Spiegel reflektiert dieses Licht zunächst auf die Probe, die Licht mit einer größeren Wellenlänge emittiert, für das der dichromatische Spiegel durchlässig ist. Der Emissionsfilter selektiert wiederum nur Licht mit der Emissionswellenlänge, so dass die Hintergrundlichtstrahlung fast völlig ausgegrenzt werden kann.

Tabelle 9. Verwendete Filterblöcke

<b>Filterblock</b>	<b>Anregungsfilter</b>	<b>Dichromatischer Spiegel</b>	<b>Emissionsfilter</b>
DAPI	355 ± 30 nm	455 nm	495 ± 20 nm
Fluorescein, GFP	485 ± 20 nm	505 nm	530 ± 20 nm
Texas Red	580 ± 25 nm	600 nm	630 ± 20 nm

Für die Durchführung von Fluoreszenzuntersuchungen und die Erstellung von mikroskopischen Abbildungen wurde ein inverses Fluoreszenzmikroskop verwendet, das mit drei verschiedenen Filterblöcken (Tabelle 9) und vier Objektiven (20×, 40×, 63× long distance, 100× Ölimmersion) ausgestattet war. Die Dokumentation erfolgte mit einer Videokamera, gekoppelt an ein computergestütztes Bilderfassungssystem. Es konnten Zellen in Petrischalen, Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten oder Kammerdeckgläsern betrachtet werden. Die Zellen wurden vor der Betrachtung mit PBS gewaschen und dann entweder mit PBS oder Farblosmedium versetzt.

#### *Geräte*

Fluoreszenzmikroskop: Axiovert 100M (Zeiss), Videokamera, Filterblöcke (Tabelle 9, Omega)

#### *Puffer und Lösungen*

Dulbecco's PBS (Gibco), Farblosmedium (DMEM mit Glutamax, 4,5 g/l Glucose (Gibco, Nr. 3010321), 10 % fötales Kälberserum)

### **2.3.6 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie**

Bei der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie wird ähnlich wie bei der Fluoreszenzmikroskopie die spezifische Lichtemission von Fluoreszenzfarbstoffen zum Anfärben zellulärer Strukturen ausgenutzt. Im Gegensatz zu einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop erlaubt das CLSM jedoch die Betrachtung optischer Schnitte des Präparates und somit eine exakte Kolokalisation unterschiedlich gefärbter Strukturen (Matsumoto, 1993).

Das Anregungslicht wird von einem Laser erzeugt, gefiltert und mit einem dichromatischen Spiegel durch das Objektiv auf die Probe gelenkt (Abbildung 11). Das emittierte Fluoreszenzlicht der Probe gelangt durch das Objektiv, den dichromatischen

Spiegel und einem Emissionsfilter zu dem Detektor. Vor dem Detektor befindet sich eine Lochblende, das sogenannte Pinhole, das verhindert, dass emittiertes Streulicht von Fluorophoren aus anderen Fokusebenen auf den Detektor trifft. Der Durchmesser des Pinholes bestimmt die Dicke des betrachteten optischen Schnittes. Der Detektor ist ein Photomultiplier, so dass jeder Bildpunkt einzeln detektiert wird. Das Anregungslicht des Lasers wird dann so abgelenkt, dass das gesamte Bild rasterartig abgelesen wird (Matsumoto, 1993). Dabei wird jeweils nur ein Schwarz/Weiß-Bild erzeugt, dem nachträglich ein Farbkanal zugewiesen wird. Verschiedene Fluoreszenzen können auf diese Weise in unterschiedliche Farbkanäle eingelesen werden, die anschließend digital zu einem Farbbild kombiniert werden können

