

2 Geräte, Materialien und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller/Anbieter
Blotting-Apparatur TRANS-BLOT 5D	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
CCD-Kamera Spot RT SLIDER	Visitron Systems, Puchheim
CO ₂ -Inkubator MCO-17AI	Sanyo, Gunma, Japan
Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
DNA-Gelelektrophorese GEB1A-UVT	Hybaid AGS, Heidelberg
Dounce-Homogenisator 7ml	WHEATON, Millville, USA
Eismaschine ZBE 30-10	ZIEGRA, Isernhagen
Feinwaage A120S-D1	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert S100	Zeiss, Jena
FPLC-System	Pharmacia Biotech, Erlangen
Gasbrenner Gasprofi 1	WLD-TEC, Göttingen
Gefriertruhe ECC-2080-5	National Lab, Mölln
Gelelektrophorese-System Mini-Protean II	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Inkubationsschrank B6 FUNCTION line	Hereus, Hanau
Kreischüttler GFL 3005	GFL, Burgwedel
Kryobehälter GT35 und ARPEGE40	AIRLIQUIDE, Marne-la-Vallee, Frankreich
Laserscanning-Mikroskop LSM510	Zeiss, Jena
Magnetrührer MR3000	Heidolph, Schwabach
Mikromörser	Roth, Karlsruhe
Mikroskopkamera MC80DX	Zeiss, Jena
Millipore Modell 8003 (Ultrafiltration)	Amicon, Witten
PCR-Gerät PCR Sprint	Hybaid AGS, Heidelberg
pH-Meter	Multilab, Berlin
Photometer SmartSpec 3000	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Plattenreader HTS 7000 PLUS	Perkin Elmer, Überlingen
Plattenreader SUNRISE	TECAN, Crailsheim
Reinstwasseranlage PURELAB Plus UV	USF SERAL, Ransbach-Baumbach
Schüttelinkubator KS-15/TH-15 und SM-30/TH-30	Bühler, Tübingen
Scintillator TRI-CARB 2100ZR	Packard, Dreieich
Sicherheitswerkbank KR-125 SAFETY	KOJAIR, Vilppula, Finnland
Sonifikator Sonopuls SH70G	BANDELIN, Berlin
Spektralfluorimeter SFM 25	Kontron, Neufahrn
Stromversorgungsgerät POWER-PAC 200 und 300	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
Tischzentrifuge Biofuge pico	Hereus, Osterode
Ultrazentrifuge Optima Max	Beckman, Palo Alto, US
UV-System	iNTAS, Göttingen
Vortex 2 Genie	Scientific Industries, Bohemia, US
Wasserbad DC10	HAAKE, Karlsruhe
Wasserbad F25	Julabo, Seelbach
Zentrifuge Allegra 21R und Avanti J20	Beckman, Palo Alto, US

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, in der Reinheitsstufe „z.A.“ von den Firmen Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Zur Herstellung von wässrigen Lösungen wurde Reinstwasser aus der Anlage PURELAB PLUS UV (Fa. PURELAB) verwendet.

Die Aufzählung der Substanzen erfolgt in alphabetischer Reihenfolge.

Kulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller/Anbieter
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Hefe-Extrakt	Difco, Augsburg
Bacto-Trypton	Difco, Augsburg
Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium (D-MEM, 41966029))	Invitrogen, Groningen, NL
Dulbecco`s PBS ohne Kalzium und Magnesium	Invitrogen, Groningen, NL
OPTIMEM 1	Invitrogen, Groningen, NL
RPMI Medium 1640	Invitrogen, Groningen, NL
Trypsin-Lösung mit 0,05% EDTA	Invitrogen, Groningen, NL
PFHM II Medium mit GLUTAMAX II	Invitrogen, Groningen, NL

Bioaktive Substanzen

Produkt	Hersteller/Anbieter
(Arg ⁸)-Vasopressin	Bachem, Heidelberg
Bradykinin	Calbiochem, Bad Soden
Carbachol	Calbiochem, Bad Soden
Forskolin	Calbiochem, Bad Soden
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
(-)-Isoproterenol	Sigma, Deisenhofen
Oxytocin	Sigma, Deisenhofen
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Calbiochem, Bad Soden
rATP	Sigma, Deisenhofen
(RS)-3,5 Dihydroxyphenylglycin (DHPG)	Tocris, Bristol, UK
Serotonin	Sigma, Deisenhofen
Somatostatin	Sigma, Deisenhofen
Substanz P	Bachem, Heidelberg

Antibiotika

Produkt	Hersteller/Anbieter
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
G418	Calbiochem, Bad Soden
Gentamycin	Gibco BRL, Neu Isenburg
Kanamycin	Calbiochem, Bad Soden

Substrate und Inhibitoren

Produkt	Hersteller/Anbieter
AMC (7-amino-4-methylcoumarin)	Bachem, Heidelberg
AEBSF	ICN, Eschwege
Bacitracin	Sigma, Deisenhofen
Chymostatin	Sigma, Deisenhofen
Fmoc-AlaPyr-CN	Probiodrug AG, Halle/S.
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Nocotazol	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin A	ICN, Eschwege
Ribonuclease Inhibitor RNasin	Promega, Mannheim
E64 (trans-Epoxy succinyl-leucylamido-[4-guanidino]butan)	ICN, Eschwege
U73122 (1-[6-17 β -3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione)	Calbiochem, Bad Soden
Z-Gly-Pro-AMC	Bachem, Heidelberg
Z-Phe-Pro-BT	Probiodrug AG, Halle/S.

Primäre und Sekundäre Antikörper

Produkt	Hersteller/Anbieter
monoklonaler Calnexin-Antikörper	New England BioLab, Frankfurt/M
monoklonaler PDI-Antikörper	StreßGen, Victoria, CAN
monoklonaler Tubulin-Antikörper	Sigma, Deisenhofen
polyklonaler Actin-Antikörper	Sigma, Deisenhofen
polyklonaler c-fos-Antikörper (Ab-2)	oncogene, Darmstadt
polyklonaler PEP-Antikörper	Probiodrug AG, Halle/S.
polyklonaler Tubulin-Antikörper	Sigma, Deisenhofen
Ziege Anti-Kaninchen IgG FITC konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Kaninchen IgG Peroxidase konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Kaninchen IgG Rhodamin Red-X konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgG Peroxidase konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgM Peroxidase konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgG Rhodamin Red-X konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgM Rhodamin Red-X konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege Anti-Maus IgM TRITC konjugierter Antikörper	dianova, Hamburg

Enzyme

Produkt	Hersteller/Anbieter
Alkalische Phosphatase (CIAP)	Promega, Mannheim
Alkalische Phosphatase (SAP)	Promega, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Boehringer, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Pfu DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
rekombinante humane Prolylendopeptidase	Probiodrug AG, Halle/S.
RNase H	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase	New England BioLab, Frankfurt/M
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	Promega, Mannheim

