

## 6. Methoden und Material

### 6.1. Methoden

#### 6.1.1. Methoden zur Haltung von *C. elegans*

##### 6.1.1.1. Zucht von *C. elegans* auf NGM-Platten

Auf frisch gegossenen NGM-Platten werden 100 µl OP50 aus einer Übernachtflüssigkultur mit Hilfe einer umgebogenen Pipettenspitze sternförmig ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die *C. elegans* einer besiedelten Platte mit 5 ml autoklaviertem Wasser abgespült. Jeweils 50 µl des Wassers mit ausreichend Würmern werden von der gespülten Platte genommen und auf eine der oben genannten, frisch bewachsenen Platten gebracht. Die Platten werden bei Raumtemperatur abgedunkelt aufbewahrt und jeden Tag mit dem Binokular auf Besiedlungszustand kontrolliert.

##### 6.1.1.2. Zucht von *C. elegans* in Flüssigkultur

Eine 1 l OP50-Übernachtkultur in LB-Medium wird 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert. In einen 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikane werden 250 ml S-Medium gefüllt. Die abzentrifugierten OP50 werden in diesen Erlenmeyerkolben gegeben. Vier mit *C. elegans* besiedelte NGM-Platten werden mit je 10 ml autoklaviertem Wasser gespült, die Flüssigkeit mit darin enthaltenden *C. elegans* wird in den oben genannten Erlenmeyerkolben überführt. Der Kolben wird auf einen Schüttler gestellt und bei Raumtemperatur so stark bewegt, daß überschlagende Wellen entstehen und somit eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet ist. Unter dem Binokular wird jeden Tag der Zustand der Kultur überprüft.

### 6.1.1.3. Synchronisation von *C. elegans*

Die Würmer werden mit 10 ml M9-Puffer von einer Platte gespült und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Würmer werden bei RT und 1300 rpm 5 min abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Jetzt werden 6 ml „Bleiche“ hinzugegeben und das Röhrchen in Abständen von 1 min geschüttelt bis etwa 50 % der Adulten aufgeschlossen sind, dann wird die Reaktion durch Hinzugabe von 6 ml 60 %iger Saccharose und nachfolgendem, starken Schütteln abgestoppt. Die Lösung wird für 15 min stehen gelassen, danach mit 3 ml M9-Puffer vorsichtig überschichtet. Der Ansatz wird 5 min bei 1300 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren befinden sich die Eier in der wie eine dünne Membran aussehenden Interphase. Diese wird zusammen mit dem M9-Puffer abpipettiert und in einem neuen Röhrchen mit M9-Puffer gewaschen (mit M9-Puffer auffüllen und bei RT und 1300 rpm 5 min zentrifugieren, Überstand verworfen). Die im Pellet vorhandenen Eier werden auf mit OP50 besiedelte NGM-Platten gegeben.

### 6.1.2. Molekularbiologische Methoden

#### 6.1.2.1. RNA-Isolierung aus *C. elegans*

*C. elegans* werden von einer Platte gespült oder aus einer Flüssigkultur entnommen und bei 10000 rpm 5 min abzentrifugiert. Ca. 100 mg eines *C. elegans*-Pellets werden in ein 2 ml – Eppendorfröhrchen überführt. Nachdem man 1 ml peqGold RNA-Pure hinzufügt, das Pellet darin löst, die Lösung 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und vorsichtig vortext, wird 0,2 ml kaltes Chloroform dazugegeben. Danach folgen die Schritte: 15 sec in der Hand schütteln, 3 min bei Raumtemperatur stehen lassen, 15 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugieren. Die obere Phase wird in ein sauberes Gefäß überführt, es wird 0,5 ml kaltes Isopropanol zugegeben, 15 sec geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgt eine Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm für 15 min. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 75 %igem Ethanol gewaschen. Dann folgt eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 7500 rpm. Der Überstand wird verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 200 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Probe wird bei –70 °C gelagert.

### 6.1.2.2. Umschreiben der mRNA in cDNA

Die in der RNA vorhandene mRNA wird durch eine M-MLV Reverse Transkriptase umgeschrieben.

Für einen 20 µl Ansatz werden folgende Bestandteile pipettiert:

1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg / µl)  
1-5 µg RNA  
add 12 µl dH<sub>2</sub>O.

Dieser Ansatz wird 10 min bei 70 °C inkubiert, auf Eis gestellt, kurz anzentrifugiert.

Danach werden hinzugegeben:

4 µl 5 x First Strand Buffer  
2 µl 0,1 M DTT  
1 µl 10 mM dNTP-Mix.

Der Ansatz wird gemischt und 2 min bei 42 °C inkubiert. Jetzt wird 1 µl (200 U) der Reversen Transkriptase hinzupipettiert und bei 42 °C 50 min inkubiert. Die Reverse Transkriptase wird 50 min bei 70 °C inaktiviert. 1 µl (40 U) RNase Out wird für 20 min bei 37 °C hinzugegeben.

### 6.1.2.3. Amplifizieren der Cystatinsequenzen durch PCR

Mit Hilfe der PCR werden in der cDNA aus einer *C. elegans*-Mischkultur die Cystatinsequenzen nachgewiesen. Als Primer dienen rCysele1- und rCysele2- Forward- und Reverse-Primer. Zur Überprüfung, ob es sich bei den erhaltenen Signalen um Cystatine handelt, wird als Cystatin-interner Primer die Sequenz des stark cystatinspezifischen, aktiven Zentrums 51Q-V-V-A-G55 genutzt.

