

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fachbereich Naturwissenschaftliche Technik

# **Etablierung einer stabilen GFP-Rab11 exprimierenden CHO-Zelllinie**

**Diplomarbeit**  
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Laura Gonda

Hamburg-Bergedorf

Juli 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW Hamburg)  
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Birger Anspach (HAW Hamburg)

Die Diplomarbeit wurde betreut und erstellt im Labor für Molekularbiologie und Zellkultur-  
technik an der HAW Hamburg-Bergedorf.

# Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Oliver Ullrich, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat und mich bestens betreut hat.

Auch bei Frau Elisabeth Schäfer möchte ich mich herzlich für die Hilfe und Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken.

Meinen Eltern möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung während meines Studiums und besonders während der Diplomarbeit danken.

---

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Bedeutung der Proteom-Forschung.....	1
1.2	Erforschung des Subproteoms.....	3
1.3	Rolle der RabGTPasen bei der Endocytose .....	5
1.4	Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	9
1.5	Aufgabenstellung .....	14
2	Material und Methoden .....	15
2.1	Klonierung.....	15
2.1.1	Material .....	15
2.1.2	Vektoren .....	16
2.1.3	Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen .....	17
2.1.4	Agarosegelelektrophorese .....	18
2.1.5	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	19
2.1.6	Ligation der DNA-Fragmente mit dem Klonierungsvektor .....	20
2.1.7	Linearisierung des Klonierungsvektors.....	21
2.1.8	Transformation der kompetenten Bakterien.....	21
2.1.9	Aufreinigung kleiner DNA-Mengen .....	21
2.1.10	Aufreinigung großer DNA-Mengen.....	22
2.2	Zellkultur.....	23
2.2.1	Material .....	23
2.2.2	CHO-Zellen.....	23
2.2.3	HeLa-Zellen .....	24
2.2.4	Allgemeine Kulturbedingungen .....	25
2.2.5	Passagieren der Zellen.....	25
2.2.6	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	26
2.3	Transfektion der eukaryotischen Zellen.....	27
2.3.1	Material .....	27
2.3.2	Transfektionsbedingungen .....	28
2.3.3	Transfektion mit Lipofectamine2000.....	28
2.3.4	Transfektion mit Fugene6 .....	29
2.4	Selektion der stabil transfizierten Zellen.....	30

2.4.1	Material .....	30
2.4.2	Das Antibiotikum G418 .....	30
2.4.3	Isolierung von Zellkolonien mit Papierstückchen.....	31
2.4.4	Isolierung von Zellkolonien mit Deckgläschen .....	32
2.4.5	Isolierung von Zellkolonien mit Klonierungszyklindern .....	32
2.4.6	Isolierung von Zellkolonien mit dem Zellschaber .....	33
2.4.7	Isolierung von Zellklonen durch Verdünnung .....	34
2.5	Fluoreszenzmikroskopie.....	35
2.5.1	Material .....	35
2.5.2	Antikörper .....	36
2.5.3	Fixierung der Zellen .....	36
2.5.4	Durchführung der Immunfluoreszenzanalyse .....	37
2.5.5	Permeabilisierung der Zellmembran mit Saponin und anschließende Immunfluoreszenzanalyse .....	38
3	Ergebnisse .....	40
3.1	Herstellung des Vektors pAcGFP-C2-rab11-His <sub>6</sub> .....	40
3.1.1	Klonierungsstrategie.....	40
3.1.2	Klonierung von Rab11 und His <sub>6</sub> in den Vektor pAcGFP-C2 .....	42
3.2	Optimierung der Transfektion .....	45
3.2.1	Unterschiede der Vektoren pAcGFP-C2 und pAcGFP-C2-rab11-His <sub>6</sub> .....	45
3.2.2	Transfektion von CHO- und HeLa-Zellen .....	46
3.2.3	Vergleich der Transfektionsreagenzien Lipofectamine2000 und Fugene6.....	50
3.2.4	Effekt durch die Linearisierung des Vektors auf die Transfektion .....	52
3.2.5	Auswirkungen von der Größe der Kulturschalen auf die Transfektion .....	52
3.2.6	Optimierte Transfektionsbedingungen .....	54
3.3	Etablierung einer Methode zur Isolierung von Zellkolonien .....	54
3.3.1	Angewandte Methoden .....	54
3.3.2	Gewinnung von Zellklonen durch Verdünnung.....	57
3.4	Analyse durch die Fluoreszenzmikroskopie .....	59
3.4.1	Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop.....	59
3.4.2	Lokalisation von GFP und His <sub>6</sub> -GFP-Rab11 in stabil transfizierten CHO- Zellen.....	61
3.4.3	Besonderheiten in der Morphologie und Physiologie der Zellen.....	63
3.4.4	Stabilität der stabilen Zelllinien .....	65

3.4.5	Ergebnisse der Extraktion der cytosolischen Proteine mit Saponin.....	70
4	Diskussion .....	75
4.1	Bewertung der Transfektionseffizienz .....	75
4.2	Etablierung einer Methode zur Isolierung von Zellkolonien .....	77
4.3	Veränderte Morphologie bei His <sub>6</sub> -GFP-Rab11 transfizierten Zellen.....	78
4.4	Lokalisation von GFP in stabil transfizierten CHO-Zellen.....	78
4.5	Lokalisation von His <sub>6</sub> -GFP-Rab11 in stabil transfizierten CHO-Zellen.....	79
4.6	Bewertung der Stabilität der transfizierten Zellen .....	80
5	Zusammenfassung .....	82
6	Literatur .....	83
	Abkürzungsverzeichnis .....	87
	Abbildungsverzeichnis .....	88
	Tabellenverzeichnis.....	89
	Anhang .....	90

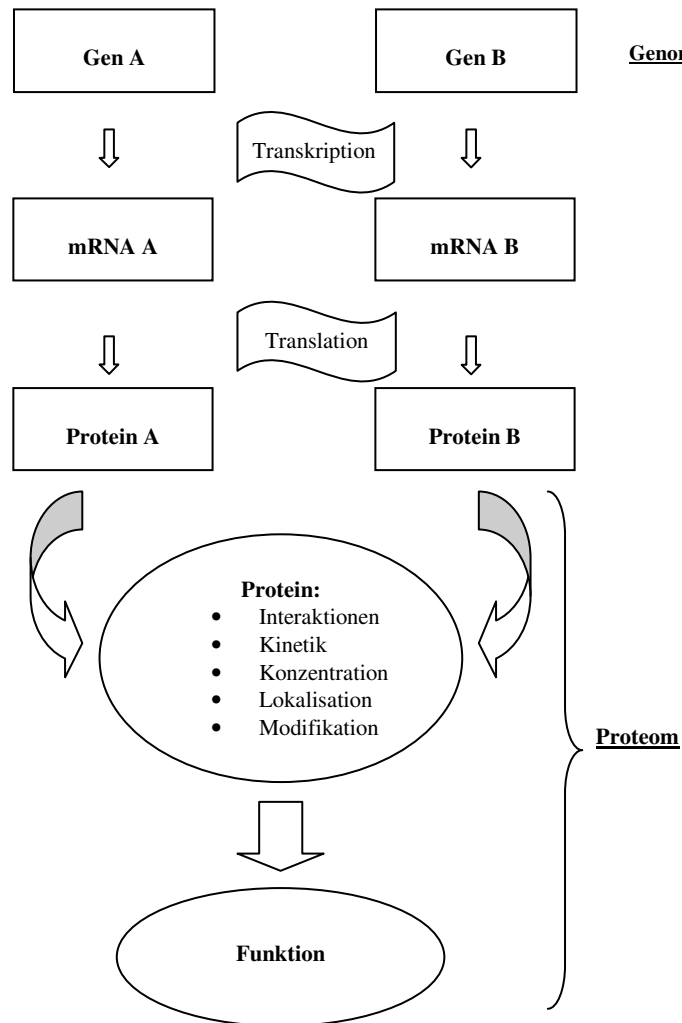
# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung der Proteom-Forschung

Die Proteomic umfasst die Erforschung des Proteoms, d.h. die Gesamtheit aller in einer Zelle, einem Gewebe oder einem Lebewesen unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt vorliegenden Proteine. Das Proteom ist im Gegensatz zum statischen Genom hoch dynamisch und kann sich daher in seiner qualitativen und quantitativen Proteinzusammensetzung aufgrund veränderter Bedingungen (Umweltfaktoren, Temperatur, Genexpression, Wirkstoffgabe etc.) ändern. Diese Veränderungen können zum Teil sehr schnell erfolgen, beispielsweise durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierung von Proteinen, die im Rahmen der Signaltransduktion eine sehr wichtige Rolle spielen.

In den letzten Jahren hat sich dieses Gebiet noch erweitert, zu Zahl und Menge werden jetzt noch die Funktion und der Wirkort mit einbezogen. So versteht man unter dem Begriff Proteom die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, ihre Lokalisationen, posttranslationalen Modifikationen (z.B. Phosphorylierungen) und Interaktionen zu jedem beliebigem Zeitpunkt (Christea et al., 2004).

Die meisten Proteine sind an komplexen Vorgängen in der Zelle beteiligt. Dabei bilden sich teilweise große Proteinkomplexe, wobei es zu vielfältigen Protein-Protein-Wechselwirkungen kommt. Das Wort „Protein“ leitet sich aus dem griechischem „proteios“ ab, was die erste Stelle bedeutet. Berzelius benutzte das Wort Protein erstmals 1838, um die Bedeutsamkeit dieser Moleküle zu zeigen (Christea et al., 2004). Um die genauen zellulären Abläufe abschätzen zu können, ist zuvor eine umfangreiche Erforschung der Proteinfunktionen und Interaktionen notwendig (Kumar and Snyder, 2002).



**Abbildung 1.1 Der Ablauf vom Genom zum Proteom**

Das Genom umfasst die Gesamtheit aller Gene, diese werden in mRNA transkribiert. Durch die Translation werden die Proteine synthetisiert und posttranslational modifiziert. Das Proteom umfasst die Gesamtheit aller Proteine zu jedem beliebigen Zeitpunkt und jeder Bedingung in einer Zelle. Aus den einzelnen Zuständen ergibt sich die Funktion eines Proteins (verändert nach Christea et al., 2004).

Die Proteom-Analyse gibt einen Einblick in biologische Prozesse und bietet ein besseres Verständnis für physiologische und pathologische Vorgänge in einem Organismus. Dadurch entstehen neue Möglichkeiten in der Entwicklung und Validierung von Wirkstoffen und Therapeutika.

Erst wenn man versteht weshalb eine Krankheit auftritt, kann man sie heilen. Viele Krankheiten sind auf ein oder mehrere defekte Proteine zurückzuführen. Die Medizin erhofft sich so neue Wirkstoffe gegen Krebs, Infektionen und bestimmte Nervenkrankheiten zu entwickeln. Krankheiten wie Sichelzellanämie, Alzheimer oder die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beruhen

auf fehlerhaft geformte Proteine. Durch die Proteom-Forschung konnten hier schon die verantwortlichen Proteine identifiziert werden. Ist also bekannt, welches Protein für eine Fehlfunktion verantwortlich ist, kann gezielt ein kleines Molekül (Medikament) entwickelt werden, welches an dieses Protein andockt und es abschaltet oder seine Funktion übernimmt. Einzelne Forschungsgruppen auf der ganzen Welt sind zurzeit dabei, Zielproteine für diese Krankheiten zu entdecken und zu entwickeln. Auch virenhemmende Medikamente, die bei Aids und Grippe angewendet werden, beruhen auf Wirkstoffen die so entwickelt wurden.

Nach Schätzungen gibt es in bestimmten menschlichen Zellen etwa 10.000 exprimierende Gene. Die „Ein-Gen-ein-Protein-Hypothese“ besagt, dass ein Gen ein Protein synthetisiert. Jedoch wird die Anzahl der Proteine im gesamten menschlichen Körper auf ein vielfaches höher als etwa 10.000 angenommen. Proteine werden durch viele chemische Modifikationen verändert, dadurch ändern sich die Enzymaktivität, die Bindungsstärke, Interaktionspartner und weitere Vorgänge. Da noch nicht alle Modifikationen bekannt sind und eine genaue Zahl der Gene auch noch nicht bestimmt werden konnte, ist die Größe des menschlichen Proteoms wahrscheinlich um ein vielfaches höher, als bisher angenommen (Huber et al., 2003).

Die am häufigsten verwendete Methode zur Identifizierung von komplexen Proteinmischungen ist die 2D Gelelektrophorese (Huber et al., 2003). Hierbei werden die Proteine in zwei Stufen aufgetrennt, zuerst nach dem Isoelektrischen Punkt und dann nach dem Molekulargewicht. Die gewünschten Proteine werden aus dem Gel ausgeschnitten, proteolytisch gespalten und mit einem Massenspektrometer analysiert.

## **1.2 Erforschung des Subproteoms**

Bei der Proteom-Analyse können nicht nur ganze Zellen untersucht werden, es können auch einzelne Zellbestandteile untersucht werden. Bei der Analyse des Subproteoms ist nicht das gesamte Proteom bedeutend, sondern das jeweilige Proteom der einzelnen Zellorganellen. Mit dieser Methode können alle Membranproteine und lösliche luminalen Proteine innerhalb einer Zellorganelle bestimmt werden.

Für die Analyse von Subproteomen wurde bisher eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt um bestimmte Organellen zu isolieren. Hierbei können Organellen nach ihren



physikalischen Eigenschaften aufgetrennt werden. Diese Methode ist in zwei Stufen eingeteilt, zunächst wird die zelluläre Struktur zerstört und die Probe homogenisiert, anschließend werden bestimmte Organellen durch Zentrifugation abgetrennt. Jede Form von Organellen ist charakterisiert in Größe, Dichte, Inhalt und anderen Bestandteilen (Huber et al., 2003).

Trischler et al. wendeten 1999 diese Methode an, Bartz et al. untersuchten mit dieser Methode 2001 den Rezeptor-Recycling-Weg *in vitro*. Die Recycling Endosomen, die entsprechenden Zellorganellen des Endocytose-Weges, sollten hierbei isoliert werden. Als Marker wurde hierfür das Protein Rab11 (siehe 1.3) verwendet. Dieses befindet sich auf der äußeren Seite der Zellorganellen und ist für Antikörper leicht zugänglich. Zur Analyse der organellspezifischen Proteine wurden kultivierte Zellen vorsichtig aufgebrochen, um die Zellorganellen nicht zu zerstören. Diese wurden dann durch einen Saccharosegradienten aufgetrennt. Im Anschluss an die Fraktionierung konnten die Proteine aus den Organellen isoliert und analysiert werden. Die hier angewandte Methode zur Isolierung von bestimmten Proteinen, bzw. Zellorganellen wird Immunisolierung genannt (Trischler et al., 1999; Bartz et al., 2001; Bartz et al., 2005). Die Fraktion, die die zu untersuchende Organelle enthält, wurde mit magnetischen Partikeln inkubiert. An diese Partikel wurde zuvor ein Antikörper gegen das Rab11 gebunden. Die magnetischen Partikel lagerten sich somit an das Rab11 an, welches sich auf der zu untersuchenden Organelle, dem Recycling Endosom, befand. Mit Hilfe eines Magneten konnte das Recycling Endosom aus der Probe isoliert und für weitere Analyse Zwecke verwendet werden. Mit dieser Methode wurde primär die Lokalisation und quantitative Verteilung bekannter, endosomaler Proteine analysiert.

Nachteil dieser Methode für die Proteom-Analyse ist die Verwendung eines Antikörpers, der nur begrenzt verfügbar ist. Dadurch erhält man eine zu geringe Probenmenge für die Proteom-Analyse.