Sonstige Chemikalien

Produkt	Hersteller/Anbieter
DTT (1,4 Dithiothreitol)	Roth, Karlsruhe
TEMED (1,2- (N,N,N',N'-Tetramethylenediamine)	Sigma, Deisenhofen
DAPI (4',6'-Diamidino-2-phenylidol)	Molecular Probes, Leiden, NL
x-Gal (5-Bromo-4-chloro-indoxyl-phosphat)	Bachem, Heidelberg
Acrylamidlösung rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose Qualex Gold	Hybaid-AGS, Heidelberg
Ammoniumpersulfat	BIO-RAD, Hertfordshire, UK
CITIFLUOR	PLANO, Wetzlar
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
Bradford Reagenz	Sigma, Deisenhofen
DNA-Größenstandard Bioladder 100 pb	Hybaid-AGS, Heidelberg
DNA-Größenstandard Bioladder 1 kb	Hybaid-AGS, Heidelberg
DNA-Oligonukleotide	Metabion, Martinsried
DNA-Oligonukleotidmix	Promega, Mannheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
fura-2 AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Immersol 518F	Zeiss; Oberkochen
IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktopyranosid)	Roth, Karlsruhe
LipofectAMIN 2000	Gibco BRL, Neu Isenburg
Paraformaldehyd	ICN, Eschwege
Pluronic F-127	Molecular Probes, Leiden, NL
Polyfectin	Biontix, München
Protein-Molekulargewichtsstandard MultiMark	Invitrogen, Groningen, NL
Röntgenfilm-Entwickler	Tetanal, Norderstedt
Röntgenfilm-Fixierer	Tetanal, Norderstedt
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Scintillationsreagenz ULTIMA Gold XR	Packard, Dreieich
TRIzol-Reagenz	Gibco BRL, Neu Isenburg

Sonstige Labor-Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller/Anbieter
Autoradiographiekassette	Heinemann Laborfachhandel, Göttingen
Blutentnahmesystem S-Monovette mit Gerinnungsaktivator	Sarstedt, Nümbrecht
Chromatographiesäule HiTrap IgM	Pharmacia Biotech, Erlangen
Deckgläser 20x20 mm	Roth, Karlsruhe
Filterpipettenspitzen	Hybaid AGS, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier GB002	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebekulturflasche 25 cm ² für Suspensionskultur	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflasche 25 cm ² Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflasche 75 cm ² Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
silikonisierte Mikroreaktionsgefäße 2 ml	SORENSEN, Salt lake City, USA
KODAK KB-Film Ektachrome EliteSelect 400	Nordphoto, Norderstedt
Kryoröhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Mikroreagenzgefäße 1,5 und 2 ml	Schubert Laborfachhandel, Espenhain
Nitrozellulose PROTRAN BA83	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger 76x26 mm	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten	Schubert Laborfachhandel, Espenhain
PCR-Mikroreagenzgefäße 0,2 und 0,5 ml	Hybaid AGS, Heidelberg
Petrishalen d=3 cm und d=9,4 cm	Schubert Laborfachhandel, Espenhain
Pipettenspitzen 1000 µl	Gilson, über ABIMED, Langenfeld
Pipettenspitzen 200 und 10 µl	Roth, Karlsruhe
PP-Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml, Gamma-sterilisiert	Schubert Laborfachhandel, Espenhain
Röntgenfilm XL-XPosure	Pierce, über perbio Science, Bonn
Scintillationsmeßflasche, 20 ml	Roth, Karlsruhe
Serologische Einmalpipetten 5, 10 und 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Standard Hämozytometer	Superior, Marienfeld
Ultrafiltrationsmembran MWCO 30000 Da	Millipore, Bedford, USA
Zellkultur-Mikrotiterplatte Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturpetrishalen d=6 und D=9,4 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschale 3001	Becton Dickenson, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen Quick-Seal 30 ml	Beckmann, Palo Alto, USA

Komplett-Systeme (Kit`s)

Produkt	Hersteller/Anbieter
CellTiter96 AQueous Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
CytoTox96 Cytotoxicity Assay	Promega, Mannheim
D-myo-IP ₃ -[³ H] Assay	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
JETquick GelExtraktion Spin Kit	Genomed, Oeynhausen
JETquick PCR Purification Kit	Genomed, Oeynhausen
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed, Oeynhausen
PCR-Script Amp bzw. Cam Cloning Kit	Stratagene, Cedar Creek, USA
THERMOSCRIPT™ RT-PCR Kit	Gibco BRL, Neu Isenburg
Ficoll-Paque PLUS“-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SuperSignal West Pico Chemiluminescence	Pierce, über perbio Science, Bonn

2.2.2 *Escherichia coli*-Stämme

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende *Escherichia coli*-Stämme benutzt:

Epicurian Coli XL10-Gold Kan ^R	(Fa. Stratagene, La Jolla USA, Kat.-Nr. 200315)
Epicurian Coli XL1-Blue Amp ^R	(Fa. Stratagene, La Jolla USA, Kat.-Nr. 200236)
JM109	(Fa. Promega, Mannheim, Kat.-Nr. L10019)

2.2.3 Humane Zelllinien

Folgende humane Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tab. 3 Auflistung der verwendeten humanen Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
A-431	Vulvakarzinom	3*
A-549	Lungenkrebs	3*
BeWo	Keimzelltumor	4*
CACO-2	Adenokarzinom des Dickdarms	4*
CAKI-1	Nierenkarzinom	3*
CAKI-2	Nierenkarzinom	3*
COLO-677	Bronchialkarzinom	3*
COLO-699	Bronchiales Adenokarzinom	3*
DV 145	Prostatakarzinom	3*
ECV-304	Nabelschnurkarzinom	3*
Fibro-177	Bindegewebskarzinom	3*
HEK 293	embryonales Nierenkarzinom	3*
MDA-MB-435S	Mammakarzinom	3*
LN-405	Astrocytom	2* (ACC 189)
LNZ-308	Gliom	3*
PC 3	Adenokarzinom der Prostata	3*
RCC 100	Nierenkarzinom	3*
T98-P31	Gliom	3*
T-Zellen,	Primärkultur	5*
SH-SY5Y	Neuroblastom	2* (ACC 209)
U-138-MG	Glioblastom	2* (ACC 291)
U-343	Gliom	1*

1* Institut für Experimentelle Innere Medizin, Otto von Guericke Universität, Magdeburg

2* Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

3* Dr. Riemann, D., Prof. Langner, J., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Medizinische Fakultät, Institut für Medizinische Immunologie

4* PD Dr. habil. Brandsch, M., Abteilung Tier. Zellkultur und Versuchstierhaltung, Bioservice
GmbH der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

5* Dr. Hoffmann, T., Probiodrug AG, Halle/S.

2.2.4 Plasmid-Vektoren

Folgende Plasmid-Vektoren wurden in dieser Arbeit als Klonierungsvektoren bzw. als Expressionsvektoren eingesetzt:

pPCR-Script Amp SK(+) bzw. Cam SK(+)

(Fa. Stratagene, La Jolla USA, Kat.-Nr.: 211188 bzw. 211192)

Beide Vektoren stammen vom Phagemid-Vektor pBluescript II SK(+) ab und sind besonders für die Klonierung von PCR-Fragmenten geeignet. Die beiden Vektoren unterscheiden sich in dem Vorhandensein der Resistenzgene für die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol. Durch β -Komplementierung des *lacZ*-Genes und Verwendung der Restriktionsendonuklease Srf I während der Ligation ist eine effiziente Selektion positiver Klone möglich.

pEGFP-N3

(Fa. Clontech, Heidelberg, Kat.-Nr.: 6080-1)

Der Vektor pEGFP-N3 ist geeignet für die ektopische Expression von EGFP-Fusionsproteinen in Säugerzellen. Die Fusion erfolgt dabei am N-Terminus des EGFP-Proteines. Diese Technik erlaubt es, Lokalisationsstudien in vivo oder in fixierten Zellen durchführen zu können, ohne spezifische Antikörper verwenden zu müssen. Der Vektor besitzt außerdem noch zwei Resistenzgene zur Selektion in Prokaryonten (Kanamycin-Resistenz) und zur Selektion in Säugerzellen (G418-Resistenz).