Folgender Ansatz wird pipettiert:

- 1  $\mu$ l cDNA
- 1  $\mu$ l dNTP (10 mM)
- 1  $\mu$ l Forward-Primer (10  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l Reverse-Primer (10  $\mu$ M)
- 2  $\mu$ l  $MgCl_2$  (50 mM)
- 5  $\mu$ l 10 x KCl-Puffer
- 39  $\mu$ l  $H_2O$
- 1  $\mu$ l Taq-Polymerase(1 U /  $\mu$ l).

Folgender Programmablauf wird genutzt:

Zyklusanzahl:	30	
Denaturierung:	94 °C	20 sec
Annealing:	45 °C	1 min
Synthese:	72 °C	1 min.

Die PCR-Reaktionsprodukte werden im Agarosegel überprüft.

#### 6.1.2.4. DNA-Elution aus Agarosegelen

Das gewünschte PCR-Produkt wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wird aus dem Gel eluiert, genutzt wird das QIAX II Gel Extraction Kit von QIAGEN. Das entsprechende Protokoll wird abgearbeitet.

#### 6.1.2.5. Quantifizierung von RNA- und DNA-Konzentrationen

4  $\mu$ l der RNA- / DNA-Lösung werden 1 : 50 in Wasser verdünnt und im Spektralphotometer gegen den Leerwert (Wasser) bei 260 nm gemessen. Der gemessene Wert wird in folgende Umrechnung eingesetzt:

RNA- / DNA-Konzentration = gemessener Wert \* Umrechnungsfaktor \* Verdünnungsfaktor

Umrechnungsfaktor für doppelsträngige DNA: 50 µg / ml

Umrechnungsfaktor für RNA: 40 µg / ml.

#### 6.1.2.6. Ligation von Nukleotidsequenzen in den Klonierungsvektor pGEM-T Easy

Die PCR-Produkte werden in den pGEM-T Easy-Vektor der Firma Promega kloniert. Dazu dient der folgende Ansatz:

5 µl 2 x Rapid Ligation Buffer

50 ng pGEM-T Easy-Vektor (1 µl)

PCR-Produkt im Verhältnis Vektor : PCR-Produkt von 1 : 1; 1 : 2; 1 : 3

1 µl T4-DNA Ligase

add 10 µl dH<sub>2</sub>O.

Positiv- und Hintergrundkontrolle werden mitgeführt. Die Bestandteile werden zusammenpipettiert und bei 4 °C über Nacht gelagert.

#### 6.1.2.7. Transformation von *E. coli*

1 µl eines jeden Ligationsansatzes wird in ein 1,5 ml-Eppendorfröhrchen pipettiert und auf Eis gestellt. 20 µl kompetente *E. coli* werden in jedes Röhrchen gegeben, die Röhrchen werden 30 min auf Eis belassen. Danach werden die Röhrchen für 40 sec ohne zu schütteln bei 42 °C inkubiert, dann für 2 min auf Eis gestellt. Jetzt werden in jedes Röhrchen 500 µl SOC-Medium (RT) gegeben. Die Ansätze werden bei 37 °C unter leichtem Schütteln 1 h inkubiert. Aus jedem Ansatz werden 100 µl auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum mit Hilfe eines Drigalskispatels breitflächig ausgestrichen. Die Platten werden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Entsprechende Kontrollen werden mitgeführt.

### 6.1.2.8. Kolonie-PCR

Mit Hilfe der Kolonie-PCR werden die Klone aus der Transformation kontrolliert, ob diese das gewünschte Insert enthalten und ob das Insert in der richtigen Richtung eingebaut wurde.

Es werden folgende Primersequenzen genutzt:

Ansatz 1:

Forward-Primer von rCysele1: 5`> CAA ATT GCT GGT GGA TTG <3`  
Reverse-Primer von rCysele1: 5`> AAT TTT TTC ATC AGG TTT CAC <3`

Ansatz 2:

Forward-Primer: T7-Primer  
Reverse-Primer von Cysele1: 5`> AAT TTT TTC ATC AGG TTT CAC <3`

Ansatz 3:

Forward-Primer von rCysele2: 5`> GGT ATG ATG ACT GGA GGA <3`  
Reverse-Primer von rCysele2: 5`> GAA CTG CTC GTC AGC GGT <3`

Ansatz 4:

Forward-Primer: T7-Primer  
Reverse-Primer von rCysele2: 5`> GAA CTG CTC GTC AGC GGT <3`.

Bakterienkolonien werden der Platte entnommen, jeweils in ein 50 µl H<sub>2</sub>O enthaltendes 1,5 ml-Eppendorfröhrchen überführt und gevortext, danach bei 99 °C 5 min erhitzt und 1 min bei 12000 x g zentrifugiert.

Jeder Reaktionsansatz enthält:

28,8 µl dH<sub>2</sub>O  
1 µl dNTP-Mix (10 mM)  
1 µl Forward-Primer (10 µM)  
1 µl Reverse-Primer (10 µM)  
2 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)  
5 µl 10 x KCl-Puffer

10 µl Überstand aus abzentrifugierter Kolonie  
1 µl Taq-Polymerase (1 U / µl).

Folgender Programmablauf wird genutzt:

Zyklusanzahl: 30  
Denaturierung: 94 °C 20 sec  
Annealing: 45 °C 1 min  
Synthese: 72 °C 1 min.