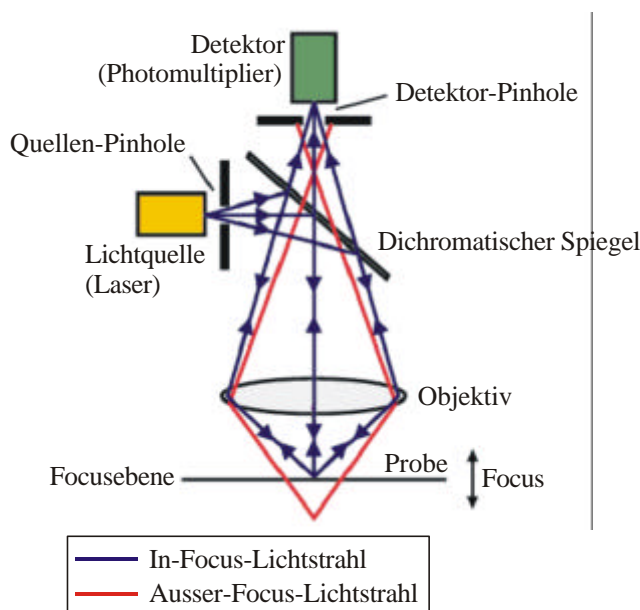


Abbildung 11. Schematische Darstellung des Strahlengangs im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop. Durch ein Detektor Pinhole wird verhindert, dass Streulicht von außerhalb der Fokusebene auf den Detektor trifft (nach <http://www.cs.ubc.ca/spider/ladic/confocal.html>).

Tabelle 10. Zur Verfügung stehende Anregungslaser am CLSM

Laser	Leistung	Emissionslinien
Argon	25 mW	458 nm, 488 nm, 514 nm
Argon/Krypton	30 mW	488 nm, 568 nm
Helium/Neon	1 mW	543 nm
Helium/Neon	5 mW	633 nm
Argon	80 mW	351 nm, 364 nm

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurde zur Untersuchung der Aufnahme von virusanalogen Partikeln in eukaryontische Zellen verwendet. Dazu wurden die Proben entsprechend der Anwendung in einem 8-Well Kammerdeckglas vorbereitet und

direkt am CLSM betrachtet. Zur Anregung der Proben standen verschiedene Laser zur Verfügung (Tabelle 10). Die Betrachtung erfolgte mit einem 63× Wasserimmersionsobjektiv, wobei Bilder mit einer Größe von 1024×1024 Bildpunkten aufgenommen wurden.

Alle CLSM-Untersuchungen wurden am Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, durchgeführt, mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Bettina Hause.

### Geräte

Konfokales Mikroskop: LSM4 (Zeiss)

### 2.3.7 Durchfluss-Zytometrie

Die Durchfluss-Zytometrie erlaubt die statistische Analyse einzelner Zellen im Hinblick auf ihre Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften (Carter & Meyer, 1994). Die Vorwärtslichtstreuung hängt von der Größe der Partikel ab, die Seitwärtsstreuung von ihrer Form. Die Fluoreszenz kann durch exprimierte Proteine (z.B. GFP, DsRed), angefärbte Zellbestandteile (z.B. DNA) oder markierte Antikörper hervorgerufen werden (Ormerod, 1994). Die simultane Messung dieser Parameter erlaubt eine exakte Unterscheidung verschiedener Populationen innerhalb einer Zellsuspension. Für die Messung wird in ein Flusssystem gleichmäßig die Probe injiziert, die dann zusammen mit der Trägerflüssigkeit eine Düse passiert und sich somit in einem feinen Flüssigkeitsstrahl befindet (Abbildung 12). Der Strahl wird an einem Laser vorbei geleitet, der die Fluorophore in der Probe anregt. Gleichzeitig zu der Fluoreszenzemission wird die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Lichts gemessen. Die Flussgeschwindigkeit und der Probenauftrag werden so eingestellt, dass für jede Messung jeweils nur eine einzelne Zelle den Messpunkt passiert. Die Auswertung erfolgt dann als Statistik über die Eigenschaften einzelner Zellen.