Eine einfachere Methode zur Isolierung größerer Mengen von Proteinen ist die Verwendung von „tag-Proteinen“. Als tag bezeichnet man ein Protein oder Peptid, das mit dem zu untersuchenden Protein fusioniert wird. Sie dienen als eine Art Haken und können dann ganz einfach aus der Probe „gefischt“ werden, da sie eine hohe Affinität zu einer bestimmten Affinitätsmatrix besitzen. So kann das Protein in nur einem Schritt aufgereinigt werden. Am längsten bekannt und verwendet ist der His-tag, welcher aus 6 bis 12 aufeinander folgenden Histidinen besteht. Fusionsproteine mit diesem tag lassen sich über immobilisierte Metall-

Ionenaffinitäts-Chromatographie (IMAC) aufreinigen, da sie eine hohe Affinität zu doppelt geladenen Nickel-, Zink- oder Kobalt-Kationen besitzen.

Der Ansatz einer Affinitätschromatographie unter Verwendung eines His-tags soll in dieser Arbeit eine neuartige Strategie zur Isolierung von Zellorganellen darstellen.

Zur Anwendung dieser vereinfachten Methode dient die in dieser Arbeit durchgeführte Etablierung einer stabilen Zelllinie. Das Protein Rab11 dient hierbei als Marker, da es leicht zugänglich an der äußeren Membran von Organellen lokalisiert ist. Um das Rab11 und damit die gesamte Organelle aus der Zelle zu fischen, ist an diesem ein His-tag fusioniert. Dieser kann über eine Ionenaffinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden. Die Zellen müssen somit lediglich durch eine mechanische Methode aufgebrochen werden, und die gewünschte Zellorganelle kann durch eine Chromatographie isoliert werden. Der Schritt mit der Dichtegradienten-Zentrifugation kann so umgangen werden, wodurch Zeit gespart werden kann und eine bessere Aufreinigung erreicht werden würde.

### **1.3 Rolle der RabGTPasen bei der Endocytose**

Eukaryotische Zellen nehmen Nährstoffe aus ihrer Umgebung durch Endocytose auf. Die Stoffe gelangen entweder durch unspezifische Endocytose (Aufnahme von Flüssigkeiten), oder spezifisch über Rezeptoren (rezeptorvermittelte Endocytose) in die Zelle (Watts and Marsh, 1992; Trowbridge et al., 1993; Gruenberg and Maxfield, 1995; Mellman, 1996).

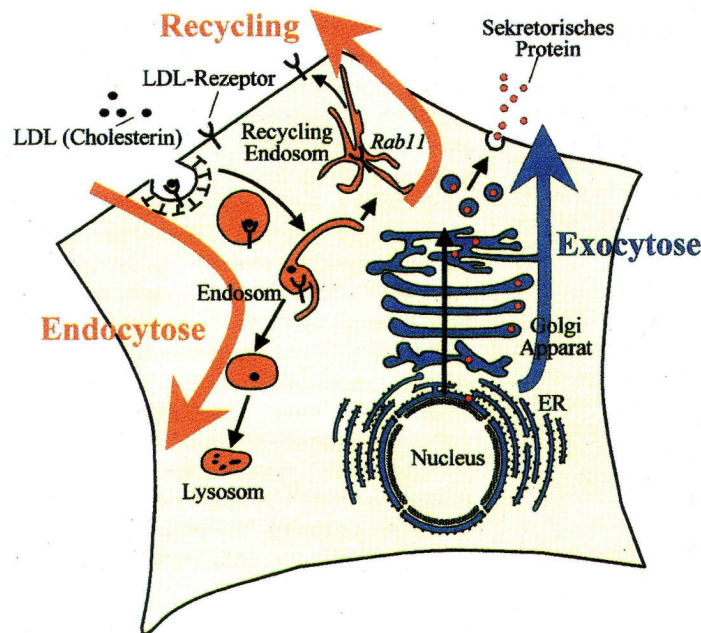
Die Zellen haben ein verzweigtes inneres Membransystem, wodurch Makromoleküle durch Endocytose aufgenommen werden können und zum Abbau zu den Lysosomen transportiert werden. Neben dem Abbau von Makromolekülen kann mit dem Exocytoseweg auch der Transport von synthetisierten Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden reguliert werden.

Eukaryotische Zellen beinhalten eine Vielzahl von verschiedenen Organellen, wie Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum, Endosomen, Golgi-Apparat und Lysosomen. Der Transport von Proteinen und Lipiden innerhalb einer Zelle geschieht mit Transportvesikeln, die ihre Fracht zu einer bestimmten Zielmembran befördern.

Durch die rezeptorvermittelte Endocytose gelangen extrazelluläre Proteine und kleine Partikel in die Zelle. Die Moleküle binden an komplementäre Rezeptoren auf der Membranoberfläche, dort häufen sie sich an und gelangen dann in Vesikeln in die Zelle (siehe Abbildung 1.2).

Die aufgenommenen Moleküle werden zu den frühen Endosomen transportiert, die auch „Sorting Endosomen“ genannt werden (Dunn et al., 1989). Diese Organelle „sortiert“ die Moleküle zu ihrer Zielmembran. Die zum Abbau bestimmten Moleküle (z.B. LDL: Low Density Lipoprotein) werden über das späte Endosom zu den Lysosomen transportiert. Andere Moleküle, wie Rezeptoren, werden über das „Recycling Endosom“ zurück zur Plasmamembran transportiert (Dunn et al., 1989; Gosh and Maxfield, 1995; Gruenberg and Maxfield, 1995). Die meisten Liganden lösen sich im Sorting Endosom aufgrund von einer pH-Wert Änderung von ihren Rezeptoren.

Bei der Vielzahl von Transportwegen in einer Zelle, muss gewährleistet werden, dass das „richtige“ Protein zur „richtigen“ Organelle oder Membran gelangt, ein sekretorisches Protein darf nicht aus Versehen in die Lysosomen geleitet werden. Dafür muss erstens das Protein in das richtige Transportvesikel verpackt werden, zweitens muss das Transportvesikel zur richtigen Membran transportiert werden und drittens mit dieser verschmelzen. Für die spezifische Verpackung der Proteine in die richtigen Transportvesikel dienen Erkennungssignale, die Proteine tragen müssen. Enthalten sie kein Signal, so werden sie nicht transportiert. Alle anderen Proteine enthalten „Adressaufkleber“, die den Bestimmungsort kennzeichnen. Es handelt sich dabei entweder um zusammenhängende Signalsequenzen von 15-60 Aminosäureresten oder um Signalstrukturen, die nur im dreidimensionalen Zustand zu erkennen sind. Die Signalsequenzen liegen häufig am N- oder C-Terminus eines Proteins und werden oft durch Signalpeptidasen entfernt, sobald ein Protein an seinem Bestimmungsort ist (Wink, 2004).



**Abbildung 1.2 Endocytose- und Exocytoseweg in eukaryotischen Zellen**

Bei der Endocytose (orange) werden Moleküle über Rezeptoren in die Zelle aufgenommen (z.B. LDL) und über Endosomen zu den Lysosomen transportiert. Die Rezeptoren gelangen über das Recycling Endosom zurück zur Membranoberfläche. Bei der Exocytose (blau) werden sekretorische Proteine in Vesikeln vom ER (Endoplasmatisches Retikulum) über den Golgi-Apparat zur Membranoberfläche transportiert (Bartz et al., 2001).

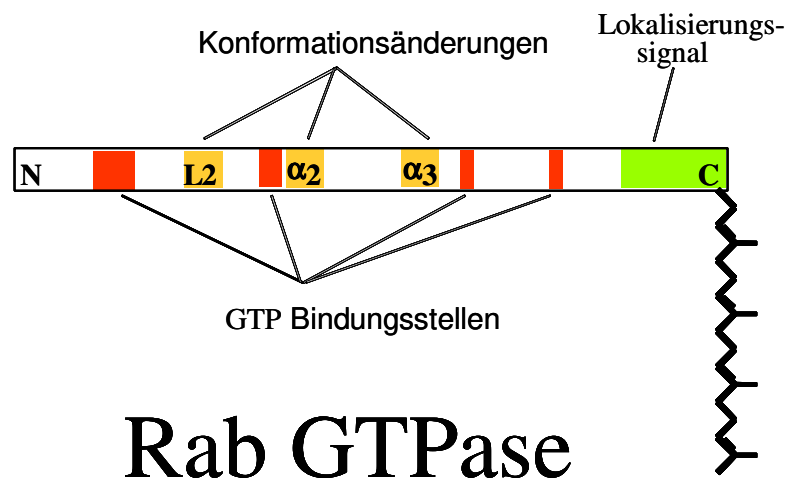
Eine Familie GTP-bindender Proteine, die RabGTPasen, ist an der Regulation des Vesikeltransportes zur richtigen Zielmembran in den Zellen beteiligt. Die Rab-Proteine haben Molekulargewichte von 20-25 kDa und gehören zu der Ras-Superfamilie die in Ras, Rab, Rho, Rap, Rac, Ral und ARF unterteilt werden (Bourne et al., 1991). Eukaryotische Zellen exprimieren mehr als 60 verschiedene Rab-Proteine (Pfeffer and Aivazian, 2004). Diese sind auf vielen verschiedenen Organellen spezifisch lokalisiert, wobei jeweils ein Transportschritt durch mindestens ein spezifisches Rab-Protein reguliert wird.

Rab-Proteine regulieren die Vesikelbildung, -transport und -fusion, dabei können sie Motor-Proteine auf Transportvesikel heften und die Beweglichkeit der Vesikel aktivieren (Pfeffer, 2001).

Rab-Proteine kommen in der Zelle in zwei unterschiedlichen Konformationen vor, der aktiven GTP-gebundenen und der inaktiven GDP-gebundenen Form (siehe Abbildung 1.3). In der aktiven Konformation interagieren die Rab-Proteine mit einer Vielzahl von Rab-Effektorproteinen, um ihre spezifischen Funktionen auszuführen (Pfeffer and Aivazian, 2004). Der Wechsel zwischen den beiden Aktivitätsformen ist mit einer reversiblen Bindung an der Membran gekoppelt. Die Hydrolyse von GTP wird durch ein GTPase-aktivierendes

Protein (GAP) katalysiert und überführt das Rab-Protein in die inaktive Form. Inaktive GDP-gebundene Rab-Proteine lösen sich durch RabGDI (GDP dissociation inhibitor) von der Membran. Durch die Ablösung von der Membran gelangen die Rab-Proteine in das Cytosol, wo sie stabile cytosolische Komplexe bilden, welche als cytoplasmatisches Reservoir an Rab-Proteinen vorliegen. RabGDI spielt hierbei eine zentrale Rolle bei dem Recycling der Rab-Proteine durch die Ausübung der reversiblen Bindung mit der Membran. Inaktive Rab-Proteine gelangen über ein lösliches Zwischenprodukt zurück zur Membran, wo sie erneut mit GTP binden und in die aktive Form wechseln (Ullrich et al., 1993; Ullrich et al., 1994; Seabra et al. 2004).

Rab-Proteine sind sehr spezifisch und nur auf bestimmten Membranen lokalisiert. Durch einen Lipidrest (Geranylgeranylierung) an ihrem C-Terminus erreichen sie eine spezifische Membranbindung. Durch die hohe Hydrophobie des Lipidrestes ist eine effektive Bindung an die Zielmembran möglich (Ullrich et al., 1993; Seabra et al. 2004).



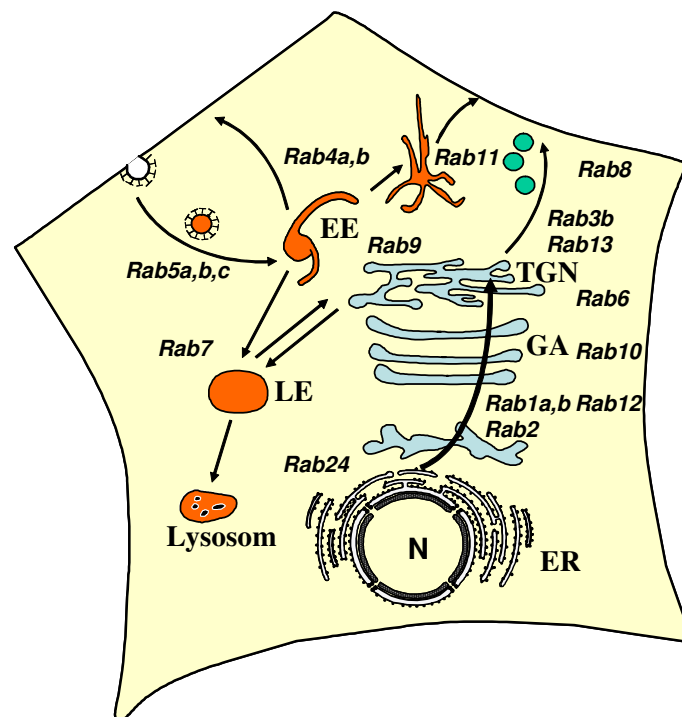
**Abbildung 1.3 Aufbau einer RabGTPase**

An dem C-Terminus einer RabGTPase befindet sich das Lokalisierungssignal mit dem Peptidrest. Durch die Bindung von GTP an den Bindungsstellen gelangt das Protein in die aktive Form.

Einige Rab-Proteine sind schon analysiert und die Lokalisation innerhalb der Zelle sowie die Funktion geklärt (siehe Abbildung 1.4). Zerial und McBride zeigten 2001 die Aufgabe von Rab5 und Rab4: Transport der Vesikel zu den frühen Endosomen durch Rab5, bzw. Recycling der Rezeptoren von den Endosomen zur Zellmembran durch Rab4.

In dieser Arbeit soll näher auf die Lokalisation des Rab11-Proteins eingegangen werden. Rab11 existiert in zwei Isoformen, Rab11a und Rab11b. Zusammen mit Rab4, Rab5, Rab7, Rab9 und Rab15 reguliert es den endocytotischen Transport, Sortierung und Recycling von Molekülen zwischen den Endosomen, Lysosomen und der Plasmamembran (van der Sluijs et al., 1992, Ullrich et al., 1996, Chavrier and Goud, 1999).

Rab11 ist mit den Post-Golgi-Membranen, den sekretorischen Vesikeln (Urbé et al., 1993) sowie den Recycling Endosomen verbunden (Ullrich et al., 1996). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Rab11 den Transport vom frühen Endosom zu dem Trans-Golgi-Netzwerk reguliert, dabei soll dieses Protein die Verbindung zwischen dem endocytotischen und dem sekretorischen Weg kontrollieren (Wilcke et al., 2000).



**Abbildung 1.4 Lokalisation der Rab-Proteine in einer eukaryotischen Zelle**

Rab-Proteine sind spezifisch an bestimmte Zellorganellen gebunden und ein Rab-Protein reguliert meistens einen bestimmten Transportschritt. Isoformen der einzelnen Rab-Proteine sichern den Weg gegenüber Mutationen ab.

## 1.4 Stabile Transfektion von eukaryotischen Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von fremder DNA in eukaryotische Zellen, zur Expression eines bestimmten Proteins, zum Beispiel mit dem Ziel der Analyse der Proteinfunktion oder -lokalisation, oder zur Gewinnung biotechnisch relevanter Proteine. Man

unterscheidet chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden. In dieser Arbeit wurde als biologische Transfektionsmethode die Lipofektion gewählt.

Bei dieser Methode werden kleine unilamellare Vesikel aus dem kationischen DOTMA und dem natürlichen Helferlipid DOPE verwendet. Die Vesikel werden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch an die Oberfläche der Liposomen gebunden. Aus den kationischen Lipiden und der DNA bilden sich zunächst DNA-Lipid-Komplexe. Die positiv geladenen Komplexe lagern sich an die negativ geladene äußere Zellmembran an. Der genaue Mechanismus für die Einschleusung der Komplexe ist noch nicht geklärt, vermutlich werden sie durch Endocytose in die Zelle aufgenommen (Gassen and Schrimpf, 1999).

Die Voraussetzung für eine stabile Expression der fremden DNA ist die Integration dieser in das Wirtsgenom. Die aufgenommene DNA wird in der Zelle innerhalb von wenigen Tagen größtenteils abgebaut. Nur bei maximal 0,1 % der transfizierten Zellen wird die DNA stabil in das Genom der Zelle integriert (Mühlhardt, 2002). Aus diesem Grund muss eine Selektion der stabil transfizierten Zellen erfolgen. Ein weit verbreitetes Selektionssystem ist die Geneticinresistenz.