Die PCR-Produkte werden im Agarosegel überprüft.

#### 6.1.2.9. Plasmidaufreinigung

##### 6.1.2.9.1. Kleine Plasmidpräparation mittels Alkalischer Lyse

10 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur werden 5 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 100 µl Lysepuffer (0 °C) vollständig resuspendiert. Die Lösung wird gut gemischt und 3 min auf Eis gestellt. Nun werden 150 µl eiskaltes Natriumacetat (3 M, pH 5.2) hinzupipettiert und für 5 min auf Eis gestellt, dann 5 min bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml-Eppendorfröhrchen überführt. Es werden 400 µl eines Gemisches aus Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) hinzugefügt und für 30 sec gevortext. Nachdem das Gemisch 1 min bei 12000 x g zentrifugiert wird, wird die obere, wäßrige Phase in ein neues Röhrchen überführt und es werden 800 µl Ethanol hinzugefügt, gevortext, 2 min bei Raumtemperatur stengelassen und bei 4 °C und 12000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, zum Pellet werden 400 µl Ethanol hinzugegeben. Das Röhrchen wird kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet. Das Pellet wird in 30 µl Wasser resuspendiert.

#### 6.1.2.9.2. Kleine Plasmidpräparation mittels Plasmidaufreinigungskit

Hochreine Plasmid-DNA wird aus *E. coli* gewonnen. Die Bakterien werden durch Alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) zerstört. Die supercoiled Plasmid-DNA wird von den anderen Zellbestandteilen mittels Ionenaustausch-Chromatographie getrennt. Zur Aufreinigung werden Plasmidaufreinigungskits der Firma Clontech eingesetzt. Die Durchführung erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers.

#### 6.1.2.10. Sequenzanalysen

Die Sequenzierung der aufgereinigten Plasmide (pGEM) mit dem entsprechenden Insert wird durch die Firma AGOWA Berlin durchgeführt.

#### 6.1.2.11. Restriktionsverdau von Plasmiden

Das Klonierungsplasmid pGEM-T Easy mit dem Insert und das Expressionsplasmid pET28a werden mit Hilfe des Restriktionsenzym NOT I verdaut. Das verwendete Restriktionsenzym wird den Angaben des Herstellers entsprechend eingesetzt. Der Verdau wird über 2 h bei 37 °C durchgeführt. Die gewünschten DNA-Fragmente werden mit Hilfe eines Agarosegels vom restlichen Reaktionsgemisch getrennt und danach aus dem Gel eluiert (siehe DNA-Eluierung).

#### 6.1.2.12. Dephosphorylierung von restriktionsverdauten Plasmiden

Das durch NOT I geschnittene Expressionsplasmid pET28a wird vor der weiteren Verwendung durch die Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP) dephosphoryliert, um ein Religieren des geschnittenen Plasmids zu verhindern. Durch die SAP wird die terminale 5`-Phosphatgruppe des geschnittenen Vektors entfernt.

Folgender Ansatz wird pipettiert:

20 µl des Restriktionsverdauansatzes (ca. 300 ng Plasmid)

1 µl SAP

2,2 µl SAP-Puffer.

SAP wird entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Ansatz wird bei 37 °C 1 h inkubiert. Die SAP wird durch Hitze inaktiviert. Der Dephosphorylierungsansatz wird mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt, das geschnittene Plasmid aus dem Gel eluiert (siehe DNA-Eluierung).

#### 6.1.2.13. Ligation der Cystatinsequenzen in den Expressionsvektor pET28a

Für die Expression werden die aus den Klonierungsvektoren pGEM-T Easy herausgeschnittenen Produkte in den Expressionsvektor pET28a der Firma Novagen kloniert. Die Vorgehensweise ist wie unter 6.1.2.6. beschrieben. Die Inserts werden in den geschnittenen und dephosphorylierten Expressionsvektor pET28a mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kloniert. Die T4 DNA-Ligase wird entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

#### 6.1.2.14. Expression

##### 6.1.2.14.1. Induktion einer *E. coli*-Flüssigkultur

Vom gewünschten Klon wird eine Übernachtskultur in 50 ml LB-Medium / Kanamycin angelegt. 20 ml dieser Übernachtskultur werden in 500 ml LB-Medium / Kanamycin gegeben. Die 500 ml-Kultur wird bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wird die optische Dichte bei 600 nm gemessen, bis sie einen Wert von 0,8 erreicht hat. Jetzt wird die Kultur mit IPTG in einer Konzentration von 2 mM über 2-3 h induziert. Die 500 ml Kultur wird bei 8000 rpm 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen.

#### 6.1.2.14.2. Löslichkeitstest

Über Nacht wird eine 20 ml-Kultur des gewünschten Klons angelegt und induziert. Nun werden sechs Proben zu je 1 ml in 1,5 ml-Eppendorfröhrchen überführt. Die Proben werden bei 8000 rpm 5 min zentrifugiert, die Überstände verworfen. Die Pellets werden in 100 µl des jeweiligen Löslichkeitspuffers gelöst. Die Proben werden mit Ultraschall behandelt (50 %, 5 sec), erneut gevortext und bei 12000 rpm und 4 °C 5 min zentrifugiert. Die Überstände werden jeweils in ein 1,5 ml-Eppendorfröhrchen pipettiert. Zu den Überständen wird Probenpuffer in folgendem Verhältnis gegeben: 2 Teile Überstand : 1 Teil Probenpuffer. Die Proben werden gevortext und erhitzt. 10 µl jeder Probe werden auf ein SDS-Polycrylamidgel aufgetragen.