pIRESneo

(Fa. Clontech, Heidelberg, Kat.-Nr.: 6060-1)

Der pIRESneo Vektor ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen. Er enthält die sogenannte „internal ribosome entry site, IRES“ aus dem Encephalomyocarditis Virus (ECMV). Damit werden von einem bicistronischen mRNA-Molekül (2 offene Leseraster enthaltend) zwei unabhängige Proteine synthetisiert. Auf Grund dieser Tatsache läßt sich die Expression des Resistenzgenes (G418-Resistenz) mit der Expression des zu untersuchenden Genes koppeln. Der Vorteil dieser Kopplung ist die effiziente Selektion von Zell-Klonen, die das gewünschte Protein/RNA-Molekül in ausreichender Menge produzieren, da nur diese Klone gleichzeitig eine ausreichende Resistenz gegenüber dem eingesetzten Antibiotika aufweisen.

pcDNA3.1.+

(Fa. Invitrogen, Groningen, Kat.-Nr.: V790-20)

Der Vektor pcDNA3.1.+ ist ein Expressionsvektor für Säugerzellen. Die Expression des inserierten Genes läuft konstitutiv unter dem CMV-Promotor ab. Der Vektor besitzt zwei Resistenzgene zur Selektion in Prokaryonten (Kanamycin-Resistenz) und zur Selektion in Säugerzellen (G418-Resistenz).

pCRE-EGFP

(Holloschi, A., Hafner, 2002)

Der Vektor pCRE-EGFP wurde durch Austausch des CMV-Promotorbereiches (pEGFP-N1, Fa. Clontech, Heidelberg, Kat.-Nr.: 6085-1) mit einer 188bp großen CRE-Enhancer/Promotor-Kassette hergestellt. Dadurch ist die Expression des EGFP-Proteines induzierbar. Der Vektor eignet sich für Untersuchungen zur Beeinflussung der Adenylat-Cyclase-Kaskade.

2.2.5 Murine Gewebeproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben aus Rattenhirnen (*Rattus norvegicus ssp. Vistar*, männlich, 7-8 Wochen alt) wurden von Dr. Sokolov, M. (Arbeitsgruppe PD Dr. Balschun, D., Leibnitz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg) präpariert, schockgefroren und im eingefrorenen Zustand an Probiodrug AG verschickt.

2.2.6 Humane Seren und Cerebrospinal-Flüssigkeiten

Die humanen Cerebrospinal-Flüssigkeiten stammen von Spendern ohne klinischen Befund und wurden im Liquor-Labor des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg präpariert (Dr. Kornhuber, Fr. Köhler). Dazu wurden die frisch entnommenen Liquor-Proben bei RT für 10 Minuten mit 1000 u/min zentrifugiert und der zellfreie Überstand bei -20°C gelagert.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Seren stammen aus Frischblut-Präparationen von Mitarbeitern der Firma Probiodrug AG.

2.2.7 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und in lyophilisiertem Zustand verschickt (Tab. 4). Zur Herstellung von Stammlösungen wurden die Oligonukleotide in Aqua dest. gelöst. Die Konzentration betrug generell 100 pmol/ μl . Die Arbeitslösungen (20 pmol/ μl) wurden durch Verdünnung der Stammlösungen mit Aqua dest. erhalten. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgte bei -80°C , die der Arbeitslösungen bei -20°C .

Tab. 4 Verwendete Oligonukleotide.

Die hinsichtlich der chronologischen Nomenklatur fehlenden hPEP-Oligonukleotide wurden synthetisiert, aber nicht in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Oligonukleotid	Nukleotidsequenz
hActin-1	5`-GGA TCC ATG GAT GAT GAT ATC GCC GC-3`
hActin-3	5`-GAT AGC AAC GTA CAT GGC -3`
EGFP-1	5`-GGA GGT CTA TAT AAG CAG AG-3`
EGFP-2	5`-CCG GTG AAC AGC TCC TCG-3`
EGFP-3	5`-ATA GAA TTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C-3`
pcDNA-1	5`-CTA GAA GGC ACA GTC GAG-3`
pIRES-1	5`-CGA CTC ACT ATA GGG AGA C-3`
T7	5`-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3`
reverse primer	5`-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3`
hPEP-1	5`-CAT ATG CTG TCC TTC CAG TAC C-3`
hPEP-2	5`-GAA TTC CGC TGT CAG GAG GAA GCA CG-3`
hPEP-4	5`-GAA TTC TGG AAT CCA GTC GAC ATT CAG-3`
hPEP-5	5`-CAT ATG GGA ATT GAT GCT TCT GAT TAC-3`
hPEP-9	5`-GAA TCC GCT GGA ATC CAG TCG ACA TTC AG-3`
hPEP-12	5`-ATC TCG AGA CCA TGC TGT CCT TCC AGT ACC-3`
hPEP-21	5`-ATA GCG GCC GCC ATG CTG TCC TTC CAG TAC-3`
hPEP-24	5`-TGG AGG TGC AAA TGG AGG C-3`
hPEP-25	5`-GCC TCC ATT TGC ACC TCC A-3`

2.2.8 Nomenklatur von Plasmid-Vektoren und gentechnisch veränderten Organismen

Die Bezeichnung der hergestellten Vektoren erfolgte mit fortlaufenden Nummern in chronologischer Reihenfolge. Außerdem wurde generell der Zusatz „pIS“ (*plasmid Ingo Schulz*) verwendet. Zur Kennzeichnung der gentechnisch veränderten Organismen wurde dem Namen des Organismus die Bezeichnung des transfizierten Vektors beigelegt. Die Bezeichnung von Klonen, bei denen ein Aminosäure-Austausch vorgenommen wurde, erfolgte nach dem Nomenklaturvorschlag von Wetzel (Wetzel et al. 1988).

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierungsmethoden

2.3.1.1 Anzucht und Stammhaltung von *Escherichia coli*

Alle Arbeiten zur analytischen und präparativen Anzucht von *E. coli*-Stämmen wurden gemäß den Protokollen von Sambrook, Fritsch & Maniatis, 1989 ausgeführt. Als Nährmedium wurde generell „LB Broth“ eingesetzt. Für feste Nährmedien (Agar-Platten) wurden zusätzlich 15 g Agar pro Liter LB-Broth-Medium zugefügt. Die Autoklavierung der Nährmedien erfolgte bei 121°C für 20 Minuten.

LB-Broth: 1.0% (w/v) Trypton (Casein-Pepton, tryptisch verdaut)
0.5% (w/v) Hefeextrakt
0.5% (w/v) NaCl

Für die Selektion von Transformanten wurden die Antibiotika Ampicillin (Stammlösung 100 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml), Chloramphenicol (Stammlösung 34 mg/ml, Endkonzentration 34 µg/ml) und Kanamycin (Stammlösung 50 mg/ml, Endkonzentration 50 µg/ml) verwendet. Die Stammhaltung erfolgte auf Agarplatten bei 8°C für ca 4-8 Wochen. Danach erfolgte der Ausstrich auf eine neue Agarplatte. Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden 5 ml ÜNK in LB-Medium angelegt und dann, mit 15 % Glycerin versetzt, zu je 200 µl bei –70°C eingefroren.