Geneticin (G418) ist ein Antibiotikum und wird zur Selektion der stabile Transfektion verwendet. Es ist strukturell mit Neomycin verwandt und gehört zu den Aminoglykosidantibiotika. Das G418 ist toxisch für Bakterien, Hefen und tierische Zellen, indem es die Funktion der Ribosomen und damit die Proteinbiosynthese in den Zellen inhibiert. In hohen Konzentrationen ist es jedoch auch toxisch für resistente eukaryotische Zellen.

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pAcGFP-C2 enthält ein Neomycinresistenzgen. Dieses Gen kodiert eine Aminoglykosid-Phosphotransferase, welche das G418 durch Phosphorylierung inaktiviert (Koch-Brandt, 1993).

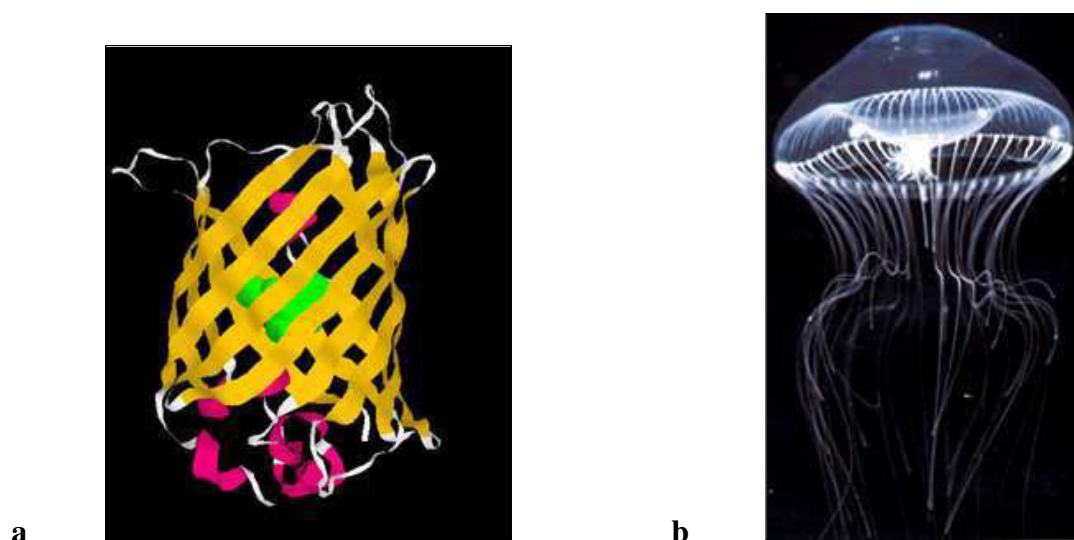
Damit schon kurz nach der Transfektion eine Beurteilung über die Effizienz der Transfektion gemacht werden kann, wird zusätzlich ein Markergen verwendet. In dieser Arbeit wurde das Green Fluorescent Protein (GFP) als Markergen verwendet.

GFP ist ein fluoreszierendes Quallenprotein, das durch Anregung mit UV-Licht grünes Licht abstrahlt (siehe Abbildung 1.5) (Prasher, 1992). Dieses Protein mit 238 Aminosäuren enthält Serin-, Tyrosin- und Glycinreste, deren Seitenketten spontan miteinander reagieren und so eine Fluoreszenz hervorrufen (Lodish et al., 2001).

In dieser Arbeit soll das Gen für Rab11 N-terminal an das GFP in den Klonierungsvektor eingebaut werden. Das translatierte Fusionsprotein hat im Idealfall unabhängig voneinander die Eigenschaften beider Proteine. Zum einen soll dieses Fusionsprotein grün fluoreszieren und zum anderen die typische Funktion des Rab11-Proteins ausüben (Wink, 2004).

Ein großer Vorteil des GFP liegt in der Möglichkeit lebende Zellen zu beobachten (life time imaging), da GFP spontan (ATP-abhängig) durch Anregung mit UV-Licht eine Fluoreszenz sendet (Wink, 2004). Da alle Zellen ATP enthalten, bewirkt das Protein eine grüne Färbung, so dass die Lokalisation des Fusionsproteins in den Zellen beobachtet werden kann.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit transfizierte Zellen mit der Durchflusszytometrie, z.B. durch ein FACS-Gerät (Fluorescence activated cell sorting) zu isolieren. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt. Dabei passieren sie im Sensormodul einen Laserstrahl, der fluoreszierende Zellen erkennt und sortiert.

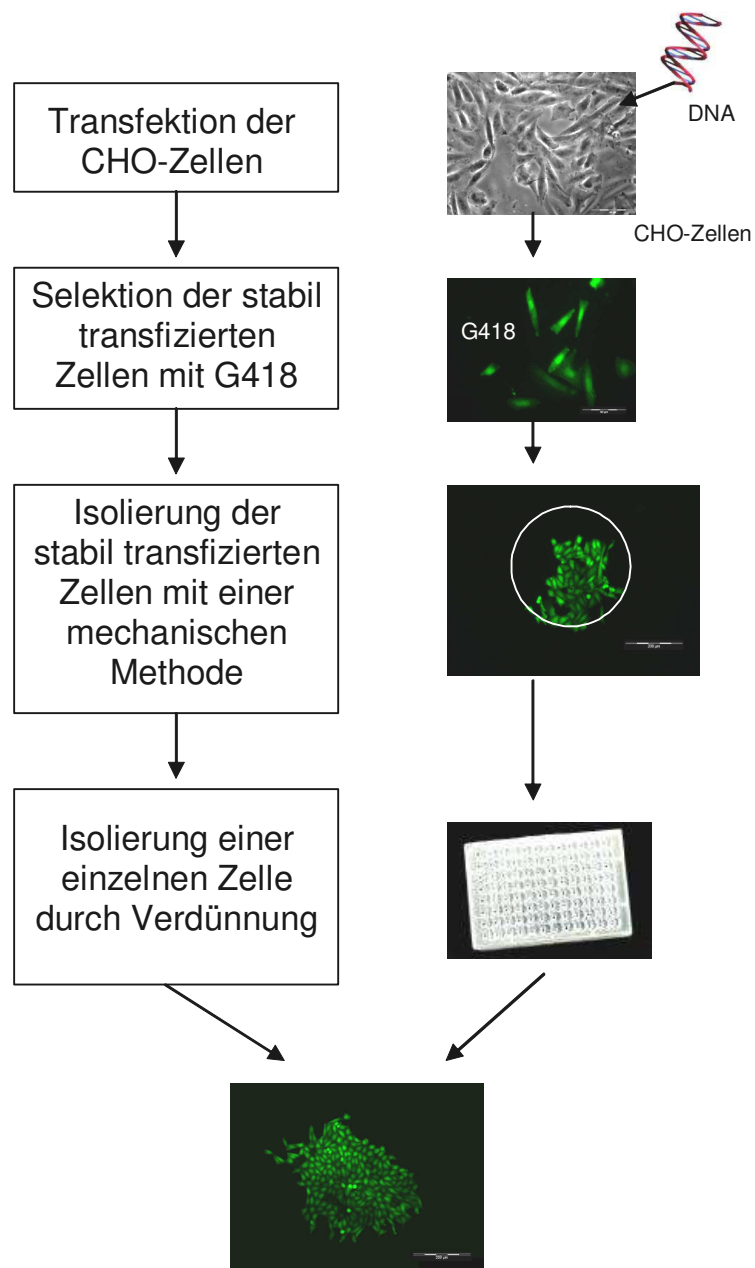


**Abbildung 1.5** a) Struktur des GFP b) Fluoreszierende Qualle *Aequorea coerulescense*  
a) Dreidimensionale Struktur des Green Fluorescent Proteins. b) Fluoreszierende Qualle, aus der das Gen für das GFP gewonnen wird.

Das DNA-Konstrukt wird bei der Transfektion zufällig in das Genom der Wirtszelle integriert. Die Umgebung, in der sich das Konstrukt befindet, beeinflusst dessen Expression stark, so dass sich die transfizierten Zellen zum Teil erheblich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Um diese Abweichungen zu minimieren, geht eine stabile Zelllinie aus nur einer Zelle hervor. Nach der Transfektion und der Selektion der positiven Zellklone erfolgt im Anschluss die Isolierung einer einzelnen Zelle, die das gewünschte Protein in ausreichendem Maße exprimiert. Danach sollten eigentlich alle Zellen die gleichen Eigenschaften besitzen, am besten zu



erkennen an der Intensität der Fluoreszenz. Die einzelnen Schritte von der Transfektion der Zellen bis zur Kultivierung der stabilen Zelllinie ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Ein großes Problem transfizierter Zelllinien ist jedoch, dass sie über einen längeren Zeitraum nicht stabil sind. Im Laufe der Kultivierung der Zellen kommt es zu Veränderungen des Genoms, wodurch sich die Eigenschaften der Zellen ändern (Mülhardt, 2002).



**Abbildung 1.6 Strategie zur Herstellung einer stabilen Zelllinie**

Durch die Lipofektion werden CHO-Zellen transfiziert. Mit dem Antibiotikum G418 (Geneticin) erfolgt eine erste Selektion der stabil transfizierten und damit fluoreszierenden Zellen. Da mit dieser Methode keine 100 % Selektion erreicht werden kann, wird eine Zellkolonie durch eine mechanische Methode isoliert. Anschließend wird eine einzelne Zelle durch Verdünnung auf einer 96-well-Platte isoliert, aus dieser wächst dann eine stabile Zelllinie hervor.

## 1.5 Aufgabenstellung

Bei der Erforschung von Subproteomen gibt es bisher nur die sehr aufwendige und ungenügende Methode zur Aufreinigung von Zellorganellen durch die Dichtegradientenzentrifugation. Die Etablierung einer Methode zur einfachen und spezifischen Isolierung von Zellorganellen - in diesem Fall Recycling Endosom - war Ziel dieser Arbeit. Mit dieser Methode soll die Erstellung von Subproteomen vereinfacht werden. Zu diesem Zweck sollte eine stabile Zelllinie entwickelt werden, welche zur Etablierung der Methode verwendet werden kann.

Als Alternative zu der Isolierung von Zellorganellen durch die Dichtegradientenzentrifugation sollen organellspezifische Membranproteine, fusioniert mit einem „His<sub>6</sub>-tag“, zur affinitätschromatographischen Aufreinigung verwendet werden. Diese dienen als Haken und ermöglichen das „Angeln“ der spezifischen Organelle aus Zellysaten. Zusätzlich zu einem His-tag soll ein Fluoreszenzprotein (GFP) an das Fusionsprotein gekoppelt werden. Das GFP dient zum einen als Platzhalter zwischen dem Protein und dem His-tag, und zum anderen zur einfachen Isolierung und Beobachtung der transgenen Zellen.

Als organellspezifisches Protein wird Rab11 benutzt, dass auf der Oberfläche von Recycling Endosomen lokalisiert ist.

In dieser Arbeit sollen folgende Aufgaben durchgeführt werden:

- Konstruktion von Klonierungsvektoren mit His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 und GFP alleine
- Optimierung der Transfektion von CHO-Zellen mit dem Klonierungsvektor
- Optimierung von Methoden zur Isolierung von transfizierten Zellen
- Herstellung von zwei stabilen Zelllinien die His<sub>6</sub>-GFP-Rab11, bzw. GFP alleine exprimieren

Bei Erfolg dieser Isolierungsstrategie könnten analog auch andere Rab-Proteine zur Isolierung anderer Zellorganellen verwendet werden. Langfristiges Ziel wird die Erstellung einer Sammlung organellspezifischer Subproteome sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Klonierung

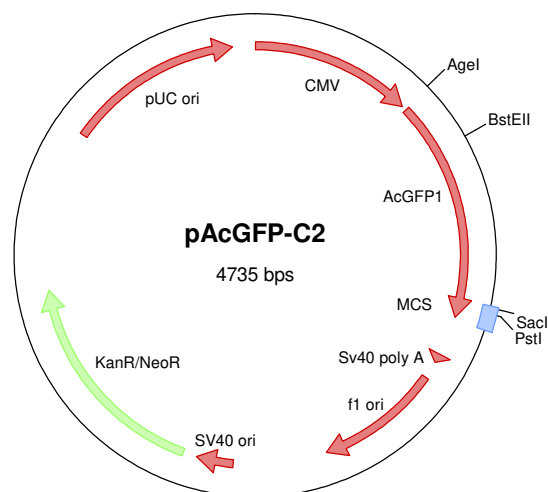
#### 2.1.1 Material

- Restriktionsenzyme
  - AgeI (New England BioLabs)
  - BstEII (New England BioLabs)
  - PstI (New England BioLabs)
  - SacI (New England BioLabs)
- Kanamycin (c = 25 mg/ml)
- Ampicillin (c = 100 mg/ml)
- LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Natriumchlorid, pH 7)
- LB-Agar ( LB-Medium + 15 g/l Agar)
- Vektoren
  - pGEM1-rab11 (Promega)
  - pAcGFP1-C2 (Clontech)
  - pCR4-TOPO-His<sub>6</sub>-GFP1 (Entelechon)
- Kits
  - QIAprep Spin Miniprep (Qiagen)
  - QIAGEN Plasmid Midi (Qiagen)
  - QIAquick PCR Purification (Qiagen)
- QG-Puffer (Qiagen)
- 10 x Ladepuffer (60 % Saccarose, 0,05 % Bromphenolblau, gelöst in 0,5 x TBE-Puffer)
- Glycerin (87 %)
- E. coli DH-5 $\alpha$ , kompetent
- 0,5 x TBE-Puffer (50 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA)
- DNA-Marker
  - 250 bp-DNA-Leiter (Roth, c = 100 ng/ $\mu$ l)
  - GeneRuler DNA-Leiter Low Range (Fermentas, c = 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l)
  - $\Phi$ X174 DNA Marker (Fermentas, c = 0,5 mg DNA/ml)
- Agarose

- T4 DNA Ligase (Fermentas, c = 5u/μl)
- Ethidiumbromid

## 2.1.2 Vektoren

Als Klonierungsvektor wurde für diese Arbeit der Vektor pAcGFP-C2 (Clontech) verwendet (siehe Abbildung 2.1). Dieser Vektor enthält das Protein GFP aus der Qualle *Aequorea coerulescens* und besitzt Resistenzgene für Kanamycin und Neomycin. Das Resistenzgen für Kanamycin dient zur Selektion von transformierten Bakterien, das Resistenzgen für Neomycin zur Selektion von transfizierten eukaryotischen Zellen. Für diese Arbeiten musste das Gen für Rab11 und der His-tag in den Vektor hineinkloniert werden.



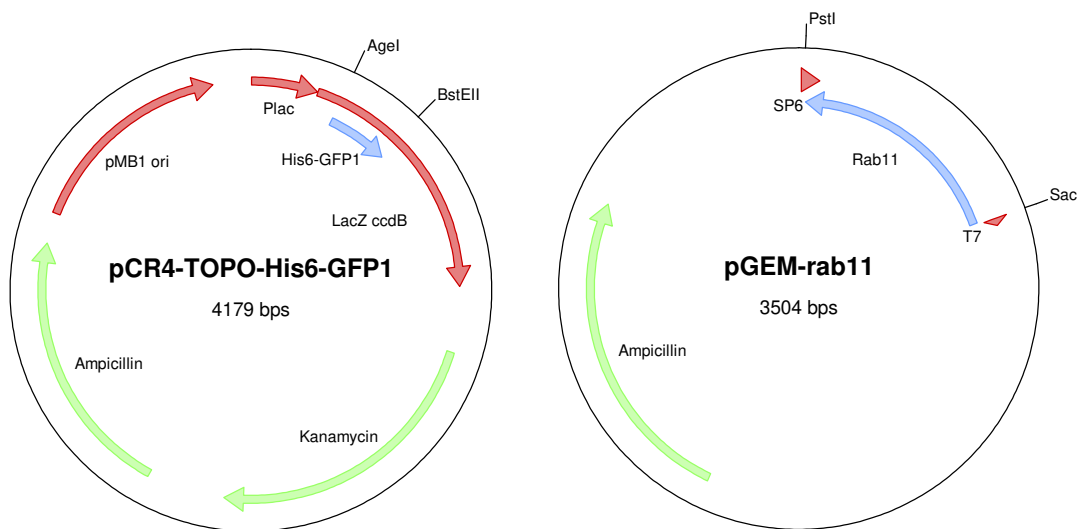
**Abbildung 2.1 Vektor pAcGFP-C2**

Dieser Vektor (Clontech) wurde als Klonierungsvektor verwendet. Er enthält die Resistenzgene für Kanamycin (Selektion der Bakterien) und Neomycin (Selektion der eukaryotischen Zellen) und das Gen für GFP. Mit den Restriktionsenzymen AgeI und BstEII wurde der His-tag, mit den Restriktionsenzymen SacI und PstI das Gen für Rab11 in den Vektor kloniert.