Löslichkeitspuffer:

1. 1 x PBS + 0,1 % Triton X-100
2. 1 x PBS + 0,1 % Tween 20
3. 1 x PBS + 0,1 % SDS
4. 1 x Bindungspuffer (5 mM Imidazol + 0,5 M NaCl + 20 mM Tris-HCl pH 7.9)
5. 8 M Harnstoff + 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,01 M Tris-HCl, pH 8.0
6. 50 mM Tris-HCl + 2 mM EDTA + 0,1 % Triton X-100.

#### 6.1.2.14.3. Proteinaufreinigung

##### 6.1.2.14.3.1. Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die Aufreinigung erfolgt über Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Hilden). Die Aufreinigung wird entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Folgende Puffer werden für die Aufreinigung verwendet:

Lysepuffer:	8 M Harnstoff + 0,1 M Natriumphosphat + 0,01 M Tris-HCl, pH 8.0
Waschpuffer 1:	8 M Harnstoff + 0,1 M Natriumphosphat + 0,01 M Tris-HCl, pH 6.3
Waschpuffer 2:	8 M Harnstoff + 0,1 M Natriumphosphat + 0,01 M Tris-HCl, pH 5.9
Eluierungspuffer:	8 M Harnstoff + 0,1 M Natriumphosphat + 0,01 M Tris-HCl, pH 4.5.

Das Bakterienpellet wird in 20 ml Lysepuffer gelöst, eine Messerspitze Lysozym wird hinzugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis gestellt. Danach wird die Probe 3 min auf Eis mit Ultraschall behandelt (50 %, 3 min) und bei 4 °C und 12000 rpm 10 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden 1 ml der Ni-NTA-Agarose in die Säule überführt und mit 20 ml Lysepuffer äquilibriert. Jetzt wird das in Lysepuffer gelöste Pellet hinzugegeben, die Pumpe des Bio-Rad-Fraktionierers läuft mit einer Pumpgeschwindigkeit von 2 ml / min. Nacheinander, wenn die jeweils vorhergehende Flüssigkeitsmenge vollständig über die Säule gelaufen ist, werden folgende Puffer hinzugegeben:

30 ml Lysepuffer

30 ml Waschpuffer 1

30 ml Waschpuffer 2.

Das Protein wird mit 9 ml Eluierungspuffer von der Säule gewaschen. Das eluierte Protein wird in drei Fraktionen zu je 3 ml aufgefangen. Jede Fraktion wird in einen vorher 5 min bei 100 °C erhitzten Dialyseschlauch überführt. Bei der anschließenden Dialyse werden die Dialyseschläuche nacheinander in folgenden Flüssigkeiten bei 4 °C gelagert:

1. 4 M Harnstoff + 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat + 0,01 M Tris-HCl, pH 7.4; über Nacht
2. 1 M Harnstoff + 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat + 0,01 M Tris-HCl, pH 7.4; 2 h
3. 1 x PBS; 2 h
4. 1 x PBS; 2 h
5. 1 x PBS; 2 h.

Die dialysierten Proteinlösungen werden sterilfiltriert und zu je 0,5 ml in 1,5 ml-Eppendorf-röhrchen überführt und bei -20 °C gelagert.

### 6.1.2.14.3.2. Proteinaufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen

Die Aufreinigung erfolgt über Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen. Die Aufreinigung wird entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Aufreinigung erfolgt wie unter 6.1.2.14.3.1. beschrieben.

Puffer A) oder Puffer B) werden dazu verwandt:

A)

Lysepuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0 + 300 mM NaCl + 10 mM Imidazol

Waschpuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0 + 300 mM NaCl + 20 mM Imidazol

Eluierungspuffer: 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.0 + 300 mM NaCl + 250 mM Imidazol.

B)

Lysepuffer: 1 x PBS, pH 7.4 + 0,5 M NaCl + 0,1 % Triton X-100 pH 8.0

Waschpuffer: 1 x PBS, pH 7.4 + 0,5 M NaCl + 0,1 % Triton X-100 pH 5.3

Eluierungspuffer: 1 x PBS, pH 7.4 + 0,5 M NaCl + 0,1 % Triton X-100 pH 4.5.

Bei der anschließenden Dialyse werden die Dialyseschläuche nacheinander in folgenden Flüssigkeiten bei 4 °C gelagert:

1. 1 x PBS; 2 h

2. 1 x PBS; 2 h

3. 1 x PBS; 2 h.

Die dialysierten Proteinlösungen werden sterilfiltriert und zu je 0,5 ml in 1,5 ml-Eppendorf-röhrchen überführt und bei -20 °C gelagert.

#### 6.1.2.14.4. Bestimmung des Proteingehaltes von Proteinlösungen

##### 6.1.2.14.4.1. Konzentrationsbestimmung über SDS-Polycrylamidgel

Bei diesem Verfahren vergleicht man im 16 %igen SDS-Polycrylamidgel die Stärke der Proteinbanden von einer Proteinfraction mit unbekannter Konzentration mit der Stärke der Proteinbanden aus Standards mit definierten Proteinkonzentrationen.

Als Standard wird BSA in folgenden Konzentrationen genutzt: 1 mg / ml; 0,5 mg / ml; 0,25 mg / ml; 0,125 mg / ml; 0,1 mg / ml; 0,05 mg / ml.

Durchführung: siehe 6.1.4.2..