2.3.1.2 Kultivierung und Lagerung humaner Zelllinien

Die Kultivierung der einzelnen Zelllinien erfolgte bei 37°C in CO₂-Inkubatoren (Fa. SANYO, Japan). Die verwendeten Medien und CO₂-Konzentrationen sind in Tab.2 aufgeführt. Zusätzlich wurde jedem Medium 60µg/ml Gentamycin zugesetzt. Zur Kultivierung von adhärennten Zelllinien wurden Gewebekulturflaschen und –schalen mit verschiedenen Abmaßen verwendet (Fa. Greiner, Frickenhausen, Fa. TBB, Schweiz, Fa. Becton Dickenson, USA). Die Ablösung adhärennter Zellkulturen von ihrer Wachstumsunterlage erfolgte durch die Behandlung mit einer 2,5 %igen (m/v) Trypsinlösung (Fa. Life Technologies, Karlsruhe) für 1 min bei RT. Nach dem Absaugen der Trypsinlösung wurden die Zellen mit dem entsprechenden Medium bzw. mit PBS resuspendiert und in neue Kulturgefäße überführt. Die Suspensionskulturen wurden ausschließlich in dafür speziell vorgesehenen Kulturflaschen (Fa. Greiner, Frickenhausen) kultiviert. Für den Mediumwechsel wurden die

Suspensionskulturen bei 600 x g für 10 min (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellett mit neuem Medium resuspendiert.

Zur Langzeitlagerung wurden $0.5-1.0 \times 10^7$ Zellen/ml in FBS mit 10 % (v/v) DMSO schrittweise bis zu -80°C abgekühlt (ca. $3^\circ\text{C}/\text{h}$) und dann in flüssigem Stickstoff endgelagert.

Tab.5 Verwendete Medien und CO_2 -Konzentrationen für die Zellkultivierung.

Zelllinie	Medium	Serum in %(v/v)	CO_2 -Gehalt in %
U-343	D-MEM	10	5
SH-SY5Y	D-MEM	5	10
LN-405	D-MEM	10	10
U-138-MG	Ham's F10	10	5
LNZ-308	RPMI1640	10	5
T98p31	RPMI1640	10	5
KS-4D4D6	PFHM II Medium mit GLUTAMAX II	10	5

2.3.1.3 Kultivierung humaner T-Lymphozyten

Die isolierten und gewaschenen T-Lymphozyten wurden in D-MEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS kultiviert. Die Anzahl der eingesäten Zellen je 25 cm^2 -Gewebekulturflasche betrug $1,5 \times 10^7$. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte im Rhythmus von 2 Tagen.

2.3.1.4 Kultivierung von Maus-Hybridomazelllinien und Produktion monoklonaler Antikörper

Die Kultivierung von Maus-Hybridomazelllinien erfolgte in RPMI II-Medium (Fa. Gibco BRL) unter Zugabe von 10 % (v/v) FBS im CO_2 -Inkubator (37°C , 5 % CO_2). Die Anzahl der eingesäten Zellen je 25 cm^2 -Suspensionskulturflasche (Fa. Greiner Bio ONE) betrug 1×10^6 . Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte im Rhythmus von 2 Tagen.

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper wurden die Hybridomazellen (1×10^7 Zellen/ml) für 48 Stunden im proteinfreien Medium PFHM II (Fa. Gibco BRL) ohne FBS kultiviert. Nach 48 Stunden wurde das konditionierte Medium gesammelt und bei 4°C gelagert. Die Kulturen wurden halbiert und in frischem serumhaltigem D-MEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS weiter kultiviert, bis wiederum eine Zelldichte von ca. 1×10^7 Zellen/ml erreicht wurde. Dann erfolgte ein erneuter Mediumwechsel (serumfreies PFHM II) für 48 Stunden. Insgesamt wurden vier solcher Medienwechsel durchgeführt. Die gesammelten antikörperhaltigen Kulturüberstände wurden bei 600 x g für 10 min (RT) zentrifugiert und zu je 500 μl -Portionen bei -20°C gelagert.

2.3.2 Molekularbiologische Methoden

2.3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Alle verwendeten Geräte, Materialien und Lösungen wurden ÜN mit 0,01 % (v/v) DEPC (Fa. Roth) behandelt und anschließend 20 Minuten bei 121°C autoklaviert. Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien wurde TRIzol-Lösung (Fa. Gibco BRL) verwendet. Dabei wurden je Extraktion 1×10^7 Zellen nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die erhaltene Gesamt-RNA wurde in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektralphotometrisch in einer 70 µl-Quarzküvette ($A_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$). Außerdem wurde zur Kontrolle die isolierte Gesamt-RNA in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.2.2 RT-PCR

Die Konvertierung von RNA in cDNA (RT-PCR) erfolgte mittels des THERMOSCRIPT™ RT-PCR SYSTEMS (Fa. Gibco BRL). Zur Synthese von cDNA-Pools wurde eine Mischung aus zufällig synthetisierten Hexanukleotid-Primern (Fa. Promega) verwendet. Die Durchführung der cDNA-Synthese erfolgte nach den detaillierten Anweisungen des Herstellers. Nach Beendigung der RT-PCR-Reaktion wurde der gesamte cDNA-Pool zu je 4 µl in 0,2 ml Reaktionsgefäße portioniert und bei -20°C gelagert.

2.3.2.3 PCR

Die Synthese spezifischer DNA-Fragmente ausgehend von cDNA erfolgte mit Hilfe von PLATINUM Taq DNA Polymerase High Fidelity (Fa. Gibco BRL) und genspezifischen Primern (Fa. Metabion). Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers. Die eingesetzte Konzentration je Primer betrug 0,4 pmol/µl Reaktionsansatz. Die Syntheszeit richtete sich nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragmentes (500 bp/min). Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Anzahl der Syntheserunden betrug 25.

Die PCR-Reaktion zur Amplifizierung bzw. zur Modifizierung existierender DNA-Konstrukte erfolgte mittels Pfu-DNA Polymerase (Fa. Promega) und genspezifischen Primern (Fa. Metabion). Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers. Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug generell 25 µl. Die eingesetzte

Konzentration je Primer betrug 0,4 pmol/ μ l Reaktionsansatz. Die Synthesezeit richtete sich nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragmentes (500 bp/min). Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Anzahl der Syntheserunden betrug 30.

Die PCR-Reaktion zur Kontrolle isolierter E.coli-Klone sowie zur Bestimmung der 5'-3'-Orientierung integrierter DNA-Fragmente in Vektoren wurde mit Hilfe von Taq-DNA Polymerase (Fa. Promega) durchgeführt. Dazu erfolgte die Verwendung von gen- und vektorspezifischen Primern (Fa. Metabion) mit einer Endkonzentration von 0,4 pmol/ μ l Reaktionsansatz. Die Durchführung der PCR erfolgte nach dem detaillierten Protokoll des Herstellers. Für die Untersuchung von E.coli-Klonen wurden diese mittels sterilem Zahnstocher von der Kulturplatte abgenommen und im Reaktionsansatz resuspendiert. Das verwendete Reaktionsvolumen betrug 25 μ l. Die Synthesezeit richtete sich nach der Länge des herzustellenden DNA-Fragmentes (2500 bp/min). Die Annealingtemperatur wurde in Abhängigkeit der Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Anzahl der Syntheserunden betrug 20.