Dafür wurde zuerst das Gen für Rab11 mit den beiden Restriktionsenzymen SacI und PstI aus dem schon im Labor vorhandenen Vektor pGEM-rab11 (siehe Abbildung 2.2) geschnitten. Das ausgeschnittene DNA-Fragment wurde dann N-terminal in den Vektor pAcGFP-C2 kloniert.

Das DNA-Fragment für den His-tag befand sich in dem Vektor pCR4-TOPO-His<sub>6</sub>-GFP (siehe Abbildung 2.2). Dieser Vektor enthält Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin, welche zur Selektion von transformierten Bakterien dienen. Mit den beiden Restriktionsenzymen

AgeI und BstEII wurde die Sequenz aus dem Vektor ausgeschnitten und auch in den Vektor pAcGFP-C2-rab11 kloniert.



a

b

### Abbildung 2.2 a) Vektor pCR4-TOPO-His<sub>6</sub>-GFP

### b) Vektor pGEM-rab11

a). Der Vektor pCR4-TOPO-His<sub>6</sub>-GFP enthält die Sequenz für den His-tag (blau). Mit den Restriktionsenzymen AgeI und BstEII wurde das Fragment ausgeschnitten und in den Vektor pAcGFP-C2 kloniert. Dieser Vektor enthält Resistenzgene für Ampicillin und Kanamycin (grün). b) Aus dem Vektor pGEM-rab11 wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und SacI die Gensequenz für Rab11 (blau) ausgeschnitten. Der Vektor enthält ein Resistenzgen für Ampicillin (grün).

## 2.1.3 Schneiden der DNA mit Restriktionsenzymen

Zum Schneiden der Vektoren mit den Restriktionsenzymen wurden meist 0,5-1 µg DNA verwendet. In einem Gesamtvolumen von 50 µl wurde die DNA mit dem spezifischen Restriktionspuffer, dem Enzym, BSA und ddH<sub>2</sub>O gemischt und für 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei der Inkubation mit BstEII musste eine Temperatur von 60 °C eingestellt werden. Zum Schneiden der Vektoren wurden die beiden Restriktionsenzyme nicht in einem Reaktionsgemisch verwendet, sondern nacheinander eingesetzt. Hierbei ist nicht entscheidend, welches Enzym zuerst eingesetzt wird.

Die Restriktionsenzyme schneiden nur bei spezifischen Puffern mit einer Aktivität von 100 %. Aus diesem Grund wurde nach dem Schneiden mit dem ersten Enzym ein Pufferwechsel durchgeführt. Dieses wurde mit dem PCR Purification Kit von Qiagen nach angegebenem Protokoll durchgeführt. Die Zusammensetzung einer typischen Reaktion mit Restriktionsenzymen ist in Tabelle 2.1 dargestellt.

**Tabelle 2.1** Typische Reaktion mit Restriktionsenzymen in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$ 

Lösung	Konzentration	Volumen
DNA	0,2-0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1-5 $\mu\text{l}$
Restriktionsenzym	5-20 U/ $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
Puffer	10 x	5 $\mu\text{l}$
BSA	100 x	0,5 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	-	auffüllen auf 50 $\mu\text{l}$

### 2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird in der Molekularbiologie verwendet, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die DNA durch die Gelmatrix, wobei kleinere Fragmente die Matrix schneller passieren als größere Fragmente.

Die hier verwendeten Gele hatten eine Agarosekonzentration von 1 %. Hierfür wird die Agarose mit 0,5 x TBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlung auf etwa 60 °C mit Ethidiumbromid (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Agarose) versetzt. Das Ethidiumbromid lagert sich zwischen den Basen der DNA an, nach Anregung durch UV-Licht werden die DNA-Banden in dem Gel sichtbar (siehe Abbildung 3.2).

Die Agarose wird in eine Gelkammer gegossen, wo sie innerhalb von etwa 30 Minuten polymerisiert. Etwa 15-50  $\mu\text{l}$  Probe werden mit Ladepuffer versetzt, in die Probentaschen pipettiert und für 30-45 Minuten an eine Spannung von 80-100 V angelegt. Das Gel wird aus der Kammer entnommen und auf einen UV-Tisch (Wellenlänge = 312 nm) gelegt, um die DNA-Banden mit den Banden des Markers zu vergleichen. Als Marker wurden die 250 bp-DNA-Leiter und die GeneRuler DNA-Leiter Low Range verwendet.

Für weitere Klonierungsschritte müssen die aus dem Vektor geschnittenen DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wieder extrahiert werden. Dafür wird die gewünschte Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Da durch das UV-Licht Mutationen an der DNA auftreten können, darf das Gel nur kurze Zeit dem UV-Licht ausgesetzt sein. Ein möglichst kleines Stück des Gels wird dann in ein Mikroreaktionsgefäß eingewogen. Mit QG-Puffer wird die DNA aus dem Gel extrahiert und anschließend mit dem PCR Purification Kit

von Qiagen aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wird für weitere Klonierungsarbeiten verwendet, wofür die DNA-Konzentration bestimmt werden muss.

### **2.1.5 DNA-Konzentrationsbestimmung**

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Konzentrationsbestimmung der DNA angewandt. Die erste Methode dient nur zur Abschätzung der Konzentration und wird meist bei geringen Mengen an DNA benutzt. Die zweite Methode ist sehr quantitativ und wird meist bei größeren Mengen DNA verwendet.

Zur Bestimmung von geringeren Mengen DNA, meist nach einer Extraktion aus einem Agarosegel, werden unterschiedliche Volumina erneut auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.1.4). Mit Hilfe eines DNA-Konzentrationsstandards ( $\Phi$ X174 von Fermentas) lässt sich die DNA-Konzentration der Bande bestimmen.

Die Banden des Markers haben in Abhängigkeit von dem aufgetragenen Volumen eine definierte Menge an DNA. Zur Abschätzung der DNA-Konzentration wird die Helligkeit der Proben-Bande mit denen des Standards verglichen. Eine Bande des Standards, die eine vergleichbare Helligkeit mit der Bande der Probe hat, enthält eine definierte Menge an DNA, so kann die Menge an DNA in der Probe abgeschätzt werden.

Zur quantitativen Messung der DNA-Konzentration wird ein UV-Spektrophotometer verwendet, wobei die Konzentration durch Messung der optischen Dichte (OD) bestimmt wird. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, die OD wird ebenfalls bei 280 nm bestimmt, was dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm gibt eine Aussage über die Reinheit der DNA. Ein optimaler Wert liegt zwischen 1,8 und 2. Ist der Wert kleiner als 1,8 ist die DNA mit Proteinen verunreinigt, ist er größer als 2 mit RNA.

Die Messungen erfolgen in Quarzküvetten, da diese kein UV-Licht absorbieren. Die DNA-Probe wird in einer geeigneten Verdünnung angesetzt, um OD-Werte in einem Bereich von 0,1 bis 0,9 zu erhalten.



Die Konzentration an DNA wird mit folgender Formel berechnet:

$$OD_{260} = 1 \equiv 50 \mu\text{g} / \text{ml}$$

$$c_{DNA} [\mu\text{g} / \mu\text{l}] = OD_{260} \cdot \frac{50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{1000 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}}$$

### 2.1.6 Ligation der DNA-Fragmente mit dem Klonierungsvektor

Die Ligationen wird mit T4-DNA-Ligase (Fermentas) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wird etwa fünfmal mehr DNA-Fragment als Vektor eingesetzt. Da hierbei nicht die Menge entscheidend ist, sondern die Anzahl an Molekülen, wird die Menge an Fragment mit folgender Formel berechnet:

$$Masse_{\text{Fragment}} [\text{ng}] = 5 \cdot Masse_{\text{Vektor}} [\text{ng}] \cdot \frac{Länge_{\text{Fragment}} [\text{bp}]}{Länge_{\text{Vektor}} [\text{bp}]}$$

Für einen Ligationsansatz werden mindestens 50 ng Vektor verwendet. Das erforderliche Volumen wird mit dem DNA-Fragment, 10 x Ligasepuffer, der Ligase und ddH<sub>2</sub>O auf 20 μl aufgefüllt (siehe Tabelle 2.2) und 1-2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wird entweder direkt zur Transformation der Bakterien (*E. coli*) verwendet oder bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2.2** Typische Volumen bei der Ligation von Vektor und Fragment

Lösung	Konzentration	Volumen
Vektor DNA	50-100 ng/μl	1-10 μl
Fragment DNA	1-5 ng/μl	5-8 μl
Ligase	5 u/μl	0,5-1 μl
Ligationspuffer	10 x	2 μl
ddH <sub>2</sub> O	-	2-9 μl

### 2.1.7 Linearisierung des Klonierungsvektors

Die Aufnahme der DNA in die Zelle gelingt am besten bei cirkulärer DNA, da diese Konformation am leichtesten aufgenommen werden kann. Die Integration der DNA in das Genom der Zelle hat jedoch die höchste Effizienz bei linearisierter DNA. Aus diesem Grund werden die Zellen sowohl mit cirkulärer als auch mit linearer DNA transfiziert.

Für die Linearisierung des Vektors pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> wird dieser mit dem Restriktionsenzym PstI geschnitten. Anschließend wird der Ansatz mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt.

### 2.1.8 Transformation der kompetenten Bakterien

Kompetente Bakterien sind speziell behandelt, so dass sie in der Lage sind fremde DNA aufzunehmen. Für diese Arbeit wurden kompetente Bakterien des Stammes *E. coli* DH5- $\alpha$  verwendet, welche schon im Labor vorhanden waren.

Für die Transformation werden 200  $\mu$ l Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut. Auf die Bakterien werden 10  $\mu$ l Ligationsansatz ( $c \approx 1 \mu$ g) gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Hitzeschock für 90 Sekunden in einen Heizblock bei 42 °C durchgeführt, wodurch die Transformation gestoppt wird. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotika) werden die Bakterien für 45 Minuten bei 37 °C im Schüttelschrank inkubiert. In dieser Zeit können die Bakterien sich von der Transformation erholen und die Antibiotikaresistenzen ausbilden. Danach werden die Bakterien in drei verschiedenen Volumina auf Agar-Platten mit selektivem Medium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C oder über das Wochenende bei RT inkubiert. Die Volumina zum Ausplattieren sind 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l und eine aufkonzentrierte Lösung aus dem Rest (die restliche Bakterienlösung wird zentrifugiert, das Medium bis auf 100  $\mu$ l abgenommen und das Bakterienpellet darin resuspendiert).

### 2.1.9 Aufreinigung kleiner DNA-Mengen

Nach einer anscheinend positiven Transformation wird eine Einzelkolonie von einer Agar-Platte mit einer sterilen Impföse entnommen und in 10 ml selektives LB-Medium überführt. Dieses wird über Nacht bei 37 °C im Schüttelschrank inkubiert. Von der Übernachtskultur

werden 1,5 ml entnommen und für 10 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und es werden erneut 1,5 ml der Übernachtskultur zentrifugiert. Die Aufreinigung der DNA wird mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt. Dabei wird die Vektor-DNA aus den Bakterien isoliert und gereinigt.

Der Rest der Übernachtskultur wird zum Herstellen einer Glycerinkultur verwendet. Hierfür werden 850 µl Bakteriensuspension und 150 µl Glycerin (87 %) in einem Kryoröhrchen gemixt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Glycerinkulturen erfolgt bei -80 °C.

Um positive Klone zu identifizieren, wird die aufgereinigte Vektor-DNA wieder mit den schon verwendeten Restriktionsenzymen geschnitten, um Fragmente einer bekannten Größe zu erzeugen (Durchführung siehe 2.1.3). Die geschnittene DNA wird mit einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Bei positiven Klonen sind dann zwei deutliche Banden bei bekannter Größe erkennbar. Da zur Identifizierung mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten wird, war es notwendig nach dem ersten Enzym den Puffer zu wechseln. Diese Aufreinigung wird mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach angegebenem Protokoll durchgeführt.

### **2.1.10 Aufreinigung großer DNA-Mengen**

Für die spätere Verwendung der DNA zur Transfektion der eukaryotischen Zellen soll diese in hoher Konzentration vorliegen. Nach der Identifizierung von positiven Klonen (siehe 2.1.9) werden Bakterien aus den Glycerinkulturen auf Agarplatten mit den Antibiotika Kanamycin und/oder Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie wird mit einer sterilen Impföse entnommen und in 3 ml selektives LB-Medium mit den Antibiotika Kanamycin und/oder Ampicillin überführt. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C im Schüttelschrank wird die Bakterienkultur in 30 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelschrank inkubiert.

Von der Übernachtskultur werden 25 ml entnommen und mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit von Qiagen nach angegebenem Protokoll aufgereinigt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wird wie in 2.1.5 beschrieben bestimmt.

Da die DNA für den späteren Verwendungszweck steril sein muss, werden die letzten Aufreinigungsschritte unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank, sterilfiltrierte Lösungen) durchgeführt.

## 2.2 Zellkultur

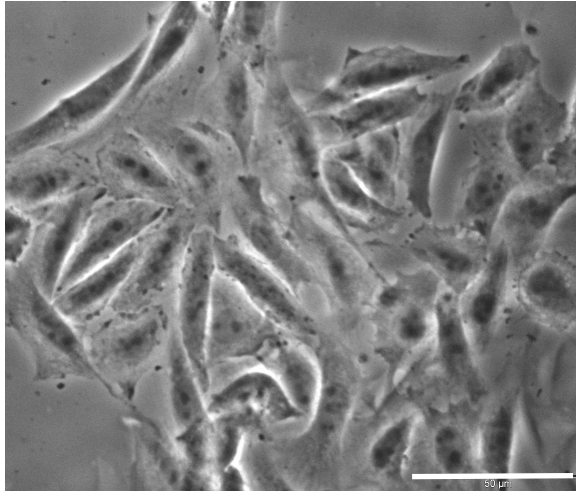
### 2.2.1 Material

- PBS<sup>-</sup> (0,8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g/l KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), autoklaviert
- Trypsin/EDTA (Biochrom AG)
- CHO Kultivierungsmedium
  - Ham's F12 Medium
  - 1 % 200 mM L-Glutamin
  - 1 % Streptomycin/Penicillin (10.000 Units)
  - 10 % fötales Kälberserum
- HeLa Kultivierungsmedium
  - ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert
  - 10 % 10x Dulbecco's MEM (4,5 g/l D-Glucose)
  - 1 % non-essential amino acids, 100x
  - 3 % 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>
  - 1 % 200 mM L-Glutamin
  - 1 % 100 mM Na-Pyruvat
  - 1 % Streptomycin/Penicillin (10.000 Units)
  - 10 % fötales Kälberserum
- DMSO
- Sterile Zellkulturgefäße
- Sterile Plastikpipetten

### 2.2.2 CHO-Zellen

Für diese Arbeit wurde die Zelllinie CHO-K1 (siehe Abbildung 2.3) von Prof. M. Zerial (Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden) verwendet. Diese

adhärent wachsende Zelllinie ist ein Subklon der CHO Zelllinie, die bei einer Biopsie von Ovarien eines erwachsenen Chinesischen Hamsters 1957 von T. T. Puck isoliert wurde.