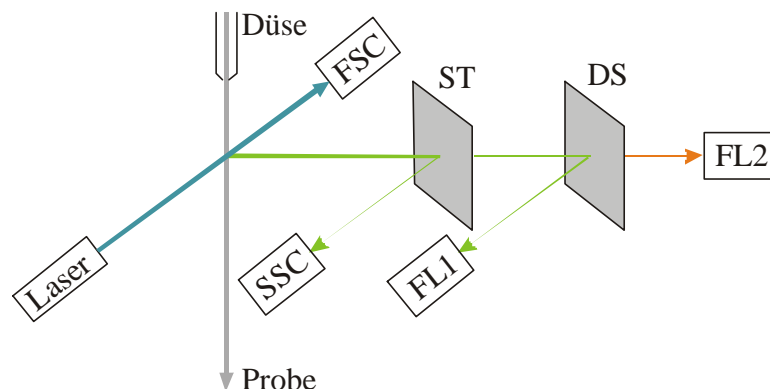


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Messanordnung in einem Durchfluss-Zytometer. Über Photomultiplier werden Seitwärts- (SSC) und Vorwärtslichtstreuung (FSC), sowie Fluoreszenz 1 (FL1) und Fluoreszenz 2 (FL2) gemessen. Die Strahlenteilung erfolgt über Strahlenteiler und dichromatische Spiegel (ST, DS).

*Probenvorbereitung*

Zur Messung am Durchfluss-Zytometer wurden die Zellen einer 35 mm-Petrischale nach Aufnahmeexperimenten oder Expressionsexperimenten mit PBS gewaschen, trypsiniert, in 2 ml Medium resuspendiert und in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Anschließend wurde für 5 min bei  $800 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen und dann unter Rühren mit einem Vortex-Rührer in 3 ml Paraformaldehyd-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation wurden die fixierten Zellen erneut zentrifugiert (5 min,  $800 \times g$ ) und abschließend in 2 ml PBS resuspendiert. Die Proben wurden im Dunkeln bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  bis zur Messung gelagert.

*Messung*

Der Druck zur Probeninjektion wurde so eingestellt, dass jeweils ca. 200 bis 500 Zellen pro Sekunde vermessen wurden. Insgesamt wurden 10000 Zellen einer Probe analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software FACScout.

Alle Messungen wurden am Institut für medizinische Immunologie, Universitätsklinik, Halle mit der freundlichen Unterstützung von Dr. Mathias Löhn und Dr. Alexander Santos durchgeführt.

*Geräte*

Durchfluss-Zytometer: FACSVantage, FACScalibur (Becton-Dickinson), FACS-Röhrchen (Falcon)

*Puffer und Lösungen*

Zellkulturmedium, PBS (Gibco), Paraformaldehyd-Lösung (4 % Paraformaldehyd in PBS)

**2.3.8 Fluoreszenzfärbung der Zellkerne, Endosomen und Lysosomen**

Zur Visualisierung mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken können subzelluläre Strukturen mit geeigneten Farbstoffen selektiv angefärbt werden. Das kann entweder durch markierte Antikörper erfolgen, die an bestimmte Proteine binden, oder direkt durch eine spezifische Bindung der Farbstoffe. Bei Verwendung bestimmter Farbstoffe oder markierter Antikörper müssen die Zellen fixiert und permeabilisiert werden, damit eine Bindung innerhalb der Zellen erfolgen kann. Andere Farbstoffe werden dagegen von lebenden Zellen aufgenommen und werden einfach dem Zellkulturmedium zugesetzt.

Für eine Markierung subzellulärer Strukturen wurden am Vortag 40000 bis 60000 Zellen pro  $\text{cm}^2$  in ein 8-Well-Kammerdeckglas ausgesät. In den einzelnen Kammern erfolgte dann die Inkubation mit dem jeweiligen Farbstoff (Tabelle 11).