##### 6.1.2.14.4.2. Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des BCA-Tests

Bei diesem Verfahren nutzt man die Biuret-Reaktion (Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine in alkalischem Medium) mit nachfolgender kolorimetrischer Bestimmung zur Konzentrationsmessung von Proteinen. Benutzt wird das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce. Es wird entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

#### 6.1.2.15. Langzeitlagerung von Bakterien

Von einer Bakterienübernachtskultur werden jeweils 920  $\mu\text{l}$  in ein Kryoröhrchen pipettiert. Es werden 80  $\mu\text{l}$  Glycerin hinzugefügt, durch Schwenken gemischt und auf Trockeneis eingefroren.

Die Bakterienstocks werden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 6.1.3. Biochemische Methoden

#### 6.1.3.1. Bestimmung der $K_i$ -Werte von Cysteinproteinaseinhibitoren

Die Cysteinproteinasen werden in der Reaktionslösung in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

Papain	0,025 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (0,3575 $\mu\text{U} / \text{ml}$ )
Cathepsin B	0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$
Cathepsin L	0,01625 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (1 $\mu\text{U} / \text{ml}$ )
Cathepsin S	0,54 $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

Die Substrate für die einzelnen Cysteinproteinasen sind:

Papain	Z-Phe-Arg-AMC
Cathepsin B	Z-Arg-Arg-AMC
Cathepsin L	Z-Phe-Arg-AMC
Cathepsin S	Z-Val-Val-Arg-AMC.

Die  $K_i$ -Werte werden für diese Arbeit am Institut für Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Anleitung von Dr. Schilling durchgeführt.

2 ml Pufferlösung mit 10 nM Substratkonzentration werden für 3 min bei 37 °C vorgewärmt.

Danach wird die Lösung in eine 2 ml Küvette pipettiert und der Inhibitor in der entsprechenden Konzentration hinzugegeben. Nachdem der gesamte Ansatz bei 37 °C für 2 min belassen wird, werden 10  $\mu\text{l}$  der Cysteinproteinase hinzupipettiert. Die Fluoreszenz der Reaktionslösung wird bei einer Emissionswellenlänge von 440 nm (Excitationswellenlänge 360 nm) über einen Zeitraum von 5 min mit Hilfe eines PE LS50B Fluorimeters aufgezeichnet. Die Reaktionstemperatur beträgt 37 °C, die Lösung wird kontinuierlich durchmischt.

Die Primärdaten werden mit Hilfe des Programmes PAD PRISM GRAPH ausgewertet.

### 6.1.3.2. SDS-Polycrylamidgel

Mit Hilfe des SDS-Polycrylamidgels werden Proteine nach ihrer Größe (Molekulargewicht) aufgetrennt. Die Proteine werden durch Denaturierung und gleichzeitiger Anlagerung von SDS elektrisch geladen. Aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes wandern die einzelnen Moleküle unterschiedlich schnell im elektrischen Feld. Für die Auftrennung werden 4 %ige Sammelgele und 16 %ige Trenngele benutzt. Eine Proteinprobe wird mit Probenpuffer im Verhältnis 2 : 1 vermischt. Die Lösungen werden 5 min bei 95 °C erhitzt, 5 min auf Eis gestellt und danach 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. 15 µl der Lösung werden auf das SDS-Polycrylamidgel aufgetragen. Ein Marker dient als Standard. Eine Spannung von 120 mV wird über 2 h angelegt. Das Gel wird in einer Coomassie Blau-Färbelösung gefärbt und in einer Entfärbelösung entfärbt.

### 6.1.4. Immunologische Methoden

#### 6.1.4.1. Western-Blot

Im Western-Blot werden Proteine über spezifische Antikörper nachgewiesen. An das nachzuweisende Protein lagert sich der erste Antikörper, der es spezifisch erkennt. Ein zweiter Antikörper, an dem ein Enzym gekoppelt ist, erkennt den ersten Antikörper, nicht jedoch das nachzuweisende Protein. Das an den zweiten Antikörper gekoppelte Enzym setzt ein hinzugefügtes Substrat in einer Farbreaktion um.

Ein SDS-Polycrylamidgel wird auf eine Nitrozellulosemembran gebracht und in eine Transferkammer überführt. Über Nacht erfolgt der Transfer der Proteine. Die Proteine wandern im elektrischen Feld (angelegte Stromstärke 80 mA) aus dem Gel auf die Membran. Am nächsten Tag wird die Membran in 1 x TBS + 5 % Milchpulver für 30 min geschwenkt, unspezifische Bindungen werden geblockt. Die Folie wird 3 x für 3 min in 1 x TBS gewaschen. Jetzt inkubiert man die Membran mit den ersten Antikörpern (Kaninchen-Ak gegen rCysele1 bzw rCysele2) bei Raumtemperatur über 2 h. Die Folie wird 3 x für 3 min in 1 x TBS gewaschen. Der zweite Antikörper (Peroxidase-konjugierter Anti-Kaninchen-Ak) wird hinzugegeben und es wird für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Folie wird 3 x für 3 min in 1 x TBS gewaschen. Das Substrat der Peroxidase (TMB) wird in folgendem Ansatz hinzugefügt: 1,5 ml 0,4 % Chlornaphthol + 7,5 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, add 25 ml 1 x TBS. Die

Membran wird solange in der Lösung belassen, bis die Banden gut sichtbar sind. Die Reaktion wird in Wasser gestoppt. Die Folie wird in Whatmanpapier getrocknet.