2.3.2.4 „Overlap“-PCR

Die gerichtete Punkt-Mutagenese von Genen unter Verwendung modifizierter genspezifischer Primer (Fa. Metabion) und Pfu-DNA Polymerase erfolgte mit Hilfe von „Overlap“-PCR. In einer ersten PCR-Reaktion wurde in 2 separaten Synthesen mittels 2 separaten Primerpaaren die Mutation eingefügt. Dabei wurden die Primerpaare so gewählt, daß sich die PCR-Produkte im Bereich der Mutation überlappen. Die PCR-Produkte wurden im Agarosegel aufgetrennt und anschließend isoliert. Danach erfolgte mit einem Gemisch aus den 2 isolierten Syntheseprodukten (je 50 ng DNA) eine zweite PCR-Reaktion unter Verwendung der 2 nicht modifizierten 5'- und 3'-Primer. Das Volumen der Reaktionsansätze betrug generell 25 μ l. Die eingesetzte Konzentration je Primer betrug 0,4 pmol/ μ l Reaktionsansatz. Die Synthesenzeiten richteten sich nach der Länge der herzustellenden DNA-Fragmente (500 bp/min). Die Annealingtemperaturen wurden in Abhängigkeit der Schmelztemperaturen der Primer gewählt. Die Anzahl der Syntheserunden betrug 30.

2.3.2.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach erfolgreicher Auftrennung der DNA im Agarosegel wurde das entsprechende Gelstück, das die zu isolierende DNA enthielt, mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Isolierung der DNA wurde der „Gel Extraction Spin Kit“ (Fa. Genomed) verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten analog den Anweisungen des Herstellers.

2.3.2.6 Agarosegel-Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Molekülen in Agarosegelen verschiedener Konzentrationen (0.8-2 %) wurde das horizontale DNA/RNA Minigel System GE-B1A (Fa. AGS) verwendet. Dazu wurde die Agarose (Fa. PeQLab) mit TBE-Puffer (45 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8.0) unter Kochen gelöst und zur Anfärbung von DNA/RNA mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) versetzt. Nach dem Erstarren der Gele wurden die Probenauftragskämme entfernt und die DNA- bzw. RNA-Lösung (ca 5-50 µl) mit Probenpuffer (Fa. Promega) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 7-9 V/cm. Die Auftrennung größerer DNA-Mengen erfolgte mittels präparativer Probenauftragskämme. Die Auswertung und Dokumentation der DNA-Auftrennung im Agarosegel wurde mit Hilfe eines UV-Systems (Fa. Intas) durchgeführt.

2.3.2.7 Ligation von DNA

Für die Ligation von PCR-generierten DNA-Fragmenten wurde der „PCR-Script™ Cloning Kit“ (Fa. Stratagene) eingesetzt. Die Ligation erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

Die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren erfolgte unter Verwendung von T4-Ligase (Fa. NewEnglandBiolab). Folgender Reaktionsansatz wurde dafür gewählt:

linearisierte Vektor-DNA	1-4 µl (100-200 ng)
DNA-Fragment	3-13 µl (300-600 ng)
T4 DNA Ligase	1 µl (0.4 U)
10-fach Reaktionspuffer	2 µl (1-fach)
Aqua dest.	auf 20 µl Endvolumen

Die Ligation erfolgte in 4-6 Stunden bei RT. „Blunt end“-Ligationen erfolgten ÜN bei 16°C. Anschließend wurde die Ligase für 10 min bei 65°C Hitze-inaktiviert. Zur Transformation von 200 µl *E.coli*-Zellen wurden 5-10 µl des Reaktionsansatzes eingesetzt.

2.3.2.8 Herstellung von kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Cohen (Cohen et al. 1972). Mit Hilfe von 1ml ÜNK wurden 4 x 100 ml LB-Medien angeimpft und bis zu einer OD_{550nm} von 0.3 – 0.5 kultiviert. Danach wurden die *E.coli*-Kulturen für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und bei 4000 x g (4°C) abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 1/10 des Ausgangsvolumens TFB1-Puffer (30m M K-Acetat, 50 mM

MnCl₂, 100 mM RbCl, pH 5.8) resuspendiert und anschließend auf die Hälfte des Ausgangsvolumens mit TFB1-Puffer aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis erfolgte die Zentrifugation bei 4000 x g (4°C) für 10 min. Die sedimentierten Zellen wurden in 1/25 des Ausgangsvolumens TFB2-Puffer (10 mM MOPS pH 7.0, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl und 15% Glycerol) aufgenommen und für mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Transformation wurden jeweils 200 µl der kompetenten Zellen direkt benutzt oder portioniert bei -70°C gelagert. Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte mittels pUC18-Plasmides entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Fa. Stratagen). Die ermittelte Transformationseffizienz lag zwischen 10⁷-10⁸ Transformanten/ µg pUC18-DNA.

2.3.2.9 Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente *E.coli*-Zellen wurden mit 5-10 µl Ligierungsansatz gemischt und sequentiell für 40 Minuten auf Eis, 45 Sekunden bei 42°C und abschließend 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium (42°C) wurden die Zellen unter Schütteln (150 u/min) für 1 h bei 37°C kultiviert. Danach erfolgte die Ausplattierung von 100 µl Zellsuspension auf Platten mit dem entsprechenden Selektivmedium (Ampicillin 100 µg/ml bzw. Kanamycin 50 µg/ml) und die Inkubation bei 37°C ÜN. Der Rest der Zellsuspension wurde bei 1000 x g für 2 Minuten abzentrifugiert und bis auf 100 µl der gesamte Überstand verworfen. Die in 100 µl resuspendierten *E.coli*-Zellen wurden anschließend, wie oben beschrieben, ausplattiert und inkubiert.

2.3.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*-Zellen wurde im analytischen Maßstab (3ml ÜNK) mittels des „JETquick Spin Column Plasmid Miniprep Kit“ (Fa. Genomed) und im präparativen Maßstab (100 ml ÜNK) mittels des „Endo Free Plasmid Midi Kit“ (Fa. QIAGEN) durchgeführt. Dabei erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA nach den detaillierten Protokollen der Hersteller. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch (1 A_{260nm} = 50 µg/ml doppelsträngige DNA).

2.3.2.11 Restriktion von DNA

Die analytische (20 µl Endvolumen) und präparative (50-100 µl Endvolumen) Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den detaillierten Vorschriften der Hersteller. Die DNA-Spaltung wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

2.3.2.12 Dephosphorylierung der 5`-Enden von linearisierter DNA

Zur Verhinderung der Selbstligation wurden die 5`-Enden unikal-linearisierter DNA-Moleküle mit Hilfe von alkalischer Phosphatase „SAP“ (Fa. Promega) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierungsreaktion erfolgte analog den Anweisungen des Herstellers. Die alkalische Phosphatase wurde durch Inkubation für 15 Minuten bei 65°C inaktiviert.

2.3.2.13 Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Zur Klonierung von DNA-Kassetten (kleine, doppelsträngige DNA-Fragmente) in Plasmid-Vektoren wurden die entsprechenden Oligonukleotide (Fa. Metabion) hybridisiert. Für die Hybridisierung wurden je 25 pmol von jedem Oligonukleotide eingesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Reaktionsansatzes in einem sich langsam abkühlenden Wasserbad (85-40°C). Für die Ligation wurden 2 µl hybridisierte Oligonukleotid-Lösung eingesetzt.