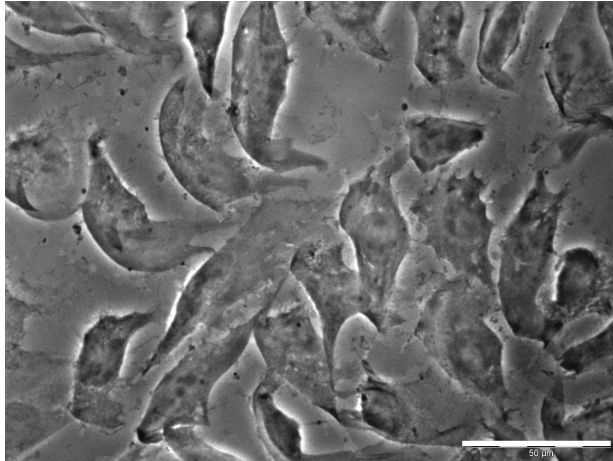


**Abbildung 2.3 Morphologie von CHO-Zellen 48 Stunden nach der Passagierung**

Die CHO-Zellen wurden in einer 24-well-Platte auf Deckgläschen kultiviert und unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet. 400-fache Vergrößerung. Balken = 50 μm.

### 2.2.3 HeLa-Zellen

Zusätzlich wurden auch HeLa-Zellen (siehe Abbildung 2.4) verwendet, die aus dem European Molecular Biology Laboratory (EMBL, Heidelberg) stammen. HeLa-Zellen gehören zu einer epithelartigen Zelllinie. Die Zellen, die 1951 aus einem Zervix-Karzinom einer 31-jährigen Patientin isoliert wurden, sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück.



**Abbildung 2.4 Morphologie von HeLa-Zellen 48 Stunden nach der Passagierung**

Die HeLa-Zellen wurden in einer 24-well-Platte auf Deckgläschen kultiviert und unter dem Durchlichtmikroskop betrachtet. 400-fache Vergrößerung. Balken = 50  $\mu\text{m}$ .

## 2.2.4 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen werden unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank) durchgeführt. Verwendet werden nur autoklavierte Glaswaren, sterile Medien und sterile Plastikwaren.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen sowie Multischalen in verschiedenen Größen in einem Brutschrank mit einer optimalen Temperatur von 37 °C und einen CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %.

Die beiden verwendeten Zelllinien, CHO und HeLa werden in den spezifischen Kulturmedien kultiviert (siehe 2.2.1).

## 2.2.5 Passagieren der Zellen

Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens findet keine Zellteilung mehr statt, die Zellen müssen passagiert werden, um weiterhin eine Zellteilung zu gewährleisten. Dafür werden die Zellen unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in ein neues überführt.

Alle 2-4 Tage wird hierfür das alte Kulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit angewärmten PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (37 °C) behandelt. Da in unterschiedlichen Kulturgefäßen gearbeitet wird, sind die verwendeten Volumina in Tabelle 2.3 angegeben. Die Kulturgefäße werden für 8-10 Minuten in den Brutschrank gestellt und zur Inaktivierung des Trypsins wird Medium (37 °C) dazugegeben. Die Zellen können nun in

einer geeigneten Verdünnung neu ausgesät werden. Nach der Ablösung der Zellen mit Trypsin, werden diese in dem angegebenen Volumen Medium aufgenommen, durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und in den angegebenen Verdünnungen neu ausgesät.

**Tabelle 2.3 Passagieren der verschiedenen Zellkulturgefäße, Angabe von Kulturgefäß und Volumen**

<b>Kulturgefäß</b>	<b>Kulturfläche [cm<sup>2</sup>]</b>	<b>Volumen Trypsin [µl]</b>	<b>Volumen Medium zur Inaktivierung [ml]</b>	<b>neu ausgesäte Verdünnung</b>
<b>75 cm<sup>2</sup>- Kulturflasche</b>	75	1000	10	1:10
<b>10 cm-(Ø) Kulturschale</b>	55	700	5	1:50
<b>35 mm- (Ø) Kulturschale</b>	8	100	2	1:50 – 1:200
<b>24-well-Platte (1 Vertiefung)</b>	1,9	30	1	1:5 – 1:10
<b>96-well-Platte (1 Vertiefung)</b>	0,3	10	0,2	keine

## 2.2.6 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Durch Kultivierung einer Zellkultur über einen längeren Zeitraum können differentielle Prozesse in den Zellen entstehen. Daher ist es sinnvoll Zellkulturen mit einer niedrigen Passage zu verwenden. Aus diesem Grund werden Aliquots einer Zelllinie über einen längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff gelagert.

Konfluent gewachsene Zellen in einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturschale werden zweimal mit 10 ml angewärmten PBS<sup>-</sup> gewaschen. Anschließend werden sie trypsinisiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml-Röhrchen überführt und 3 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 5 ml Einfriermedium (FKS + 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen zu je 1 ml eingefroren. Das Einfrieren geschieht schrittweise, 2 Stunden bei 4 °C, über Nacht bei -20 °C, über Nacht bei -80 °C und dann erfolgt eine Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wird das Kryoröhrchen direkt in einem Brutschrank (37 °C) gestellt und anschließend in eine Kulturflasche mit 20 ml Medium überführt. Nach ca. 4 Stunden haben sich die Zellen an den Boden angeheftet und das Medium kann gewechselt werden, um das für Zellen toxische DMSO zu entfernen.

## 2.3 Transfektion der eukaryotischen Zellen

### 2.3.1 Material

- PBS<sup>-</sup>
- Lipofectamine2000
- Fugene6
- Transfektionsmedium für CHO-Zellen
  - Ham's F12 Medium
  - 1 % 200 mM L-Glutamin
  - 10 % fötales Kälberserum
- Transfektionsmedium für HeLa-Zellen
  - ddH<sub>2</sub>O, autoklaviert
  - 10 % 10x Dulbecco's MEM (4,5 g/l D-Glucose)
  - 1 % non-essential amino acids, 100x
  - 3 % 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>
  - 1 % 200 mM L-Glutamin
  - 1 % 100 mM Na-Pyruvat
  - 10 % fötales Kälberserum
- OptiMEM I
- CHO Kultivierungsmedium
- HeLa Kultivierungsmedium
- Steriles ddH<sub>2</sub>O
- Vektor DNA, pAcGFP-C2
- Vektor DNA, pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub>



### 2.3.2 Transfektionsbedingungen

Um Effekte bei der Transfektion durch das Reagenz auszuschließen, werden bei jeder Transfektion eine Positiv- und eine Negativkontrolle durchgeführt. Als Positivkontrolle wird der Vektor pAcGFP-C2 verwendet, als Negativkontrolle steriles ddH<sub>2</sub>O. Die Positivkontrolle dient als Anzeige für die Transfektionseffizienz, eine ähnliche Anzahl an transfizierten Kolonien sollte auch bei dem Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> vorhanden sein. Bei einem signifikanten Unterschied der Kolonienanzahl lässt dies auf ein toxisches Genprodukt schließen. Die Zellen der Negativkontrolle sollen in Anwesenheit des Antibiotikums G418 innerhalb von 7-10 Tagen absterben.

Die Transfektion von CHO-Zellen und HeLa-Zellen erfolgt nach der gleichen Methode, jedoch werden die spezifischen Kultivierungs- und Transfektionsmedien verwendet.

### 2.3.3 Transfektion mit Lipofectamine2000

Für die Transfektion mit Lipofectamine2000 sollen die Zellen eine Konfluenz von 90-95 % haben. Hierfür werden sie 2-3 Tage vor der Transfektion mit Transfektionsmedium in einer Verdünnung von 1:200 in einer 24-well-Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 90 % werden die Zellen dreimal mit PBS<sup>-</sup> (37 °C) gewaschen. Das PBS<sup>-</sup> wird auf den Zellen belassen und die 24-well-Platte zurück in den Brutschrank gestellt.

Für die Transfektion mit Lipofectamine2000 wurden zwei verschiedene Verhältnisse von DNA (µg) zu Lipofectamine2000 (µl) gewählt. Ausgehend von dem Protokoll von Invitrogen wurden die Verhältnisse von 1:2,5 und 1:3 gewählt. Die Mengen an DNA und Lipofectamine2000 sind in Tabelle 2.4 dargestellt. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf eine Vertiefung einer 24-well-Platte.

**Tabelle 2.4** Transfektion mit Lipofectamine2000, benötigte Volumina für eine Vertiefung einer 24-well-Platte

Verhältnis	Menge DNA [µg]	Menge Lipofectamine2000 [µl]
1:2,5	0,8	2,0
1:3	1	3

Die benötigten Mengen an DNA und Lipofectamine2000 werden separat in einem Endvolumen von 50  $\mu\text{l}$  mit OptiMEM I angesetzt, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei RT inkubiert. Danach werden die 50  $\mu\text{l}$  Lipofectamine2000-OptiMEM I langsam in die DNA-Lösung gegeben und durch vorsichtiges anschnipsen gemischt. Diese Lösung wird für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Das PBS<sup>-</sup> wird von den Zellen abgezogen und jeweils 100  $\mu\text{l}$  der Lösung wird tropfenweise auf die Zellen gegeben. Um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern, werden zusätzlich 200  $\mu\text{l}$  Transfektionsmedium (37 °C) auf die Zellen gegeben. 4 Stunden nach der Transfektion wird das Transfektionsmedium abgezogen und 1 ml Kultivierungsmedium auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden bis zur weiteren Behandlung im Brutschrank kultiviert. 24-48 Stunden nach der Transfektion wird das Antibiotikum G418 in Konzentrationen zwischen 400 - 800  $\mu\text{g/ml}$  dazu gegeben.

### **2.3.4 Transfektion mit Fugene6**

Die Transfektion mit Fugene6 erfolgt bei einer Konfluenz der Zellen von 50-80 %. Dafür werden die Zellen zwei Tage vor der Transfektion in Transfektionsmedium in einer Verdünnung von 1:200 in eine 10 cm-Kulturschale ausgesät. Es wurden zwei verschiedene Verhältnisse von Fugene6 ( $\mu\text{l}$ ) zu DNA ( $\mu\text{g}$ ) getestet, um eine optimale Transfektionseffizienz zu ermitteln. Als geeignete Verhältnisse wurden anhand des Protokolls von Roche Applied Sciences die Werte 3:1 und 6:1 gewählt. Alle angegebenen Mengen beziehen sich auf eine 10 cm-Kulturschale.

In einem sterilen Reaktionsgefäß werden 582  $\mu\text{l}$  (Verhältnis 3:1), bzw. 564  $\mu\text{l}$  (Verhältnis 6:1) OptiMEM I vorgelegt. Direkt in das Medium werden 18  $\mu\text{l}$  (Verhältnis 3:1), bzw. 36  $\mu\text{l}$  (Verhältnis 6:1) Fugene6 gegeben, durch anschnipsen kurz gemischt und bei RT 5 Minuten inkubiert. Anschließend werden 6  $\mu\text{g}$  Vektor-DNA in die Lösung gegeben, durch anschnipsen kurz gemischt und bei RT für mindestens 15 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Transfektionslösung tropfenweise direkt auf die Zellen gegeben. Ein Wechsel des Mediums vorher ist nicht erforderlich. Durch vorsichtiges Schwenken der Schale wird die Lösung verteilt. Die Zellen werden im Brutschrank kultiviert. Das Medium wird erst bei der nächsten Passagierung gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt wird das Antibiotikum G418 ins Medium gegeben. In den meisten Fällen geschah dies nach 2-3 Tagen.

## 2.4 Selektion der stabil transfizierten Zellen

### 2.4.1 Material

- G418 (c = 50 µg/µl)
- Whatman Filterpapier, steril
- Trypsin/EDTA
- Sterile Pinzette
- Zellschaber (Costar)
- Pipettenspitzen
- sterile Deckgläschen (Ø 11 mm)

### 2.4.2 Das Antibiotikum G418

Das G418 ist toxisch für Bakterien, Hefen und tierische Zellen. Es ist jedoch in zu hohen Konzentrationen auch toxisch für resistente eukaryotische Zellen. Aus diesem Grund muss vor der Selektion ein optimaler Konzentrationsbereich des G418 gefunden werden.

Hierfür wird das G418 in verschiedenen Konzentrationen zu nicht transfizierten, und somit auch nicht resistenten CHO-Zellen gegeben. Als G418-Konzentrationen wurden 200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml, 700 µg/ml und 800 µg/ml gewählt. Zu den konfluenten Zellen in einer 24-well-Platte wird jeweils 1 ml Medium + G418 gegeben, bei jeder Konzentration 4 Vertiefungen. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt. Alle 2-3 Tage wird das Medium gewechselt, um die toten Zellen zu entfernen und die Konzentration an G418 konstant zu halten. Bei den Konzentrationen von 200 µg/ml und 400 µg/ml dauerte das Zellscheiden deutlich länger als bei den höheren Konzentrationen. Nach 7-10 Tagen waren bei den Konzentrationen ab 400 µg/ml alle Zellen tot, bei 200 µg/ml waren einige Kolonien noch am leben.

Für die Selektion der stabil transfizierten Zellen wurde ein optimaler G418-Konzentrationsbereich von 400 µg/ml bis 800 µg/ml gewählt.

Für HeLa-Zellen wurde kein optimaler Konzentrationsbereich bestimmt. Hier wurde anhand des Protokolls von Invitrogen eine Konzentration von 500 µg/ml gewählt.

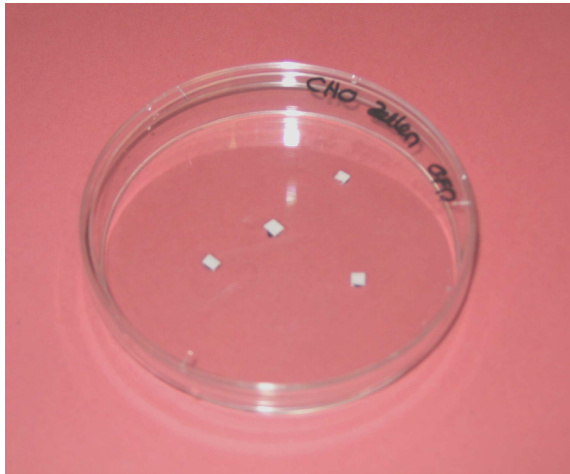
24-48 Stunden nach der Transfektion wird das Medium gewechselt und G418-haltiges Medium auf die Zellen gegeben. Am folgenden Tag wird erneut das Medium gewechselt. Ab diesem Zeitpunkt wird G418-haltiges Kultivierungsmedium verwendet. Die Konzentration des G418 ist gleich bleibend.

### **2.4.3 Isolierung von Zellkolonien mit Papierstückchen**

Die Isolierung von fluoreszierenden Zellkolonien erfolgt zunächst mit Hilfe von kleinen Filterpapierstücken. Diese werden in kleine, maximal 4 mm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und autoklaviert. Die benötigte Menge an Stücken wird in eine kleine Kulturschale gelegt und 1 ml Trypsin dazugegeben. Die Papierstücke können direkt auf Zellkolonien gelegt werden. Das Trypsin löst die Zellen vom Boden des Kulturgefäßes, und die Zellen bleiben am Papier haften.

Zur Isolierung von fluoreszierenden Zellkolonien werden die Zellen in 35 mm- oder 10 cm-Kulturschalen ausgesät. Bei einer Konfluenz von etwa 80 % werden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Hierfür muss der Deckel der Kulturschale abgenommen werden, so dass nicht unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden kann. Die Position von fluoreszierenden Kolonien wird am Boden der Kulturschale markiert. Der Deckel der Kulturschale wird wieder aufgelegt und es wird weiter unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Das Medium wird abgenommen und die Zellen werden zweimal mit PBS<sup>-</sup> (37 °C) gewaschen. Auf die markierten Stellen werden mit einer Pinzette die in Trypsin getränkten Papierstücke gelegt (siehe Abbildung 2.5). Die Kulturschale wird für 10 Minuten in den Brutschrank gestellt. Anschließend werden die Papierstücke vorsichtig mit der Pinzette entnommen und mit der Zelleite nach unten jeweils in eine Vertiefung einer 24-well-Platte gelegt.