#### 6.1.4.2. Zytokin-ELISA

Zur Durchführung der ELISA werden Nunc-Maxisorb-Platten verwendet. Es werden die ELISA-Kits OPTeia™ HUMAN IL-12 (p40) SET, OPTeia™ HUMAN TNF- $\alpha$  SET, OPTeia™ HUMAN IFN- $\gamma$  SET, OPTeia™ HUMAN IL-2 SET und OPTeia™ HUMAN IL-10 SET der Firma Pharmingen genutzt. Der Versuchsablauf ist entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Kulturüberstände werden in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt.

#### 6.1.5. Methoden der Zellkultur

##### 6.1.5.1. Zellkultur von Mauszellen

###### 6.1.5.1.1. Stimulation der induzierbaren Stickoxidsynthetase von MPM

Die induzierbare Stickoxidsynthetase von Peritonealmakrophagen von BALB/c-Mäusen wird durch IFN- $\gamma$  induziert, es wird Stickoxid gebildet. Die Menge des gebildeten Stickoxides kann durch die Griessreaktion bestimmt werden.

Mäuse werden mit Chloroform getötet und in 70 %igem Ethanol desinfiziert. Die Makrophagen werden aus der Bauchhöhle durch mehrmaliges Spülen mit RPMI gewonnen. Die abgesaugte Flüssigkeit wird in einem 50 ml-Röhrchen mit RPMI auf 40 ml aufgefüllt und bei 1200 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 10 ml Erythrozytenlyselösung gelöst, die Lösung bei 1200 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 100  $\mu$ l RPMI gelöst. Nun wird mit RPMI auf 40 ml aufgefüllt und erneut bei 1200 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 3 ml RPMI gelöst. Die Zellen werden gezählt.

Jetzt werden 96-Loch-Flachbodenplatten bestückt. In jedes Loch werden  $2 \times 10^5$  Zellen pipettiert und mit RPMI auf 300  $\mu$ l aufgefüllt. Die Platten werden bei 37 °C 2 h inkubiert, in dieser Zeit heften sich die Makrophagen an das Plastik der Zellkulturplatte. 250  $\mu$ l des Überstandes werden aus jedem Loch abpipettiert, dann, mit Ausnahme der Negativkontrolle

(reines RPMI), 30  $\mu$ l IFN- $\gamma$  (1000 U / ml) (TEBU, Frankreich) hinzugegeben. Jetzt werden die einzelnen Cystatine und die Negativkontrolle in den entsprechenden Konzentrationen hinzupipettiert. Die einzelnen Löcher werden mit RPMI auf 300  $\mu$ l aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 37 °C für 24 h inkubiert.

100  $\mu$ l des Überstandes werden aus jedem Loch in eine neue 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. 100  $\mu$ l Griessreagenz werden jeweils hinzugefügt. Definierte Natriumnitritlösungen werden in den entsprechenden Konzentrationen als Standards genutzt.

#### 6.1.5.1.2. Polyklonal stimulierte Proliferation von Mausmilzzellen

Milzzellen von BALB/c-Mäusen werden gewonnen und mittels des Lektins Concanavalin A (ConA) zur Proliferation angeregt. Die Proliferation wird anhand des Einbaus von radioaktivmarkiertem  $^3$ H-Thymidin gemessen.

Eine Maus wird mit Chloroform getötet und in 70 %igem Ethanol desinfiziert, die Milz wird entnommen. Die Milz wird mit einem Glasstempel durch ein Sieb gerieben. Die Suspension wird in RPMI gelöst. Die Lösung wird in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Auftretende Gewebeklumpen werden mit Hilfe einer Pipette homogenisiert. Die Lösung wird bis auf 40 ml mit RPMI aufgefüllt und für 10 min auf Eis gestellt, größere Partikel sedimentieren und werden abpipettiert. Jetzt wird der Überstand vorsichtig in ein neues 50 ml-Röhrchen pipettiert und bei 4 °C und 1200 rpm 10 min lang zentrifugiert. Danach wird der Überstand verworfen, das Pellet in ein paar Tropfen Erythrozytenlyselösung suspendiert, auf 10 ml aufgefüllt und 10 min auf Eis gestellt. Eventuelle Brocken werden mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Es wird erneut bei 4 °C und 1200 rpm 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in RPMI gelöst und auf 40 ml aufgefüllt, 10 min auf Eis gestellt und nochmals bei 4 °C und 1200 rpm 10 min lang zentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml RPMI resuspendiert. Die Zellen werden gezählt.

Jetzt werden die Zellen ausplattiert. In jedes Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte werden  $3,5 \times 10^5$  Zellen pipettiert. Die Zellen werden mit Ausnahme der RPMI-Kontrolle mit 2  $\mu$ g / ml ConA (Pharmacia, Freiburg) stimuliert. Die einzelnen Cystatine und die Negativkontrolle werden in den entsprechenden Konzentrationen hinzupipettiert. Die einzelnen Ansätze werden mit RPMI auf 200  $\mu$ l aufgefüllt. Die Platten werden bei 37 °C für 52 h inkubiert. Nun werden in jeden Ansatz 20  $\mu$ l radioaktivmarkiertes  $^3$ H-Thymidin (50  $\mu$ Cu / ml) gegeben, so daß je Ansatz 1  $\mu$ Cu enthalten ist. Die Platten werden 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen

werden auf eine Filtermembran gebracht und im Beta-Counter 1450 MikroBeta (Perkin Ellmer Wallac, Freiburg) ausgewertet.