2.3.3 Zellbiologische Methoden

2.3.3.1 Zellzahlbestimmung mittels Hämozytometer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Standard-Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer, Fa. Roth, Karlsruhe). Dafür wurden adhären-wachsende Zellen für 1 Minute mit 2,5%iger (m/v) Trypsinlösung (Fa. Life Technologies, Karlsruhe) behandelt, anschließend unter Zugabe des entsprechenden Mediums oder PBS von ihrer Wachstumsunterlage ab gespült und resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl (je Zell-Probe 2 x 4 Großquadrate) erfolgte eine entsprechende Verdünnung mit Medium bzw. PBS. Dabei entsprachen 100 gezählte Zellen/Großquadrat = 1×10^6 Zellen/ml Suspension.

2.3.3.2 Zytotoxizitätstest

Zur Bestimmung der Toxizität von Inhibitoren auf humane Zellkulturen wurde der „CytoTox96“-Test (Fa. Promega) eingesetzt. Die zu untersuchenden Zelllinien wurden dafür in Mikrotiterplatten eingesät und für 24 Stunden im entsprechenden Medium (Tab.2) kultiviert. Je nach Versuchsaufbau erfolgte die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren für 24 bis 72 Stunden in serumfreiem Kulturmedium. Anschließend wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers die LDH-Aktivität im Kulturüberstand und im Überstand des Zellextraktes ermittelt. Das prozentuale Verhältnis von extrazellulärer und intrazellulärer

LDH-Aktivität entspricht der Zytotoxizität des eingesetzten Inhibitors. Als Kontrolle wurden unbehandelte und mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt.

2.3.3.3 Proliferationstest

Zur Untersuchung des Einflusses von Inhibitoren auf die Proliferation humaner Zelllinien wurde der CellTiter96 AQueous Cell Proliferation-Test (Fa. Promega) eingesetzt. Die entsprechenden Zelllinien wurden in Mikrotiterplatten eingesät und für 72 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen im serumhaltigen Medium kultiviert. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der Proliferation analog den Anweisungen des Herstellers. Als Kontrolle wurden unbehandelte und mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt.

2.3.3.4 Transfektion humaner Zelllinien

Die Transfektion von Expressionsvektoren in humane Zelllinien erfolgte mit den Transfektionslösungen Polyfectin (Fa. Biontex) und LipfectAMIN 2000 (Fa. Gibco BRL) entsprechend den Anweisungen der Hersteller. Die Transfektion erfolgte für 6 Stunden im Optimum I-Medium. Danach wurden die Zellen in ihrem entsprechenden Medium weiter kultiviert (Tab.5).

2.3.3.5 Isolierung stabiler transgener Zelllinien

Die transfizierten Zelllinien wurden 1 Woche lang mit 600 µg/ml G418 behandelt. Nach einer Woche erfolgte der permanente Zusatz von 400 µg/ml G418 in das Kulturmedium. Die sich entwickelnden G418-resistenten Zellklone wurden mit Hilfe von Klonierungsringsen (Fa. Clontech) und Trypsin (Fa. Invitrogen) oder durch direktes Absaugen mit sterilen 100 µl-Filterpipettenspitzen (Fa. Hybaid AGS) von ihrer Wachstumsunterlage abgelöst und separat in Mikrotiterplatten weiter kultiviert.

2.3.3.6 Kalzium-Messung

Zur Untersuchung der intrazellulären Kalziumfreisetzung erfolgte die Kultivierung humaner Zellen für 24 Stunden in D-MEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS auf kreisrunden Deckgläsern (Fa. Plano). Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in Optimum I-Medium bzw. serumfreiem D-MEM-Medium kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit Kalzium-Meßpuffer (137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 1,8 mM CaCl₂ x 2H₂O; 0,8 mM MgSO₄ x 7H₂O; 20 mM HEPES; 5,6 mM EGTA, pH 7,4) wurden die Zellen mit 1 µM Fura-2 AM und 0,1 %

(v/v) Pluronic (Fa. Molecular Probes) für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach dem erneuten 3 x Waschen mit Kalzium-Puffer wurden die Deckgläser in die Kalzium-Meßkammer (Fa. LaCon) überführt, und die Zellen mit 1ml Kalzium-Meßpuffer überschichtet. Die Ermittlung der Fluoreszenz-Intensitäten bei 350 und 380 nm erfolgte im Abstand von 5 Sekunden mittels Axiovert 100 TV Fluoreszenz-Mikroskop (Fa. Zeiss), ausgestattet mit einem Polychrome II Monochromator (Fa. TILL Photonics) und einer Hamamatsu C4880-80 Videokamera (Fa. Hamamatsu Photonics). Je Versuch wurden 4-8 Zellen gleichzeitig untersucht. Nach Messung der Ausgangs-Fluoreszenzintensität für 50 Sekunden erfolgte die Stimulation der intrazellulären Kalziumfreisetzung durch Absaugen des Meßpuffers und sofortiges Überschichten mit neuem Meßpuffer, in dem die entsprechenden Substanzen gelöst sind. Anschließend wurden die Zellen für weitere 3-5 Minuten untersucht. Die Kalkulation und Auswertung der aufgenommenen Datensätze erfolgte mit Hilfe des EDV-Programmes Openlab 2.2.5 (Fa. Improvion).

2.3.3.7 CRE-EGFP *in vivo*-Assay

Zur Messung der EGFP-Expression in Abhängigkeit des PKA-Signaltransduktionsweges wurden 1×10^4 U-343-CRE1 Zellen /Kavität in Mikrotiterplatten (Fa. Greiner Bio One, 5 x) eingesät. Die Zellen wurden in D-MEM-Medium mit 10 % (v/v) FBS für 24 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte für 24 Stunden die Kultivierung in serumfreiem D-MEM- bzw. Optimem1-Medium. Je nach Versuchsaufbau wurden den Medien zur Inhibierung der PEP 10 µM Fmoc-AlaPyr-CN oder zur Stimulierung der Adenylat-Cyclase 10 µM Forskolin zugefügt. Als Kontrolle erfolgte die Zugabe von 0,05 % (v/v) DMSO. Zur Auswertung wurden die Medien durch PBS ersetzt und mittels HTS Mikroplattenreader (Fa. Perkin Elmer) die relative EGFP-Fluoreszenz bei 485/535nm bestimmt (4-Punkt-Messung). Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des EDV-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) ausgewertet.

2.3.3.8 Isolierung humaner T-Lymphozyten

Humane T-Lymphozyten wurden mit Hilfe des „Ficoll-Paque PLUS“-System's (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) analog den Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Gewinnung des dafür benötigten Frischblutes (50 ml) erfolgte mittels Blutentnahmesystem „S-Monovette“ mit Lithium-Heparin (Fa. Sarstedt).

2.3.4 Biochemische Methoden

2.3.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Die Trennung der Proteine erfolgte in 12%igen SDS-Polyacrylamid Gelen mittels Vertikalelektrophorese System Mini Protean II (Fa. BIO-RAD). Die Proben wurden zu gleichen Teilen mit 2 x Probenpuffer (4 % (m/v) SDS, 120 mM Tris pH 6,8 , 20 % (v/v) Glycerol, 200 mM DTT, 0,1 % (m/v) Bromphenolblau) versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA (Sammelgel) und 40 mM (Trenngel) durchgeführt (Elektrodenpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Als Referenz wurde Proteinstandard MultiMark (Fa. Invitrogen) aufgetragen. Die Visualisierung der aufgetrennten Proteine im Gel erfolgte durch Färbung mittels Serva Blue (Fa. Serva) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Das entfärbte Gel wurde anschließend zur Dokumentation fotografiert (Fa. Intas).