Nach 1-4 Tagen werden die Papierstücke mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Medium genommen. Je nachdem wie viele Zellen an dem Papierstück haften geblieben sind, dauert es bis zu 7 Tage, bis einzelne Zellkolonien zu erkennen sind. Diese werden bis zur Konfluenz kultiviert und dann passagiert.



#### Abbildung 2.5 Papierstückchen in einer 10 cm-Kulturschale

Die transfizierten Zellen wurden 7 Tage kultiviert und dann am Boden die Position einer Kolonie markiert. Auf diese wurden in Trypsin getränkte Papierstückchen gelegt. Nach 10 Minuten wurden diese mit daran haftenden Zellen in neue Kulturschalen überführt.

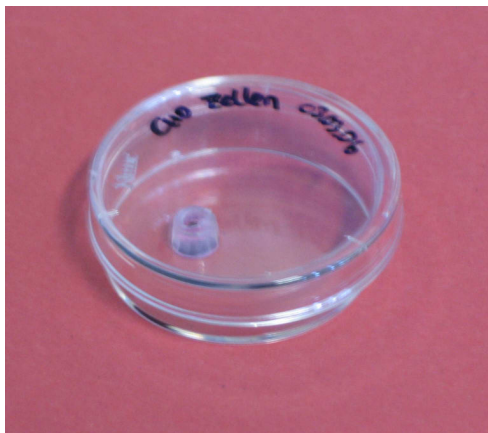
### 2.4.4 Isolierung von Zellkolonien mit Deckgläschen

In eine 10 cm-Kulturschale werden etwa 30 sterile Deckgläschen auf den Boden gelegt, so dass dieser nahezu komplett bedeckt ist. In einer Verdünnung von 1:500 werden die Zellen in 10 ml Medium in die Schale gegeben und einen Tag kultiviert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können Kolonien mit fluoreszierenden Zellen markiert werden. Das entsprechende Deckgläschen kann entnommen und in eine 35 mm-Kulturschale überführt werden. So soll das Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen erhöht werden.

### 2.4.5 Isolierung von Zellkolonien mit Klonierungszyklindern

Für die Isolierung von fluoreszierenden Zellkolonien werden auch Klonierungszyklinder verwendet (siehe Abbildung 2.6). Um die fluoreszierenden Zellen nicht durch das Trypsinieren zu stressen, sollen sie in der Schale weiter kultiviert werden. Dafür müssen aber alle anderen Zellen in der Schale entfernt werden. Die fluoreszierende Kolonie wird mit einem Klonierungszyklinder mit Medium vor dem Austrocknen geschützt, die übrigen Zellen in der Kulturschale sollen austrocknen. Als Klonierungszyklinder werden sterile Pipettenspitzen (0,5-10  $\mu$ l) verwendet. Der untere Teil der Spitze wird bis auf etwa 5 mm abgeschnitten.

In einer 10 cm- oder 35 mm-Kulturschale werden die Zellen über mehrere Tage bis zu einer Konfluenz von 50-70 % kultiviert. Eine fluoreszierende Kolonie wird unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und am Boden der Schale markiert. Das gesamte Medium wird abgezogen und auf die markierte Stelle der Zylinder gestellt. In den Zylinder wird etwa 50  $\mu$ l Medium gegeben, damit die Zellen nicht austrocknen. Die Schale wird vorsichtig in den Brutschrank gestellt, so dass der Zylinder nicht verrutscht. Nach etwa 4 Stunden wird der Zylinder mit einer Pinzette entnommen und Medium auf die gesamte Kulturschale gegeben.



**Abbildung 2.6 Klonierungszylinder in einer 35 mm-Kulturschale**

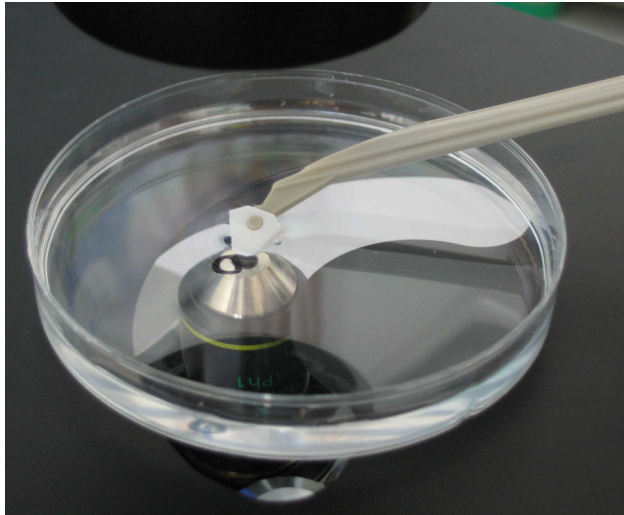
Die transfizierten Zellen wurden 7 Tage kultiviert, die Position einer fluoreszierenden Kolonie am Boden markiert und auf diese Position der Klonierungszylinder gestellt. Das Medium in der Kulturschale wurde abgezogen, was zum Austrocknen der Zellen führte. Nur in den Klonierungszylinder wurde Medium gegeben, um diese Zellen weiter in Kultur zu halten.

#### **2.4.6 Isolierung von Zellkolonien mit dem Zellschaber**

Die Zellen werden für 1-5 Tage in einer 10 cm- oder 35 mm-Kulturschale kultiviert, bis einzelne Zellkolonien mit fluoreszierenden Zellen eine Größe von mindestens 50 Zellen haben. Die Kolonien werden am Boden der Kulturschale markiert.

Der Kopf eines Zellschabers wird mit einer Schere auf ca. 5 mm Breite gekürzt. Das Medium in der Kulturschale wird abgezogen und die Zellen werden zweimal mit PBS<sup>-</sup> (37 °C) gewaschen, das PBS<sup>-</sup> verbleibt in der Schale. Mit dem Zellschaber wird dann vorsichtig die markierte Kolonie in einem Winkel von etwa 45° abgeschabt (siehe Abbildung 2.7). Der Kopf des Zellschabers wird in eine mit 2 ml Medium gefüllte 35 mm-Kulturschale leicht geschwenkt, so dass sich die Zellen wieder ablösen. Unter dem Mikroskop kann dabei beobachtet werden, ob alle Zellen abgelöst werden.

Nach einem Tag können dann kleine Kolonien in der 35 mm-Kulturschale beobachtet werden, dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, bis das Verhältnis von fluoreszierenden Zellen zu nicht fluoreszierenden Zellen etwa gleich ist.



**Abbildung 2.7** Mit einem Zellschaber wird eine Kolonie abgeschabt

Unter dem Durchlichtmikroskop wird eine Kolonie aus einer 10 cm-Kulturschale abgeschabt. Diese wurde zuvor unter dem Fluoreszenzmikroskop lokalisiert. Das Medium wurde entfernt und auf die Zellen wurde PBS<sup>-</sup> gegeben. Die Kolonie ist am Boden markiert.

### 2.4.7 Isolierung von Zellklonen durch Verdünnung

Die stabile Zelllinie muss aus einer einzelnen Zelle hervorgehen, damit die Zellen dieser Zelllinie alle die gleichen Eigenschaften besitzen. Nachdem eine positive Kolonie separiert werden konnte, werden die Zellen durch Verdünnung vereinzelt.

Wie in 2.4.6 beschrieben, werden die Zellen mit dem Zellschaber abgeschabt und in eine neue 35 mm-Kulturschale überführt. Nach 1-2 Tagen wird die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt, bei einer maximalen Zellzahl von 100 und einem Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen von etwa 75:25 werden sie vereinzelt. Zuerst werden sie zweimal mit PBS<sup>-</sup> (37 °C) gewaschen und trypsinisiert. Die Zellen werden in dem Volumen Medium aufgenommen, dass für eine Konzentration von 2,5 Zellen/ml benötigt wird. Je 200 µl Zellsuspension werden in eine Vertiefung einer 96-well-Platte gegeben. So erhält man rein rechnerisch eine Konzentration von 0,5 Zellen pro Vertiefung.

Nach 2-4 Stunden wird die 96-well-Platte unter dem Mikroskop betrachtet. Vertiefungen, die mehr als eine Zelle enthalten, werden markiert. Damit keine Verwechslungen entstehen können, wird das Medium in diesen Vertiefungen abgezogen.

Nach etwa 4 Tagen können einzelne kleine Kolonien in den Vertiefungen beobachtet werden. Das Medium wird je nach Bedarf nach etwa 7 Tagen das erste Mal gewechselt. Bei einer Konfluenz von 70-90 % werden die Zellen trypsiniert und in eine 35 mm-Kulturschale überführt. Dazu werden die Zellen zweimal mit 100 µl PBS<sup>-</sup> (37 °C) gewaschen und für 10 Minuten mit 10 µl Trypsin inkubiert. Die Zellen werden in 200 µl Medium aufgenommen und in eine mit 2 ml Medium gefüllte 35 mm-Kulturschale überführt. Am nächsten Tag können die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Da die Zellkolonien aus nur einer Zelle hervorgehen, gibt es entweder nur fluoreszierende, oder nur nicht fluoreszierende Zellen. Kulturschalen mit fluoreszierenden Zellen werden bis zur Konfluenz weiter kultiviert und dann in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen überführt. Nach etwa 3 Tagen werden die Zellen eingefroren (siehe 2.2.6).

## 2.5 Fluoreszenzmikroskopie

### 2.5.1 Material

- Sterile Deckgläschen (Ø 11 mm)
- PBS<sup>-</sup>
- 3 % Paraformaldehyd (in PBS<sup>-</sup>)
- Mowiol (Einbettungsmedium)
  - 6 g Glycerin
  - 2,49 g Mowiol
  - 6 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 12 ml 0,2 M Tris-HCl, pH = 8,5
- Antikörper
- 50 mM NH<sub>4</sub>Cl
- 0,1 % Triton X-100-Lösung in PBS<sup>-</sup>



- Pipes-Extraktionsmedium (pH 6,8)
  - 80 mM k-Pipes
  - 5 mM EGTA
  - 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- Saponin (Riedel)
- Fluoreszenzmikroskop Olympus BX41

## 2.5.2 Antikörper

**Tabelle 2.5**      **Verwendete primäre Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Produkt-Nummer	Datum
Rabbit polyclonal anti-Rab11, affinitäts-aufgereinigt	A.Bock	Fraktion 5	April 2005
Mouse monoclonal anti-Transferrin Rezeptor	WAK/Zymed	H68.4, No. 13-6800 Lot.: 90848237	Dezember 1999

**Tabelle 2.6**      **Verwendete sekundäre Antikörper**

Antikörper	Hersteller	Fluoreszenz	Absorption	Emission
FITC-konjugiertes Goat anti-rabbit IgG polyclonal	Dianova	grün	492 nm	520 nm
Cy3-konjugiertes Donkey anti-mouse IgG	Dianova	rot	550 nm	570 nm

## 2.5.3 Fixierung der Zellen

Für die Inkubation der Zellen mit Antikörpern (siehe 2.5.4) und für eine genaue Betrachtung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop werden diese auf kleinen Deckgläschen kultiviert und fixiert. Die Deckgläschen werden zuvor zwischen Filterpapieren in einem kleinen Glasgefäß autoklaviert.

Die Zellen werden 1-2 Tage vor der Fluoreszenzmikroskopie in einer Verdünnung von 1:100 auf Deckgläschen in einer 24-well-Platte ausgesät. Dann werden die Deckgläschen mit einer Pinzette vorsichtig in eine andere 24-well-Platte überführt und zweimal kurz mit jeweils 1 ml PBS<sup>-</sup> gewaschen. Das PBS<sup>-</sup> wird abgenommen und die Zellen in 1 ml 3 % Paraformaldehyd für 30 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wird wieder zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Die

Deckgläschen werden vorsichtig aus den Vertiefungen genommen und kurz in ddH<sub>2</sub>O eingetaucht, der Überschuss an Wasser wird mit einem Papiertuch entfernt. Auf einen Objektträger werden 5 µl Mowiol vorgelegt und das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten darin eingebettet. Der Objektträger wird für die anschließende Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop für 1 Stunde bei 37 °C, oder über Nacht bei RT getrocknet oder das Deckgläschen wird für weitere Schritte bei der Inkubation mit Antikörpern verwendet.

#### **2.5.4 Durchführung der Immunfluoreszenzanalyse**

Die Detektion von Proteinen innerhalb einer Zelle lässt sich mit Hilfe der Immunfluoreszenzanalyse durchführen. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoffe an Antikörper gebunden, welche sich wiederum an das Antigen anlagern, und durch das Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. Die hier angewandte indirekte Immunfluoreszenz läuft in 2 Schritten ab. In dem ersten Schritt bindet der primäre Antikörper spezifisch an ein Zielprotein, in dem zweiten Schritt bindet der sekundäre, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper spezifisch an den primären Antikörper. Der hier verwendete primäre Antikörper ist gegen das Protein Rab11 gerichtet, der sekundäre Antikörper ist FITC-markiert.

Alle angegebenen Inkubations- und Waschschrte erfolgen mit 1 ml der entsprechenden Lösung in einer 24-well-Platte. Mit Ausnahme der Einbettung in Mowiol befinden sich bei allen Schritten die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben orientiert.

CHO-Zellen werden in einer Verdünnung von 1:100 in 1 ml Kultivierungsmedium in eine 24-well-Platte auf Deckgläschen ausgesät und für 1-2 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Dann wird das Deckgläschen in eine neue Vertiefung einer 24-well-Platte überführt und zweimal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen um Medienrückstände zu entfernen. Die Fixierung der Zellen erfolgt bei RT in 1 ml 3 % Paraformaldehyd-Lösung für 30 Minuten. Um die Lösung vollständig zu entfernen werden die Zellen anschließend dreimal für 5 Minuten mit jeweils 1 ml PBS<sup>-</sup> gewaschen. Um unerwünschte Reaktionen freier Aldehydgruppen des Paraformaldehyds mit freien Aminogruppen der Antikörper zu vermeiden, werden sie für 30 Minuten bei RT in 50 mM NH<sub>4</sub>Cl geschwenkt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS<sup>-</sup> für 5 Minuten erfolgt durch vierminütige Inkubation mit 0,1 % Triton X-100-Lösung in PBS<sup>-</sup> die Permeabilisierung. Das Detergenz Triton führt zur Solubilisierung der Plasmamembran und der Orga-

nellen damit der Antikörper Zugang zum Antigen bekommt. Anschließend werden die Zellen zweimal für 5 Minuten mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, um die Deckgläschen leichter aus der Vertiefung zu entfernen, wird etwas PBS<sup>-</sup> in der Vertiefung belassen.

Für die Antikörperanlagerung wird eine Plastikbox mit angefeuchtetem Filterpapier ausgelegt und mit Parafilm bedeckt, dies soll ein Austrocknen der Zellen auf den Deckgläschen verhindern. Die Deckgläschen werden auf das Parafilm gelegt und mit 25 µl des ersten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in PBS<sup>-</sup> und 5 % FKS bedeckt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei RT werden die Deckgläschen zurück in die Vertiefung der 24-well-Platte überführt. Dann werden sie dreimal für 5 Minuten mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Diese Inkubation mit dem fluoreszenzmarkiertem zweiten Antikörper erfolgt nach der gleichen Methode wie die mit dem ersten Antikörper. Hiernach werden die Zellen erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und auf einem Objektträger mit Mowiol fixiert (siehe 2.5.3).

### **2.5.5 Permeabilisierung der Zellmembran mit Saponin und anschließende Immunfluoreszenzanalyse**

Das Detergenz Saponin bildet Komplexe innerhalb der Zellmembran von eukaryotischen Zellen, wodurch Poren in der Membran entstehen. Dadurch können cytosolische Proteine durch die Poren in der Membran entweichen. Membrangebundene Proteine, wie das Rab11 bleiben auf den Zellorganellen und lassen sich spezifisch nachweisen.