Tabelle 11. In der Arbeit verwendete Farbstoffe und fluoreszenzmarkierte Substanzen (Angaben der Fa. Molecular Probes)

Kompartiment	Farbstoff	Ex/Em [nm]
Zellkern	SYTO 16	488/518
Lysosomen	LysoSensor Yellow/Blue	384/540
frühe Endosomen	Transferrin-Fluorescein	496/522
Endosomen	Dextran(70 kDa)-Fluorescein	488/515

#### *Färbung der Zellkerne*

Die Zellkerne wurden mit dem grün-fluoreszierenden Farbstoff SYTO 16 visualisiert. SYTO 16 bindet spezifisch an DNA und wird von lebenden Zellen aufgenommen (Yan *et al.*, 1999). Zur Färbung wurde die SYTO 16-Lösung 1000-fach in Zellkulturmedium verdünnt. Nach einer Stunde Inkubation wurde das Medium entfernt und zweimal mit PBS gewaschen.

#### *Färbung der Lysosomen*

Schwach basische Amine werden selektiv in zellulären Kompartimenten mit einem niedrigen internen pH-Wert akkumuliert und können somit zur Untersuchung der Biogenese und Pathogenese von Lysosomen verwendet werden (Griffiths *et al.*, 1988). Auf ähnliche Weise werden LysoSensor-Farbstoffe nach Protonierung in Lysosomen angereichert. Darüber hinaus hebt die Protonierung der schwach basischen Seitenkette das Quenching des Fluorophors auf, so dass eine Fluoreszenzintensitätszunahme beobachtet wird. Durch diesen Effekt ist es möglich, pH-Werte der Kompartimente zu bestimmen (Diwu *et al.*, 1999).

Für die Färbung der Lysosomen wurden dem Zellkulturmedium 1 bis 5  $\mu\text{M}$  LysoSensor Yellow/Blue zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 bis 60 min. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

#### *Färbung von frühen Endosomen*

Transferrin ist ein monomeres Serumglykoprotein (ca. 80 kDa), das zwei  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen bindet und über rezeptorvermittelte Endozytose in Wirbeltierzellen transportiert (Rothenberger *et al.*, 1987). Sobald  $\text{Fe}^{3+}$ -tragende Transferrinproteine in Endosomen sind, verursacht die saure Umgebung eine Dissoziation des Eisens von dem Transferrin-Rezeptor-Komplex (Yamashiro *et al.*, 1984). Nach der Freisetzung der Eisenionen wird das Apotransferrin recycelt und zur Zellmembran zurücktransportiert, wo es von dem Rezeptor freigesetzt wird. Unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Transferrin können auf diese Weise frühe Endosomen markiert werden (Thorstensen & Romslo, 1988).

In das Zellkulturmedium wurden 1 bis 10  $\mu\text{g/ml}$  Transferrin-Fluorescein zugegeben. Nach einer Inkubation von mindestens 15 min wurden die Zellen am Mikroskop betrachtet.



### *Färbung von Endosomen*

Dextrane sind innerhalb von tierischen Zellen chemisch inert, aufgrund ihrer ungewöhnlichen  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Bindungen. Fluorescein-markierte Dextrane können unspezifisch in endozytotische Vesikel und Lysosomen der Zellen aufgenommen werden (Berlin & Oliver, 1980, Ohkuma & Poole, 1978). Im sauren Milieu nimmt jedoch die Fluoreszenzintensität stark ab, so dass vor allem frühe und späte Endosomen angefärbt werden (Dunn *et al.*, 1994).

Zur Anfärbung früher und später Endosomen wurde dem Zellkulturmedium 10 bis 20  $\mu\text{g/ml}$  Dextran(70 kDa)-Fluorescein zugesetzt. Die Zellen wurde eine Stunde inkubiert und dann zweimal mit PBS gewaschen.

### *Puffer und Lösungen*

SYTO 16 (1 mM), LysoSensor Blue/Yellow (1 mM), Transferrin-Fluorescein, Dextran(70 kDa)-Fluorescein (alle Molecular Probes)

## **2.4 Virologische Methoden**

### **2.4.1 Vermehrung von murinen Polyomaviren**

Die Herstellung muriner Polyomaviren und davon abgeleiteter Varianten erfolgte in NIH 3T3-Zellen. Dazu wurden die Zellen mit einer der in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Methoden transient mit einem Vektor transfiziert, der das Polyomavirusgenom enthielt. Nach zwei Tagen wurde nochmals das Medium erneuert. Die Kultur wurde dann weitere fünf bis sechs Tage inkubiert, in dieser Zeit zeigten sich deutliche zytopathische Effekte von der Ausbreitung des Virus. Da das Virus in das Medium freigesetzt wurde, konnte der Überstand direkt zur Infektion weiterer Kulturen oder zur Titerbestimmung eingesetzt werden.