#### 6.1.5.1.3. Antigen-spezifisch stimulierte Proliferation von Mausmilzzellen

Mausmilzzellen von Ovalbuminrezeptortransgenen Mäusen (OvA-Mäusen) werden wie unter 6.1.5.1.2. gewonnen und ausplattiert. Mit Ausnahme der RPMI-Kontrolle werden die Zellen mit Ovalbumin (OvA) (Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  stimuliert. Der weitere Ablauf ist entsprechend 6.1.5.1.2..

#### 6.1.5.2. Zellkultur humaner PBMC

##### 6.1.5.2.1. Polyklonal stimulierte Proliferation humaner PBMC

Aus 30 ml Blut werden PBMC mit Hilfe eines Dichtegradienten aufgetrennt. Dazu wird Ficoll (Amersham Pharmacia Biotech AB, Schweden) verwendet. Der Ablauf erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers.

Die Zellen werden gezählt und ausplattiert. In jedes Loch einer 96-Loch-Flachbodenplatte werden  $3,5 \times 10^5$  Zellen pipettiert. Dann werden, mit Ausnahme der RPMI-Kontrolle, anti-CD3-Ak (25  $\mu\text{g}$  / ml) (Janssen-Cilag, Neuss) dazugegeben. Die Cystatine und die Negativkontrolle werden in den entsprechenden Konzentrationen hinzupipettiert. Die einzelnen Ansätze werden mit RPMI auf 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Der Ansatz wird bei 37 °C für 52 h inkubiert. Nun wird in jedes Loch der 96-Loch-Flachbodenplatte 20  $\mu\text{l}$  radioaktivmarkiertes  $^3\text{H}$ -Thymidin (50  $\mu\text{Ci}$  / ml) gegeben, so daß je well 1  $\mu\text{Ci}$  enthalten ist. Die Ansätze werden 20 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden auf eine Filtermembran gebracht und im Beta-Counter ausgewertet.

#### 6.1.5.2.2. Antigen-spezifisch stimulierte Proliferation humaner PBMC

Die antigen-spezifische Proliferation humaner PBMC wird entsprechend von Baehr et al. (2001) durchgeführt. PBMC werden wie unter 6.1.5.2.1. gewonnen und ausplattiert. Anstelle von FCS wird humanes AB-Serum bzw. autologes Serum in einer Endkonzentration von 5 % genutzt. PPD (freundlicherweise überlassen von Prof. von Baehr, Humboldt-Universität Berlin) wird, mit Ausnahme der RPMI-Kontrolle, in einer Konzentration von 10 IE / ml hinzugegeben. Zur Verstärkung der antigen-spezifischen Proliferation und der Hemmung der Basisproliferation wird IFN- $\alpha$  in einer Endkonzentration von 125 U / ml zugesetzt. Der weitere Ablauf ist entsprechend 6.1.5.2.1., die Zellen werden bis zur Hinzugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin 132 h inkubiert.

#### 6.1.6. Methoden der RNAi

##### 6.1.6.1. Konstruktion der Primer für die RNAi

Aufgrund der Tatsache, daß für die Umschreibung von DNA in RNA eine T3- bzw. eine T7-RNA-Polymerase genutzt wird, werden entsprechende Primer konstruiert. An die Nukleotidsequenz eines Cystatin-Forward-Primers wird am 5`-Ende die Nukleotidsequenz eines T3-Primers angehängt. An die Nukleotidsequenz eines Cystatin-Reverse-Primers wird am 5`-Ende die Nukleotidsequenz eines T7-Primers angehängt.

Folgende Primer werden konstruiert:

T7 / Forward-Primer von rCysele1: 5'> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAA TTT TTT  
CAT CAG GTT TCA <3'

T3 / Reverse-Primer von rCysele1: 5'> AAT TAA CCC TCA CTA AAG GCA AAT TGC  
TGG TGG ATT GTC <3'

T7 / Forward-Primer von rCysele2: 5'> TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA ACT GCT  
CGT CAG CGG TAA <3'

T3 / Reverse-Primer von rCysele2: 5'> AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGG TAT GAT  
GAC TGG AGG ATC <3'.

#### 6.1.6.2. PCR

Mit Hilfe der unter 6.1.6.1. konstruierten Primer wird eine PCR durchgeführt. PCR-Produkte aus 6.1.2.3. werden als Template DNA genutzt.

Folgender Ansatz wird pipettiert:

0,5 µl Template DNA  
0,8 µl dNTP (25 mM)  
2 µl T7 / Forward-Primer (10 µM)  
2 µl T3 / Reverse-Primer (10 µM)  
10 µl 10 x PCR-Puffer  
83,7 µl dH<sub>2</sub>O  
1 µl Taq-Polymerase (1 U / µl).

Folgender Programmablauf wird genutzt:

1. Zyklusanzahl:	1
Temperatur:	92 °C.
2. Zyklusanzahl:	30
Denaturierung:	92 °C 20 sec
Annealing:	51 °C 40 sec
Synthese:	72 °C 2 min.
3. Zyklusanzahl:	1
Denaturierung:	92 °C 20 sec
Annealing:	51 °C 40 sec
Synthese:	72 °C 7 sec.

Die PCR-Reaktionsprodukte werden im Agarosegel überprüft.

#### 6.1.6.3. Umschreiben der dsDNA in ssRNA

Zum Umschreiben der dsDNA in ssRNA werden MEGAscript™ T3- bzw. T7-Kits (Ambion, USA) genutzt. Die Anwendung erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers.