Für die Behandlung mit Saponin werden stabil transfizierte Zellen ein bis zwei Tage auf Deckgläschen in einer 24-well Platte kultiviert. Das Deckgläschen wird aus der Kulturplatte entnommen und in eine Vertiefung einer neuen 24-well-Platte überführt, da die weiteren Schritte nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden. Um Medienbestandteile zu entfernen werden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS<sup>-</sup> (4 °C) gewaschen. Zur Permeabilisierung werden die Zellen für 4 Minuten mit 1 ml 0,05 % Saponin (4 °C) in Pipes-Extraktionsmedium versetzt. Anschließend werden sie erneut zweimal mit je 1 ml PBS<sup>-</sup> (RT) gewaschen und für 30 Minuten mit 3 % Paraformaldehyd bei RT fixiert (siehe 2.5.3).

Nach der Protein-Extraktion und Fixierung der Zellen erfolgt wie unter 2.5.4 beschrieben die Immunfluoreszenzanalyse. Eine Behandlung der Zellen mit Triton ist hierbei jedoch nicht notwendig, da eine Permeabilisierung der Zellmembran durch das Saponin bereits durchgeführt wurde. Als Antikörper werden der Anti-Transferrin-Rezeptor und der Cy3-markierte sekundäre Antikörper jeweils in einer Verdünnung von 1:500 verwendet. Die Verdünnung der Antikörper erfolgt hierbei in PBS/10 % FKS und zusätzlich in 0,05 % Saponin.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Herstellung des Vektors pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub>

#### 3.1.1 Klonierungsstrategie

Der Vektor pAcGFP-C2 von der Firma Clontech ist laut Hersteller sehr gut zur Etablierung einer stabilen Zelllinie geeignet. Er besitzt ein Resistenzgen für Neomycin, so dass stabil transfizierte eukaryotische Zellen mit dem Antibiotikum G418 selektiert werden können. Es wurde gezeigt, dass mit dem Vektor pEGFP-C2 von der Firma Clontech stabile Zelllinien etabliert werden konnten (Lapierre et al, 2001). Dieser Vektor ist allerdings nicht mehr erhältlich. Der Unterschied zwischen den Vektoren pAcGFP-C2 und pEGFP-C2 besteht lediglich in dem Gen für das GFP. Das AcGFP ist zu 94 % homolog zu dem EGFP. Ein Vorteil des AcGFP gegenüber dem EGFP ist die niedrigere Dimerisierungsneigung.

Aufgrund der häufigen Verwendung des Vektors pEGFP von der Firma Clontech (Nielsen et al., 1999; Sönnichsen et al., 2000 and Savina et al., 2002) wurde für diese Arbeit der weiterentwickelte Vektor pAcGFP verwendet.

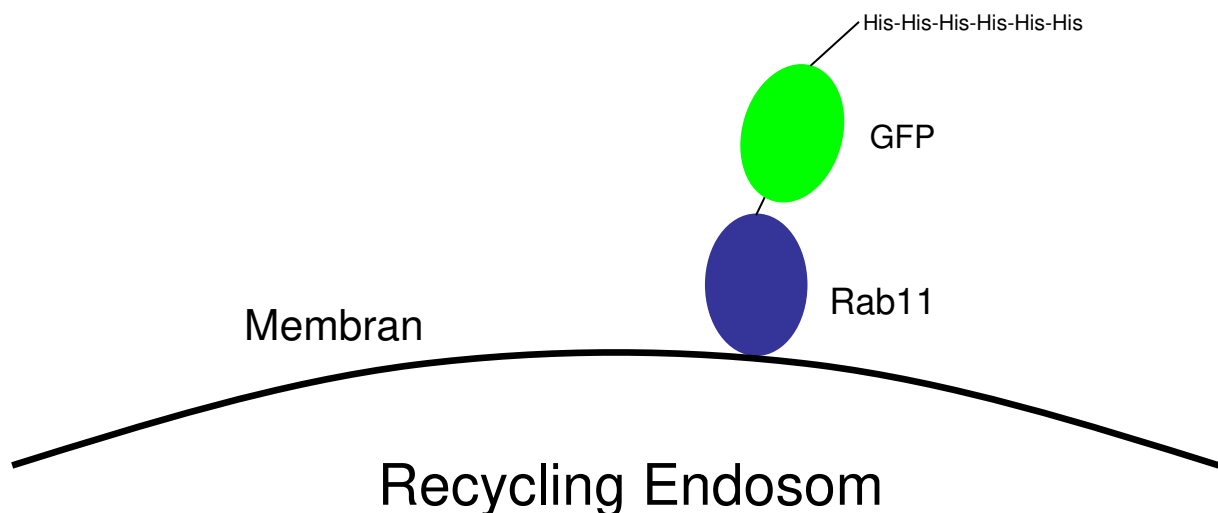
In den Vektor pAcGFP-C2 wurden das Gen für Rab11 und der His-tag an das GFP kloniert. Das Fusionsprotein Rab11 lagert sich spezifisch an die Membranoberflächen von Zellorganellen an. Das GFP sendet spontan eine Fluoreszenz, so dass transfizierte Zellen beobachtet werden können. Der His-tag dient als Haken, um auf diese Weise die gesamte Organelle aus dem Zelllysate zu isolieren. Das GFP dient zusätzlich noch als Abstandhalter zwischen dem Rab11 und dem His-tag. Diese nur 18 bp große Sequenz muss für die Aufreinigung der Zellorganellen für die Proteom-Analyse frei liegen und ist deshalb nicht direkt an das Rab11 gekoppelt. Im optimalen Fall bindet das His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 spezifisch an das Recycling Endosom, ist funktionell aktiv, das GFP sendet eine Fluoreszenz und der His-tag liegt frei, so dass die gesamte Zellorganelle isoliert werden kann (siehe Abbildung 3.1).

Das Gen für Rab11 wurde N-terminal an das C-terminale Ende des GFP kloniert, damit die Lokalisierungssequenz, die am C-terminalen Ende des Rab-Proteins liegt, nicht maskiert wird. Der His-tag wurde an das N-terminale Ende des GFP kloniert. Dieser wurde jedoch außerhalb von der MCS kloniert, da sich innerhalb der MCS keine geeigneten Schnittstellen befanden. Die geeigneten Schnittstellen befanden sich in dem Gen für GFP. Beim Schneiden des Vek-

tors mit den beiden Restriktionsenzymen wurden somit einige Basen des GFP entfernt. Aus diesem Grund musste die Sequenz für den His-tag noch zusätzlich einige Basen des GFP enthalten. Die Sequenz für den His-tag und die zusätzlichen Basen des GFP wurde von der Firma Entelechon synthetisiert. Die 223 bp große Sequenz wurde in den Vektor pCR4-TOPO (In-vitrogen) kloniert.

### Sequenz His<sub>6</sub>-GFP

	His <sub>6</sub>
1	ACCGGTCGCCACCATGCATCACCATCACCATCACATGGTGAGCAAGGGCG
51	CCGAGCTGTTCACCGGCATCGTGCCCATCCTGATCGAGCTGAATGGCGATG
102	TGAATGGCCACAAGTTCAGCGTGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
152	TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCTGTG
203	CCCTGGCCCACCCTGGTGACC



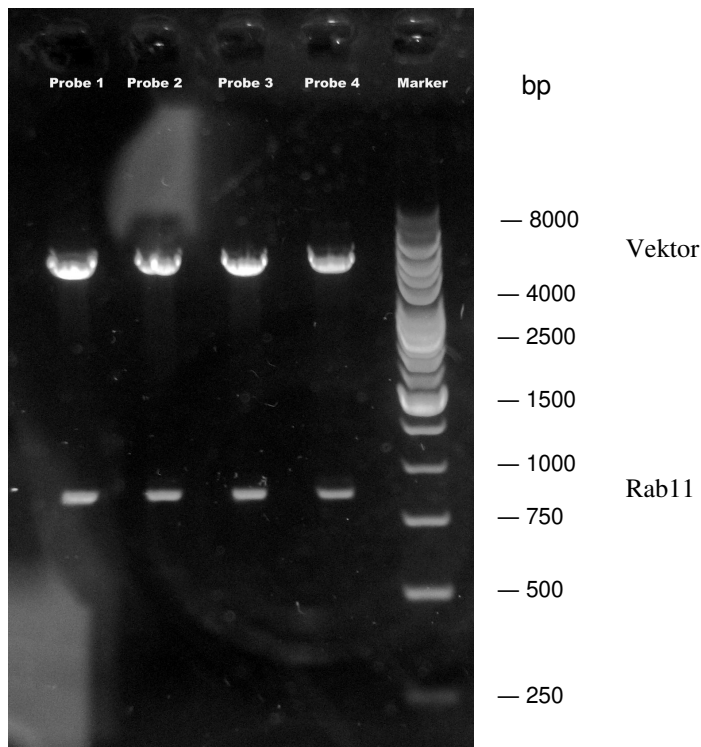
#### **Abbildung 3.1 Vorstellung von der Lokalisation des Fusionsproteins auf dem Recycling Endosom**

Das Fusionsprotein His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 auf der Membran des Recycling Endosoms. Das Protein Rab11 ist durch die gekoppelten Proteine nicht in seiner Funktion gestört, das GFP dient zusätzlich als Abstandhalter zwischen dem Rab11 und dem His-tag. Dieser ist im Verhältnis zu den anderen Proteinen nur sehr klein, kann aber als Haken dennoch gut erreicht werden.

### 3.1.2 Klonierung von Rab11 und His<sub>6</sub> in den Vektor pAcGFP-C2

Das Gen für Rab11 und die Sequenz für den His-tag befanden sich in den Vektoren pGEM bzw. pCR4-TOPO. Als erstes wurde das Gen für Rab11 mit den Restriktionsenzymen SacI und PstI aus dem Vektor pGEM-rab11 (siehe Abbildung 2.2) geschnitten. Da diese Enzyme mit unterschiedlichen Puffern eingesetzt wurden, konnten sie nur nacheinander verwendet werden. Zunächst wurde mit dem Enzym SacI geschnitten, wodurch der Vektor linearisiert wurde. Nach einer Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit von Qiagen wurde der linearisierte Vektor mit dem Restriktionsenzym PstI geschnitten. In dem Reaktionsgemisch befanden sich nun das gewünschte DNA-Fragment sowie der linearisierte Vektor. Zur Aufreinigung des Fragmentes wurden das Reaktionsgemisch und eine 250 bp-DNA-Leiter auf ein Agarosegel aufgetragen. Hierbei waren zwei Banden erkennbar, eine Bande mit einer Größe von etwa 2800 bp konnte als linearisierter Vektor, die andere Bande mit einer Größe von etwa 700 bp als Rab11 identifiziert werden. So konnte das Rab11 aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend in den Vektor pAcGFP-C2 kloniert werden. Zur Erzeugung von geeigneten Schnittstellen in diesem Vektor, wurde er mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und mit dem ausgeschnittenen Rab11 ligiert.

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Ligation wurde der Vektor erneut mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten. So entstanden zwei DNA-Fragmente mit bekannten Größen, Rab11 mit 700 bp und der linearisierte Vektor pAcGFP-C2 mit 4700 bp (siehe Abbildung 3.2). Es wurden 4 verschiedene Proben aufgetragen um die Ligation zu überprüfen. Aufgrund der beiden Banden mit den richtigen Größen konnte von einer erfolgreichen Klonierung des Rab11 in den Vektor pAcGFP-C2 ausgegangen werden.

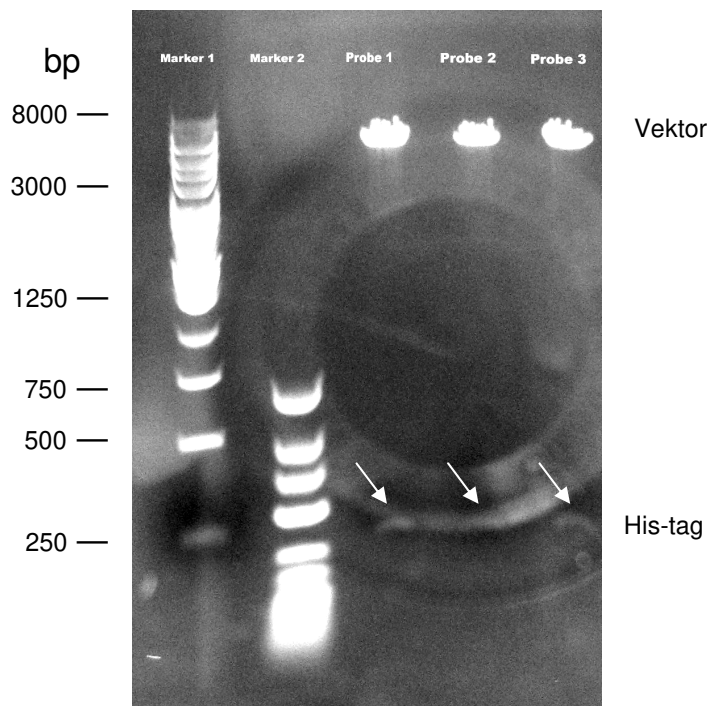


**Abbildung 3.2 Überprüfung einer erfolgreiche Ligation mit Hilfe eines Agarosegels**

Ein 1 % Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Bei Probe 1-4 wurde der Vektor pAcGFP-C2-rab11 aufgetragen, welcher mit den Restriktionsenzymen SacI und PstI geschnitten wurde, um die korrekte Klonierung zu überprüfen. Als Marker wurde eine 250 bp-DNA-Leiter verwendet. Das ausgeschnittene Rab11-Fragment ist bei einer Größe von etwa 800 bp, der linearisierte Vektor pAc-GFP-C2 bei einer Größe von etwa 5000 erkennbar.

Nach der Klonierung von Rab11 wurde der His-tag ebenfalls in den Klonierungsvektor eingebaut. Mit den Restriktionsenzymen AgeI und BstEII wurde der His-tag aus dem Vektor pCR4-TOPO-His<sub>6</sub>-GFP (siehe Abbildung 2.2) geschnitten. Da auch diese beiden Enzyme nur bei unterschiedlichen Puffern schneiden, mussten sie ebenfalls nacheinander verwendet werden. Zunächst wurde mit dem Enzym AgeI geschnitten, das Reaktionsgemisch aufgereinigt und dann mit dem Enzym BstEII geschnitten. Das Reaktionsgemisch, die GeneRuler DNA-Leiter Low Range und die 250 bp-DNA-Leiter wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, um das ausgeschnittene DNA-Fragment zu isolieren. Auch hier wurden mehrere Proben getestet und auf das Gel aufgetragen. Man erhielt eine Bande des His-tag bei 250 bp und eine Bande des linearisierten Vektors bei 4000 bp. Die Bande des His-tag war hierbei nur sehr schwach zu erkennen, was auf eine geringe DNA-Konzentration schließen lässt (siehe Abbildung 3.3)

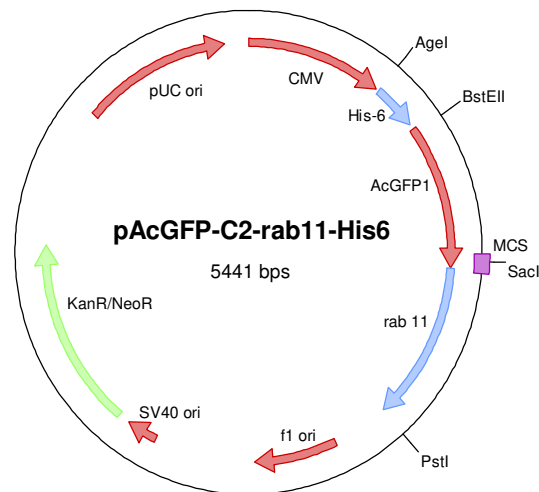




**Abbildung 3.3 Isolierung des His-tags mit Hilfe eines Agarosegels**

Ein 1 % Agarosegel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Als Marker 1 wurde eine 250 bp-DNA-Leiter aufgetragen, als Marker 2 die GeneRuler DNA-Leiter Low Range. Bei Probe 1-3 handelt es sich um den Vektor pCR4-TOPO-His<sub>6</sub>-GFP, der mit den Restriktionsenzymen AgeI und BstEII geschnitten wurde. Die Banden des His-tag bei einer Größe von 250 bp sind nur schwach zu erkennen und mit einem Pfeil markiert.