### **2.4.2 Plaque-Assay**

Der Polyomavirus-Titer einer Lösung kann durch einen Plaque-Assay bestimmt werden (Goldman & Benjamin, 1975). Dazu wird eine Zellkultur ein bis zwei Stunden mit Viren inkubiert, so dass eine Bindung an die Zellen, aber keine Replikation möglich ist. Durch eine Überschichtung mit Agarosehaltigem Medium wird eine Diffusion neugebildeter Viren verhindert, so dass einzelne Plaques entstehen.

Die Bestimmung des Polyomavirustiters erfolgte mit NIH 3T3-Zellen (Goldman & Benjamin, 1975, Freund *et al.*, 1991). Etwa zu 80 % konfluente Kulturen wurden für 2 h mit unterschiedlichen Verdünnungen einer Virus-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml einer Mischung aus 37 °C warmen 2×DMEM und 42 °C warmer, autoklavierter Agar-Lösung überschichtet. Nach Erstarren des Mediums wurden die Zellen für 5 bis 7 d bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Zur Visualisierung der Plaques wurden die Schalen nochmals mit einem analogen Medium/Agar-Gemisch überschichtet, dem jedoch zusätzlich 40 % (w/v)

Neutralrot-Lösung zugesetzt wurde. Die Virusplaques wurden dadurch als rote Flecken sichtbar.

#### *Puffer und Lösungen*

2× DMEM (2× Dulbecco's Modified Eagle's Medium ohne Phenolrot (Gibco), 10 % Kälberserum (Gibco)), Agar-Lösung (1.8 % Agar Agar), Neutralrot-Lösung (Gibco)

### **2.4.3 Hämagglutinations-Assay**

Der Hämagglutinations-Assay beruht auf der Hämagglutination von Erythrozyten durch Wechselwirkung mit Proteinen, die an die Erythrozytenoberfläche binden. Dieser Effekt kann durch zahlreiche Viren vermittelt werden. Bei Polyomavirus wird die Hämagglutination durch die Bindung des Proteins VP1 an Sialylsäure-terminierte Kohlenhydrate ausgelöst (Cahan & Paulson, 1980). Der Assay kann dadurch zum Test der Bindungsfähigkeit von unterschiedlichen VP1-Varianten an Sialyllactose verwendet werden. Außerdem kann durch Bestimmung der minimalen Konzentration, bei der noch Hämagglutination beobachtet wird, der Virustiter in einer Lösung bestimmt werden.

Der Assay erfolgte gemäss Freund *et al.* (1991). Dafür wurden 200 µl einer Schaf-Erythrozyten-Suspension für 5 min bei 800 ×g zentrifugiert und zweimal mit TDS gewaschen. Die Erythrozyten wurden dann in 2 ml TDS resuspendiert. Von den Proben wurde eine 8-fache Verdünnungsreihe in einer 96-Well-Rundbodenplatte angesetzt, wobei jeweils 1:2 verdünnt wurde. Das Probenvolumen betrug 50 µl. Zu den Proben wurden jeweils 50 µl der zuvor hergestellten Erythrozyten-Suspension zupipettiert. Die Platte wurde dann für 10 min bei 37 °C und über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend abfotografiert.