Bei der Zusammenstellung des Reaktionsansatzes wird dieser nicht auf Eis gestellt, die einzelnen Komponenten werden in der unten aufgeführten Reihenfolge hinzugegeben, um ein Ausfällen zu verhindern.

Folgender Ansatz wird pipettiert :

- 4 µl 10 x Puffer
- 6 µl NTP (75 mM)
- 3 µl dH<sub>2</sub>O
- 5 µl Template DNA
- 2 µl T3-Enzymmix bzw. T7-Enzymmix
- 0,5 µl RNase.

Nach dem Umschreiben wird die DNA verdaut. Für den Verdau der DNA werden in jeden Ansatz 1 µl DNase pipettiert. Der Ansatz wird für 15 min bei 37 °C inkubiert.

Die ssRNA wird im Agarosegel überprüft.

#### 6.1.6.4. Aufreinigung der ssRNA

15 µl des T3-Reaktionsansatzes und 15 µl des T7-Reaktionsansatzes aus 6.1.6.3. werden zusammenpipettiert und mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Quiagen, Hilden) gereinigt. Die Reinigung erfolgt entsprechend den Angaben des Herstellers.

#### 6.1.6.5. Herstellen der dsRNA

30 µl der gereinigten ssRNA werden in 15 µl 3 x Injektionspuffer gegeben. Der Ansatz wird zuerst bei 68 °C 10 min, dann bei 37 °C 30 min inkubiert. Die dsRNA wird im Agarosegel überprüft und bei –80 °C gelagert.

#### 6.1.6.6. Mikroinjektion von *C. elegans*

##### 6.1.6.6.1. Vorbereitung der Injektionsnadel

Die in die *C. elegans* zu injizierende Flüssigkeit wird in die Injektionsnadel pipettiert. Die Injektionsnadel wird in den Transjektor eingespannt. Die Spitze der Injektionsnadel wird durch leichtes Anstoßen der Spitze an eine Mikropipette, die als Widerstand genutzt wird, abgebrochen. Die in der Injektionsnadel vorhandene Flüssigkeit kann nun leicht ausfließen.

##### 6.1.6.6.2. Mikroinjektion

Auf einen Objektträger, der eine Schicht getrockneter Agarose besitzt, wird ein Tropfen Halocarbonöl pipettiert. Fünf L4 werden mit Hilfe eines Wurmhakens in diesen Tropfen gebracht und durch leichtes Drücken mit dem Wurmhaken auf den Boden gesenkt. Der Objektträger wird auf den Objektträgertisch des Mikroskopes gelegt. Unter Sichtkontrolle wird die Spitze der Injektionsnadel in die *C. elegans* in einem Winkel von ca. 30 ° zur Oberfläche der Würmer gestochen. dsRNA wird in die Darmgegend der *C. elegans* gepumpt. Nach der Injektion wird in den Öl-*C. elegans*-Tropfen ein Tropfen Wasser gebracht. Die *C. elegans* lösen sich jetzt von dem Öl und können mit dem Wurmhaken auf mit OP50 besiedelte, kleine NGM-Platten überführt werden.

##### 6.1.6.7. *C. elegans*-Nachkommentest

20 *C. elegans* werden mit dsRNA injiziert. 20 Tiere werden als Negativkontrolle mit Injektionspuffer injiziert. 20 Tiere werden mit der dsRNA des Gens Y45 injiziert, dies dient als Positivkontrolle. Durch das Ausschalten des Gens Y45 kommt es zu einem Tod der

Embryonen. Die injizierten Tiere werden auf mit OP50 besiedelte NGM-Platten 24 h bei 16 °C gehalten. Danach wird jede Gruppe in Dreiergruppen unterteilt, die alten NGM-Platten werden verworfen. Jede Dreiergruppe wird auf frische, mit OP50 besiedelte NGM-Platten überführt. Die Tiere einer Dreiergruppe werden ab jetzt nach folgenden Zeitabständen auf frische, mit OP50 besiedelte NGM-Platten überführt: 12 h, 12 h, 2 h, 8 h. Die Eier der Dreiergruppen aus den einzelnen Zeitintervallen, das Schlüpfen der *C. elegans* und deren Weiterentwicklung werden beobachtet und beurteilt.

#### 6.1.6.8. *C. elegans*-Sektion

Adulte *C. elegans* der F1-Generation werden mit Hilfe von Injektionsnadeln aufgerissen, so daß die embryonierten Eier freiliegen. Die embryonierten Eier werden unter dem Mikroskop untersucht und deren Entwicklung eingeschätzt.

#### 6.1.7. Weitere Methoden

##### 6.1.7.1. Immunisierung von Kaninchen, Gewinnung polyklonaler Antiseren

Antigen wird im Adjuvant STP aufgenommen. 25 µg Antigen werden dreimal im Abstand von 14 d Kaninchen subcutan injiziert. Nach sechs Wochen wird den Kaninchen Blut entnommen. Über Nacht wird das Blut bei 4 °C aufbewahrt. Die Proben werden bei 15000 rpm 15 min zentrifugiert. Der Überstand (das Serum) wird abgenommen und aufbewahrt. Im Western-Blot werden die Seren auf Antikörper gegen das jeweilige Antigen untersucht.

#### 6.1.8. Datenverarbeitung

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes EXCEL. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student-t-Test für unabhängige Stichproben.