2.3.4.2 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

("Western blotting", nach Kyhse-Andersen, 1984)

Der Proteintransfer erfolgte mit Hilfe der Blotting Apparatur TRANS BLOT 5D (Fa. BIO-RAD) für 90 min bei 0.8 mA/cm² Membranfläche durch ein diskontinuierliches Puffersystem mit folgendem Schichtaufbau von Anode zur Kathode:

- 5 Lagen Filterpapier G002 (Fa. Schleicher&Schuell) in Puffer 1 (0.3 M Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4)
- 3 Lagen Filterpapier G002 in Puffer 2 (0,025 M Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4)
- Nitrocellulosemembran Protran BA83 (Fa. Schleicher&Schuell), mit Aqua dest. equilibriert
- SDS-Polyacrylamidgel (Trenngel)
- 5 Lagen Filterpapier G002 in Puffer 3 (0,025 M Tris/HCl, 0,04 M ε-Aminocapronsäure, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4)

Der erfolgreiche Transfer wurde mittels des Proteinstandards MultiMark (Fa. Invitrogen) überprüft.

2.3.4.3 Immundetektion von immobilisierten Proteinen

Die Immundetektion von immobilisierten Proteinen erfolgte nach SDS-PAGE Gelelektrophorese und dem Proteintransfer auf Nitrocellulose. Zur Absättigung freier Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran erfolgte die Behandlung mit Block-Lösung (3 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % v/v Tween 20 in PBS) für 1 Stunde bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Danach wurde die Membran (5 x 8cm) mit den in PBS-Puffer (5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % v/v Tween 20 in PBS) verdünnten Primär-Antikörpern ÜN bei 8 °C inkubiert. Dafür wurde die Membran in einer "feuchten Kammer" (Plastikdose mit wassergetränktem Zellstoff ausgelegt) mit 2 ml Antikörperlösung überschichtet. Anschließend wurde 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit 50 ml HRP-konjugiertem sekundärem Antikörper (1:10000) in PBS-Puffer (5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS) erfolgte für 1 Stunde bei RT. Danach wurde die Membran erneut 3 x mit PBS gewaschen. Die Detektion der markierten Proteine erfolgte mittels Immunodetektions-System „SuperSignal West Pico“ (Fa. Pierce) analog den Anweisungen des Herstellers. Die Exponierung der Röntgenfilme (Fa. Pierce) in einer Autoradiographiekassette (Fa. Groß) erfolgte zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten. Die Entwicklung und Fixierung der Röntgenfilme wurde in einer Dunkelkammer per Hand durchgeführt. Zur Unterbrechung zwischen Entwicklung (Fa. Tetanal) und Fixierung (Fa. Tetanal) der Filme wurde ein Wasserbad genutzt. Abschließend wurden die Filme 15 min mit fließendem Wasser gewaschen und dann luftgetrocknet.

2.3.4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

(nach Bradford, 1976)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels "Bradford Reagent" (Fa. Sigma) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Messung der Absorption bei 595nm wurde mit Hilfe des Photometers SmartSpec 3000 (Fa. BIO-RAD) durchgeführt. Die als Berechnungsgrundlage für die Proteinkonzentration benötigte Eichkurve wurde mittels vermessener BSA-Verdünnungsreihe vom systeminternen Programm des Photometers SmartSpec 3000 berechnet.

2.3.4.5 Messung der Aktivität von Prolylendopeptidase

Die PEP-Aktivität wurde mit Hilfe des fluorogenen Substrates Z-Gly-Pro-AMC (Fa. Bachem) ermittelt. Die kontinuierliche Messung des Substratumsatzes bei 380/460 nm erfolgte mit Hilfe des Spektralfluorometers SFM 25 (Fa. Kontron Instruments) unter Verwendung des

EDV Programmes "Flucol-4" (Machleidt et al. 1995) Dabei wurde folgender Reaktionsansatz mittels Thermostat (Fa. Julabo) bei 16 bzw. 37 °C temperiert:

-PEP-Meßpuffer (50 mM Hepes pH 7,5; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0)

-1mM DTT

-0.0015 % (v/v) Brij 30

-10 bzw. 20 µM Substrat Z-Gly-Pro-AMC

-0,5 –100 µl zu untersuchende Probe

Gesamtvolumen 2 ml

Die Auswertung der erhaltenen Datensätze erfolgte mit Hilfe des EDV-Programmes "Flukin" (Machleidt et al. 1995).

2.3.4.6 Aufschluß von Gewebeproben

Zur Gewinnung der löslichen Zellfraktion aus dem Gehirn von *Rattus norvegicus* wurden die präparierten und schockgefrorenen Gewebeproben (Sokolov, M.; AG Detlef Balschun; Leibnitz-Institut für Neurobiologie; Magdeburg) mittels Mikromörser (Fa. Roth) homogenisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 400 µl eiskaltem PEP-Meßpuffer. Die nochmals homogenisierte Suspension wurde in eisgekühlte 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 14000 u/min. für 5 Minuten (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Zellfraktion) wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die sofortige Bestimmung der Proteinkonzentration und Ermittlung der PEP-Aktivität. Die löslichen Zellfraktionen wurden für weitere Versuche bei -20°C gelagert.

2.3.4.7 Gewinnung von humanem Serum

Zur Gewinnung von humanem Serum wurde Spendern mit Hilfe des Blutabnahmesystems „S-Monovette“ mit Gerinnungsaktivator (Fa. Sarstedt) venöses Frischblut abgenommen. Nach erfolgter Blutgerinnung für 30 Minuten bei 8 °C wurden die Blutproben bei 1500 u/min für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert. Die löslichen Überstände wurden anschließend für die sofortige Bestimmung der Proteinkonzentration und Ermittlung der PEP-Aktivität in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und auf Eis inkubiert. Das humane Serum wurde zu je 500 µl Portionen für Westernblot-Analysen bei -20°C gelagert.

2.3.4.8 IC₅₀-Bestimmung

Zur Ermittlung des IC₅₀-Wertes wurde nach Erreichen einer konstanten Geschwindigkeit des Substratumsatzes von Z-Gly-Pro-AMC (10 bzw. 20 µM) 0,5 - 4 µl Inhibitor-Lösung zugegeben. Aus der Anfangsgeschwindigkeit und der Geschwindigkeit nach Inhibitorgabe wurde die prozentuale Restaktivität im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Die Restaktivität wurde gegen die Inhibitorkonzentration aufgetragen. Die Berechnung des IC₅₀-Wertes erfolgte mit Hilfe des Software-Programmes „Prism 3.0“ (Fa. GraphPad software) durch nichtlineare Regressionsanalyse.