#### *Geräte*

96-Well-Rundbodenplatte (Nunc), Digitalkamera: DC210 (Kodak)

#### *Reagenzien*

Schafs-Erythrozyten (Dade Behring)

#### *Puffer und Lösungen*

TDS (137 mM NaCl, 51 mM KCl, 0.38 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 24.8 mM Tris, pH 7.2 (HCl))

## **2.5 Strukturmodellierung**

Mit dem Programm Modeller 4 (Sali & Blundell, 1993) wurden die Strukturen von VP1-WW150 und VP1-WW14 modelliert. Die Modellierung von VP1-1RGD150 erfolgte über Swissmodel (<http://www.expasy.ch>). Die Modelle wurden basierend auf den publizierten Kristallstrukturen von VP1 berechnet. Für die Kernstruktur des VP1 wurde die 1.9 Å-Struktur zugrundegelegt (Stehle & Harrison, 1997, PDB-Eintrag:

1vpn), und für die in dieser Struktur nicht aufgelösten N- und C-Termini wurde die 3.65 Å-Struktur des Kapsids verwendet (Stehle *et al.*, 1996, PDB-Eintrag: 1sid). Die Struktur der WW-Domäne wurde anhand der NMR-Struktur der WW-Domäne des Yap-Proteins modelliert (Macias *et al.*, 1996).

Die Modellierung der Strukturen wurde freundlicherweise von Dr. Gerald Böhm durchgeführt.

## 2.6 Bakterienstämme und Zelllinien

In Tabelle 12 werden die verwendeten Bakterienstämme mit ihren Genotypen (zur Erklärung der Genotypsymbole siehe Bachmann, 1983) und Bezugsquellen aufgeführt.

Tabelle 12. Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL-1-blue	F <sup>'</sup> , <i>Tn10</i> , <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>B</i> <sup>+</sup> , <i>lac</i> <sup>F</sup> , <b>D</b> ( <i>lacZ</i> )M15/ <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA</i> 96(NaI <sup>F</sup> ), <i>thi</i> , <i>hsdR</i> 17( <i>r</i> <sub>K</sub> <sup>-</sup> <i>m</i> <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F <sup>'</sup> , <i>mcrA</i> , <b>D</b> ( <i>mcrCB</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mrr</i> ), <i>endA1</i> , <b>f80</b> <i>lacZ</i> Δ15, <b>D</b> <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD</i> 139, <b>D</b> ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> , <i>galK</i> <i>rpsL</i> ( <i>Str</i> <sup>'</sup> ) <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	B, F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>gal</i> , [ <i>dcm</i> ], [ <i>lon</i> ], <i>hsdSB</i> ( <i>rB</i> - <i>mB</i> -), <i>gal λ</i> (DE3)	Novagen
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>'</sup> / <i>endA1 hsdR17</i> ( <i>r</i> <sub>K</sub> <sup>-</sup> <i>m</i> <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>supE44 thi-1 recA1</i> <i>gyrA</i> (NaI <sup>F</sup> ) <i>relA1 D</i> ( <i>lacIZYA-argF</i> )U169 <i>deoR</i> ( <b>f80</b> <i>dlacD</i> ( <i>lacZ</i> )M15)	Instituts-Sammlung

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die verwendeten eukaryontischen Zelllinien.

Tabelle 13. Verwendete eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	ECACC-Nr.	ATCC-Nr.	Bezugsquelle
C2C12	91 031 101	CRL-1772	ECACC
NIH 3T3	93 061 524	CCL-92	Christiane Wobus, DKFZ, Heidelberg
C127LT	nicht erhältlich	CRL-1804	ATCC

## 2.7 Plasmide und Oligonukleotide

### *Plasmide*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, sowie deren Bezugsquelle sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14. Verwendete Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pCR-Blunt	Invitrogen
pCR-BluntII-Topo	Invitrogen
pCYB2	New England Biolabs
pET21a	Novagen
pcDNA6-TR	Invitrogen
pcDNA4-TO	Invitrogen
pGEX-2TK-WWa	Mark Bedford, Harvard Medical School, Boston
pET34b	Novagen
pEGFP-N1	Clontech
pDsRED-N1	Clontech
pX3f-pYA3	ATCC
pVP1	Robert Garcea, University of Colorado

### *Oligonukleotide*

Einen Überblick über die verwendeten Oligonukleotide gibt Tabelle 15.