2.3.4.9 Bestimmung der Inositol-(1,4,5)-triphosphat-Konzentration

Die Ermittlung der Konzentration an Inositol-(1,4,5)-triphosphat (IP₃) in humanen Zelllinien erfolgte mit Hilfe des D-myo-IP₃-[³H] Assay TRK1000 (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Der Aufschluß der in Petrischalen (d=6 cm, Fa. Greiner Bio-One) kultivierten Zellen, sowie die Extraktion und Ermittlung von IP₃, erfolgten analog den Anweisungen des Herstellers. Für die gesamte Versuchsdurchführung wurden ausschließlich polylysierte 2ml Reaktionsgefäße (Fa. Sorenson) verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe der Trichlorsäure (TCA)-Fällung entsprechend dem Protokoll des Herstellers aufgeschlossen. Zusätzliche Reinigungsschritte, wie sie der Hersteller in seinem Protokoll erwähnt, waren nicht notwendig, da sich die Qualität der extrahierten Proben in den vorgeschlagenen Kontrollreaktionen als ausreichend erwiesen hat. Die extrahierten Proben wurden vor der IP₃-Messung mindestens 24 Stunden bei -20°C gelagert. Für die Ermittlung des gebundenen Tritium-markierten IP₃ wurde das IP₃/IP₃-Rezeptor-Sediment in 1ml autoklaviertem Reinstwasser gelöst und anschließend 10 ml Scintillations-Lösung ULTIMA Gold XR (Fa. Packard) zugegeben. Die Messung erfolgte unmittelbar, sowie nach 18-24 Stunden. Zur Berechnung der IP₃-Konzentration/1 x 10⁶ Zellen wurde bei jedem Versuch von einer mitgeführten identischen Zellkultur-Petrischale die Zellzahl bestimmt.

2.3.4.10 Immunfluoreszenz-Markierung

Zur Immunfluoreszenz-Markierung erfolgte die Kultivierung humaner Zelllinien für 24 Stunden auf 22x22 mm-Deckgläsern (Fa. Roth). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 Minuten mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x 10 Minuten mit PBS gewaschen. Bei dem 2. Waschschrift wurden zusätzlich 50 mM Glycin zugesetzt. Die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern erfolgte bei RT für je 1 Stunde. Beide Antikörper wurden in PBS/0,01 % (w/v) Saponin verdünnt. Zum Entfernen von überschüssigen Mengen

an Antikörpern wurden die Zellen 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die mit den immunmarkierten Zellen bewachsenen Deckgläser wurden mittels Citifluor (Fa. Plano) und handelsüblichem Nagellack auf Objektträgern (Fa. Roth) fixiert. Die DNA-Markierung mit DAPI (Fa. Molecular Probes) wurde analog dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.3.4.11 Isolierung monoklonaler Antikörper

Zur Isolierung von monoklonalen Antikörpern aus Kulturüberständen von Hybridomazelllinien wurde die IgM-Säule HiTrap IgM (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Dabei wurde nach den detaillierten Anweisungen des Herstellers vorgegangen.

2.3.4.12 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration von Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe einer Druckzelle (Fa. Amicon) bei 8°C und einem Stickstoffdruck von $p_{N_2} = 1$ bar durchgeführt. Für die Anreicherung von Antikörpern wurde eine Zellulosemembran mit einer Ausschlußgröße von 30000 Da (MWCO 30000, Fa. Millipore) verwendet.

2.3.4.13 Zellaufschluß humaner Zelllinien

Zur Gewinnung der löslichen Zellfraktion erfolgte der Aufschluß mit Hilfe von Frost-Tau-Lyse. Dazu wurden die kultivierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit PEP-Meßpuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1m M DTT) überschichtet. Anschließend erfolgte durch dreimaliges Einfrieren (-70°C) und Auftauen (RT) für je 3 Minuten der Zellaufschluß. Der mittels Zellschaber gesammelte Zellextrakt wurde in eisgekühlte 1.5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 14500 u/min für 5 Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Zellfraktion) wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration und Messung hydrolytischer Aktivitäten in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert. Die Lagerung der löslichen Zellfraktionen erfolgte bei -20°C.

2.3.4.14 Isolierung von Zellkernen

Die Gewinnung einer stark mit Zellkernen angereicherten Fraktion erfolgte mit Hilfe von differentieller Zentrifugation. Dazu wurden kultivierte Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 3 ml eisgekühltem Kernextraktpuffer (10 mM NaCl; 10 mM MES; 5 mM EDTA; 0.01 % BSA; 60 mM β -Glycerophosphat; 5 mM EGTA; 1 mM Na_3VO_4 ; 20 mM NaF; 1 mM Pefablock; 1 μ g/ml Pepstatin A; 5 μ M E64; 1,6 μ g/ml Leupeptin; pH 6.0) überschichtet. Die

mittels Zellschaber von ihrer Wachstumsunterlage gelösten Zellen wurden anschließend in einem auf Eis vorgekühlten Dounce-Homogenisator (Fa. Wheaton) überführt und durch insgesamt 10 Stöße aufgeschlossen. Die Suspension wurde in eisgekühlte 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 600 x g (4°C) für 15 Minuten zentrifugiert. Das mit 200 µl Kernextrakt-puffer gewaschene Sediment wurde in 50 µl Kernextraktions-puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellkerne erfolgte durch Einfrieren der Suspension bei -20°C. Die auf Eis aufgetauten Zellkernextrakte wurden in vorgekühlte 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 u/min für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert. Der Überstand (lösliche Zellkernfraktion P1) wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration und Westernblot-Analyse in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

2.3.4.15 Zell-Fraktionierung

(modifiziert nach M.J. Crumpton, 1974)

Die Fraktionierung humaner Zellen in verschiedenen angereicherte zellkompartiments-spezifische Fraktionen erfolgte mittels differentieller Zentrifugation. Die in 75cm²-Kulturflaschen herangezogenen Zellen wurden zweimal mit 12 ml PBS gewaschen. Danach erfolgte das Überschichten der Zellen mit 17 ml eiskaltem Kernextraktionspuffer (10mM NaCl; 10 mM MES; 5 mM EDTA; 0.01 % BSA; 60 mM β-Glycerophosphat; 5 mM EGTA; 1 mM Na₃VO₄; 20 mM NaF; 1 mM Pefablock; 1 µg/ml Pepstatin A; 5 µM E64; 1,6 µg/ml Leupeptin; pH 6.0) und das Ablösen von der Wachstumsunterlage mittels Zellschaber. Die Suspension wurde in einem auf Eis vorgekühlten Dounce-Homogenisator (Fa. Millville) überführt und durch insgesamt 10 Stöße aufgeschlossen. Anschließend wurde 1ml Suspension entnommen und auf Eis als „Gesamt-Zellextrakt“ (ZE) gelagert. Die restlichen 16ml Suspension wurden bei 600 x g (4°C) für 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit Kernextrakt-puffer gewaschen und in 1ml Kernextrakt-puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellkerne erfolgte durch einmaliges Einfrieren (-70°C) und Auftauen (RT) für je 3 Minuten. Die lysierten Zellkerne wurden als P1-Zellkernfraktion auf Eis gelagert. Der Überstand der P1-Fraktion wurde bei 20000 x g für 30 Minuten (4°C) zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen des Sedimentes erfolgte die Resuspension in 1 ml Kernextrakt-puffer und Lagerung als P20-Fraktion auf Eis. Der Überstand der P20-Fraktion wurde bei 100000 x g für 1 Stunde (4°C) ultrazentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment zweimal mit Kernextrakt-puffer gewaschen und in 0,4 ml Kernextrakt-puffer resuspendiert. Die Lagerung erfolgte als P100-Fraktion auf Eis. Der Überstand der P100-Fraktion (15,5 ml) stellt die zytosolische S100-Fraktion dar und wurde ebenfalls auf Eis gelagert. Alle auf Eis gelagerten Fraktionen, mit Ausnahme der S100-Fraktion, wurden zum Aufschluß jeweils 3 x 5 Sekunden sonifiziert (Fa. Bandelin). Anschließend erfolgte die sofortige Bestimmung der Proteinkonzentrationen und der PEP-Aktivitäten in den Fraktionen. Die Lagerung der Fraktionen für nachfolgende Westernblot-Analysen erfolgte bei -20°C.