Tabelle 15. Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' @ 3')
VP1-NdeI-5'*	TATACATATG GCCCCCAAAA GAAAAAGC
VP1-XmaI-3'	ATATCCCGGG AGGAAATACA GTCTTTGTTT TTCC
Intein-EcoRI-3'	ATATGAATTC CAGTCATTGA AGCTGCCACA AGG
VP1-ΔC61-3'	ATTACCCGGG ATAGGGATTT TTGACCCATC
VP1N-14-5'	GCGCGCGCAT ATGAGCACCA AGGCTAGCCC AAGACCCG
C123Sf	GTCTCTAAAA GCGAGACAAA AAGCACAAAG GCTAGCCCAA GACCC
C123Sr	GGGTCTTGGG CTAGCCTTTG TGCTTTTTGT CTCGCTTTTA GAGAC
C4Sf*	GAGGACCTCA CGTCTGACAC CCTAC
C4Sr*	GTAGGGTGTC AGACGTGAGG TCCTC
C56Sf	GGGCCCTCA GCAAAGGAGA AGGTCTATAC CTCTCGAGCG TAGATATAAT G
C56Sr	CATTATATCT ACGCTCGAGA GGTATAGACC TTCTCCTTTG CTGAGGGGCC C
VP1-T248Cf	CACTGGAGGC ACGTGCACCC CACCCGTCC

---

VP1-T248Cr	GGACGGGTGG	GGTGCACGTG	CCTCCAGTG	
VP1-C248Tf	CACTGGAGGC	ACGACCACCC	CACCCGTCC	
VP1-T248Cr	GGACGGGTGG	GGTGGTCGTG	CCTCCAGTG	
VP1-S19Cf	GCACAAAGGC	TTGTCCAAGA	CCCGC	
VP1-S19Cr	GCGGGTCTTG	GACAAGCCTT	TGTGC	
VP1-S114Cf	GAGGACCTCA	CGTGTGACAC	CCTAC	
VP1-S114Cr	GTAGGGTGTC	ACACGTGAGG	TCCTC	
VP1-Loop150f	CAACAAACCC	ACAGATACAG	TAAACGGCAG	CGGCAGCGGC
	AGCAGCGGCA	GCGGCAGTGC	AAAAGGAATT	TCCACTCCAG
	TG			
VP1-Loop150r	CACTGGAGTG	GAAATTCCTT	TTGCACTGCC	GCTGCCGCTG
	CTGCCGCTGC	CGCTGCCGTT	TACTGTATCT	GTGGGTTTGT
	TG			
VP1-Loop292f	GATATAATGG	GCTGGAGAGT	TACCGGCAGC	GGCAGCGGCA
	GCAGCGGCAG	CGGCAGTGGC	TATGATGTCC	ATCACTGGAG
VP1-Loop292r	CTCCAGTGAT	GGACATCATA	GCCACTGCCG	CTGCCGCTGC
	TGCCGCTGCC	GCTGCCGTA	ACTCTCCAGC	CCATTATATC
1RGDf	CGGCAGCGGC	AGCGGCAGCG	GTCGTGGCGA	TAGCGGCAGC
	GGCAGCGGCA	GTG		
1RGDr	CACTGCCGCT	GCCGCTGCCG	CTATCGCCAC	GACCGCTGCC
	GCTGCCGCTG	CCG		
VP1R77Wr	CAAATTAATC	CCCCAGCTCC	AACCATAG	
VP1R77Wf	CTATGGTTGG	AGCTGGGGGA	TTAATTTG	
FBP11-WWaN	ATACTCTTCA	GGCAGCGGCT	GGACAGAACA	TAAATCACCT
	GATGG			
FBP11-WWaC	ATACTCTTCT	ACCACTACCA	TCATCCGGCT	TTTCCCAGGT
	AGACTG			
VP1-150-WWaC	ATACTCTTCA	GGTAGCGGCG	TAAACACAAA	AGGAATTTCC
	ACTCCAG			
VP1-150-WWaN	ATACTCTTCA	GCCGCTGCCT	GTATCTGTCTG	GTTTGTGAA
	CCCATG			
VP1-292-WWaN	ATACTCTTCA	GCCGCTGCC	CAGCCCATTA	TATCTACGCT
	CGAG			
VP1-292-WWaC	ATACTCTTCA	GGTAGCGGCG	TTACAAGAAA	CTATGATGTC
	CATCAC			
Linker-5'-c	CATGGGACGT	CGCTAGCCCA	CGCCGGCCTA	GGCCTGGTAA
	CGGAGGTGGC	GGTGGAGGTG	GCGGCA	
Linker-5'-s	TATGCCGCCA	CCTCCACCGC	CACCTCCGTT	ACCAGGCCTA
	GGCCGGCGTG	GGCTAGCGAC	GTCC	
Linker-3'-c	CCGGGTAAAG	GCGGTGGCGG	TGGAGGCGGC	GGACCTGAGG
	CACGTCCGCT	TAAGC		
Linker-3'-s	CATGGCTTAA	GCCGACGTGC	CTCAGGTCCG	CCGCCTCCAC
	CGCCACCGCC	TTTAC		
T7lac-Seq*	CACTATAGGG	GAATTGTGAG	CGG	
WW-NdeI-3'	AATATATCAT	ATGTCCATCA	TCCGGCTTTT	CCCAGGTAGA
	CTG			

---

---

WW-NdeI-5'	TATTAATCAT	ATGAGCGGCT	GGACAGAACA	TAAATCACCT	
	GATGG				
GFP-SphI-3'	TATAAGCATG	CAGAATGGGC	GGAAGTGGGC	G	
GFP-NsiI-5'	TATAATGCAT	AGCAAGGGCG	AGGAGCTGTT	C	
GFP-NheI-5'	TTAAGCTAGC	GGATCCGGTG	AGCAAGGGCG	AGGAGCTG	
GFP-BglII-3'	GAAGATCTTG	TCCAGATAGC	CCAGTAGC		
GFP-BamHI-5'	AAGGATCCAC	CGGTCGCCAC	C		
GFP-EcoRI-5'	AGAATTCTTA	CTTGTACAGC	TCGTCCATGC		
PyNsiIf	CTCACCACCA	TCATGCATAG	AGTTCTGAGC		
PyNsiIr	GCTCAGAACT	CTATGCATGA	TGGTGGTGAG		
PySphIf	GCGCCATCTC	CTTGTATGCA	CCATTCCTTG		
PySphIr	CAAGGAATGG	TGCATACAAG	GAGATGGCGC		
PyEarlySeq*	GATATAATTA	AGCCCCAACC	GC		
T-Anti-BamHI-5'	AAGGATCCTC	ACCACCATCA	TGGATAG		
T-Anti-XhoI-3'	TTTCTCGAGT	CAATAAACTG	TGTATTCAGC	TATAT	
CMVtet-BstBI-5'	TTTATTCGAA	CGCGTTGACA	TTGATTATTG	ACTA	
BGHPA-3'-BstBI	TAATTTTCGAA	GCCATAGAGC	CCACCGC		
PolyT	TTTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTT	TTTTT		
GAPDH-5'	GAGAAATATG	ACAACACTCACT	CAAG		
GAPDH-3'	ATGGTATTCA	AGAGAGTAGG	GAG		
$\beta$ -Actin-5'	GCTGTGCTGT	CCCTGTATGC	C		
$\beta$ -Actin-3'	AAACGCAGCT	CAGTAACAGT	CC		
$\alpha_v$ -Integrin-5'	GTCATCTCAT	CACCAAGCGG	G		
$\alpha_v$ -Integrin-3'	AGAGTGGCGC	CACTTAAGAA	GC		
RT-T-Anti-5'	GAGAATGAAT	CTAGGAGGAA	CC		
RT-T-Anti-3'	CGGGTGTATC	TGTTGGAGAA	C		
RT-VP1-3-5'	GCCCTCCGCC	ATCTTCTGAA	G		
RT-VP1-3-3'	GTGAGCCAGA	GCCCACCACC			

---

\* Diese Oligonukleotide waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD-800 markiert.