Die DNA des His-tag wurde aus dem Gel ausgeschnitten, aufgereinigt und zur Ligation eingesetzt. Hierfür wurde der Vektor pAcGFP-C2-rab11 mit den Restriktionsenzymen AgeI und BstEII geschnitten, um passende Schnittstellen zu erzeugen. Um eine erfolgreiche Ligation zu überprüfen, wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen AgeI und PstI geschnitten. Damit wurde das DNA-Fragment His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 mit einer Größe von 1700 bp aus dem Vektor ausgeschnitten. Nach der Auftragung auf ein Agarosegel waren zwei deutliche Banden bei den erwarteten Größen erkennbar (nicht abgebildet). Somit konnte von einer korrekten Klonierung ausgegangen werden, und der Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> (siehe Abbildung 3.4) für die Transfektion der eukaryotischen Zellen verwendet werden.



**Abbildung 3.4** Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub>

In den Vektor pAcGFP-C2 wurde mit den Restriktionsenzymen AgeI und BstEII der His-tag (blau) kloniert. Mit den Restriktionsenzymen SacI und PstI wurde das Gen für Rab11 (blau) kloniert. Der Vektor enthält Resistenzgene für Kanamycin und Neomycin (grün).

## 3.2 Optimierung der Transfektion

### 3.2.1 Unterschiede der Vektoren pAcGFP-C2 und pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub>

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von zwei verschiedenen Zelllinien. Eine sollte den Vektor pAcGFP-C2 enthalten, die andere den Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub>. In den Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> wurden zunächst die Gene für Rab11 und den His-tag kloniert (siehe 3.1.2). Für die Transfektion der eukaryotischen Zellen mit den Vektoren wurden dieser zuvor in Bakterien transformiert um die Vektor-DNA zu vermehren. Wie unter 2.1.10 beschrieben wurde die DNA anschließend aufgereinigt und zur Transfektion eingesetzt.

Die Transfektion erfolgte parallel mit beiden Vektoren. Der Vektor pAcGFP-C2 diente als Referenz für die Aufreinigung der Zellorganellen, für den Vergleich der Genexpression beider Vektoren und für die Transfektionseffizienz, da dieser nicht durch Klonierungsschritte verändert wurde. Aus diesem Grunde wurden alle Transfektionen mit beiden Vektoren unter gleichen Bedingungen und zeitgleich durchgeführt. Die Transfektionseffizienz bei dem Vektor pAcGFP-C2 war ein wenig höher als bei dem Vektor mit den zusätzlichen Genen. Die Anzahl an fluoreszierenden Zellen war hier um etwa 10-20 % größer, so dass die Isolierung von Zell-

kolonien leichter durchgeführt werden konnte. Bei der Kultivierung der Zellen, der Isolierung von Zellkolonien und der Entwicklung einer stabilen Zelllinie zeigten sich keine Unterschiede bei den beiden Vektoren.

### **3.2.2 Transfektion von CHO- und HeLa-Zellen**

Für die Etablierung einer stabilen Zelllinie mussten zunächst die optimalen Transfektionsbedingungen ermittelt werden. Zu denen zählen eine geeignete Zelllinie, ein Transfektionsreagenz und optimale Bedingungen bei der Kultivierung der Zellen.

#### Grundbedingungen

Als Zelllinie wurden CHO-Zellen gewählt und als Transfektionsreagenz wurde zunächst Lipofectamine2000 verwendet. Die Transfektion erfolgte in 24-well-Platten. Wie in 2.3.3 beschrieben wurden die CHO-Zellen transfiziert. Bei jeder Transfektion wurde eine Negativkontrolle (nur mit H<sub>2</sub>O transfiziert, ohne DNA) durchgeführt, in einer Vertiefung wurden für die spätere Fluoreszenzmikroskopie zusätzlich Zellen auf einem Deckgläschen ausgesät und transfiziert.

#### Verhältnis von Lipofectamine2000

Es wurden zwei verschiedene Verhältnisse von DNA ( $\mu\text{g}$ ) zu Lipofectamine2000 ( $\mu\text{l}$ ) getestet, 1:2,5 und 1:3. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Transfektionseffizienz festgestellt werden. Aufgrund der etwas höheren Menge an DNA wurde später ausschließlich das Verhältnis von 1:3 benutzt.

#### G418-Konzentration

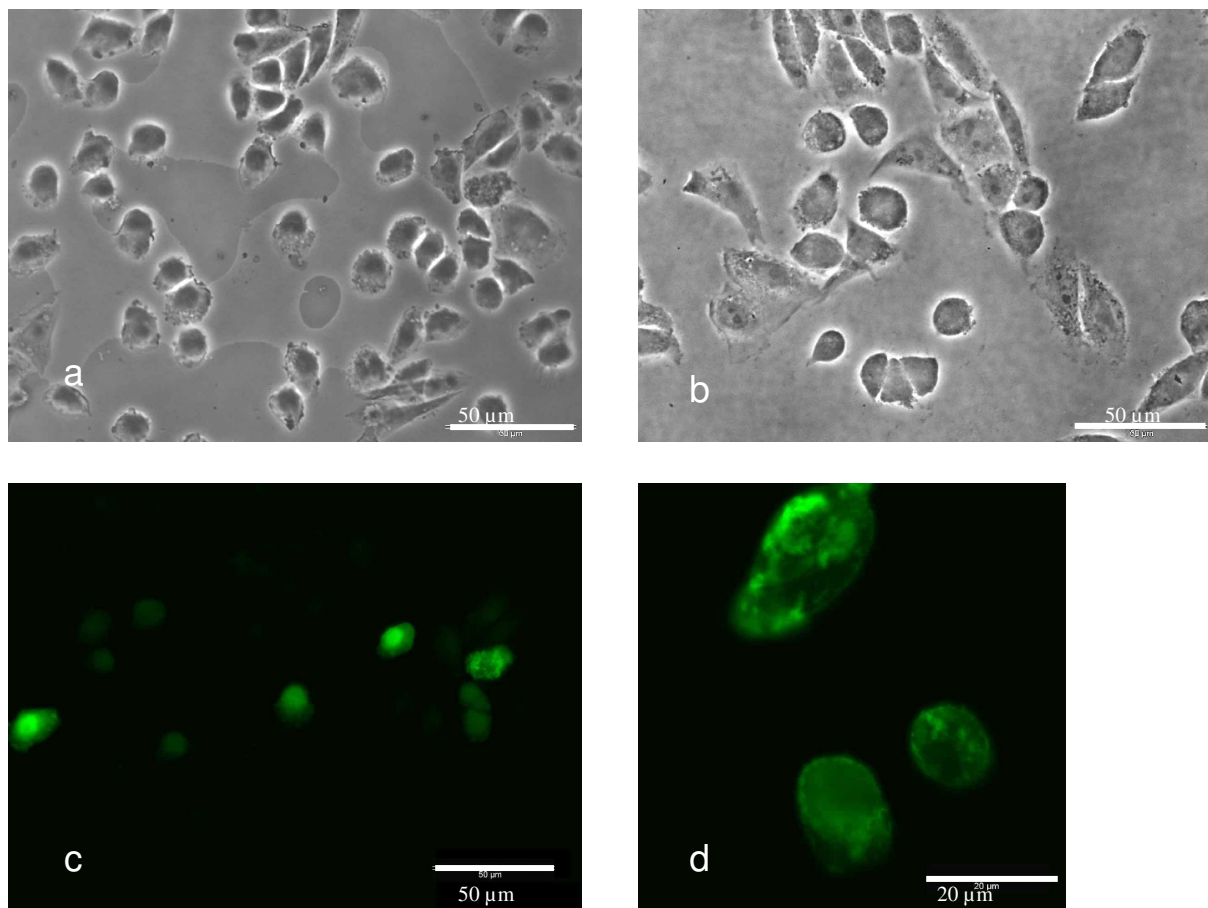
Einen Tag nach der Transfektion wurde zur Selektion der transfizierten Zellen das G418 in Konzentrationen von 400, 500, 600 oder 800  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben.

Bei den Konzentrationen von 400 und 500  $\mu\text{g/ml}$  waren die Zellen der Negativkontrolle nach etwa 10 Tagen tot, wobei in den ersten Tagen nur wenige Zellen gestorben sind. Bei einer Konzentration von 800  $\mu\text{g/ml}$  G418 waren die Zellen der Negativkontrolle schon nach etwa 5-7 Tagen tot, wobei alle Zellen in den ersten Tagen keine gute Morphologie aufwiesen. Als die optimale G418-Konzentration wurde 600  $\mu\text{g/ml}$  gewählt, hierbei waren die Zellen der

Negativkontrolle im Schnitt nach 7-10 Tagen tot und resistente Zellen zeigten eine gute Morphologie.

### Kultivierungsbedingungen

Die Transfektion mit Lipofectamine2000 erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 90 %. Am zweiten Tag nach der Transfektion waren etwa 20-50 % der Zellen abgestorben oder schon abgerundet. Die auf den Deckgläschen gewachsenen Zellen konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Hierbei zeigte sich, dass viele stark fluoreszierende Zellen eine veränderte Morphologie hatten (siehe Abbildung 3.5). Nach drei bis vier Tagen hatten sich die Zellen von der Transfektion und der G418-Zugabe erholt und zeigten eine gute Morphologie.

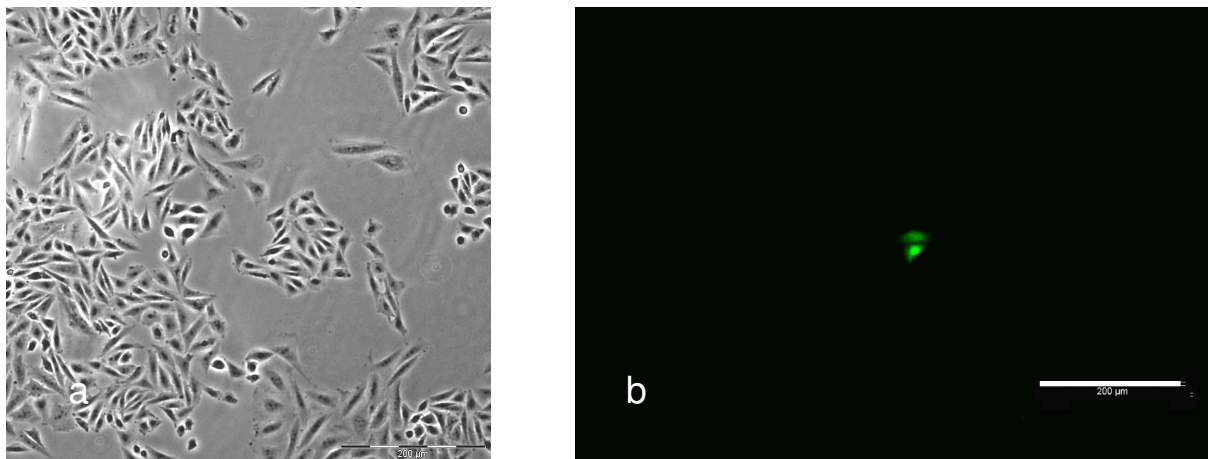


**Abbildung 3.5** CHO-Zellen 1-2 Tage nach der Transfektion mit Lipofectamine2000

a), c), d) CHO-Zellen wurden mit dem Vektor pAcGFP-C2 transfiziert und 2 Tage auf Deckgläschen kultiviert. b) CHO-Zellen wurden mit dem Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> transfiziert und einen Tag auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen weisen eine schlechte Morphologie nach der Transfektion auf und sind stark abgerundet. a) und b) Durchlichtmikroskopie. c) und d) Fluoreszenzmikroskopie. a-c) 400-fache Vergrößerung, d) 1000-fache Vergrößerung.

Nach 6 bis 9 Tagen erreichten die Zellen wieder eine Konfluenz von 90 % und wurden in einer Verdünnung von 1:5 in eine neue Vertiefung einer 24-well-Platte passagiert.

Zu diesem Zeitpunkt gab es jedoch nur wenige fluoreszierenden Zellen, der größte Teil der Zellen zeigte keine Fluoreszenz mehr, war aber scheinbar trotzdem resistent gegen das G418 (siehe Abbildung 3.6). Der Anteil an fluoreszierenden Zellen gegenüber nicht fluoreszierenden Zellen sank von etwa 10 % in den ersten Tagen auf Werte kleiner als 1 %. Obwohl alle Kontrollen nach 10 Tagen spätestens abgestorben waren, blieben weiterhin nicht fluoreszierende Zellen in Kultur.



**Abbildung 3.6 CHO-Zellen 7 Tage nach der Transfektion mit Lipofectamine2000**

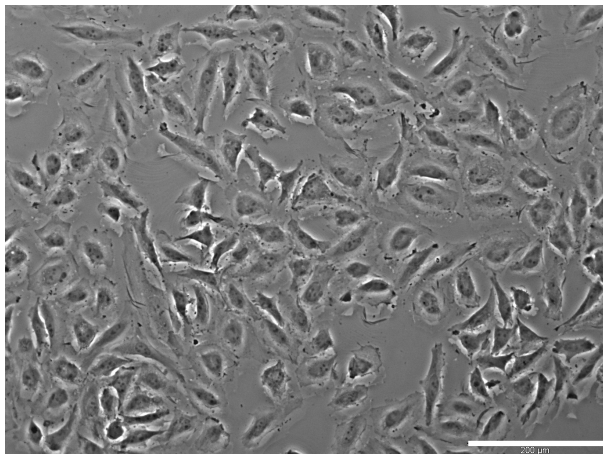
a), b) CHO-Zellen wurden mit dem Vektor pAcGFP-C2 transfiziert und 7 Tage auf Deckgläsern kultiviert. Die Morphologie der Zellen ist wieder normal und die Zelldichte liegt bei etwa 80 %. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen ist nur sehr gering (siehe b). a) Durchlichtmikroskop. b) Fluoreszenzmikroskop. 100-fache Vergrößerung. Balken = 200 µm

Alle zwei bis drei Tage waren die Zellen in den Vertiefungen konfluent gewachsen und mussten passagiert werden. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen nahm immer mehr ab, so dass nach etwa 4 Wochen keine mehr vorhanden waren.

### HeLa-Zellen

Aufgrund des Auftretens von vielen nicht fluoreszierenden, aber G418-resistenten CHO-Zellen, wurde eine weitere Zelllinie verwendet. Hiermit sollte geprüft werden, ob diese Tatsache an der verwendeten Zelllinie lag. Aus diesem Grunde wurden für die Transfektion ebenfalls HeLa-Zellen benutzt.

Diese wurden genau wie die CHO-Zellen mit Lipofectamine2000 transfiziert (siehe 2.3.3). Die HeLa-Zellen zeigten jedoch von Beginn an eine sehr schlechte Morphologie und Zellteilung. Am ersten Tag nach der Transfektion waren etwa 50 % der Zellen abgestorben oder abgerundet, eine Verdünnung der Zellen wurde somit nicht durchgeführt. Aufgrund der schlechten Morphologie wurde das G418 erst zwei Tage nach der Transfektion in einer Konzentration von 500 µg/ml dazu gegeben. Erst nach 2 Wochen hatten sich die Zellen erholt und waren konfluent gewachsen und wurden daraufhin passagiert (siehe Abbildung 3.7). Dabei wurden die Zellen auch auf Deckgläschen ausgesät und konnten so unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Morphologie der Zellen war sehr gut, jedoch gab es keine fluoreszierenden Zellen. Wie bei den CHO-Zellen waren resistente nicht fluoreszierende Zellen vorhanden, deren Anteil lag bei den HeLa-Zellen bei 100 % (nicht abgebildet).



**Abbildung 3.7 HeLa-Zellen 2 Wochen nach der Transfektion mit Lipofectamine2000**

Die Zellen wurden 2 Tage auf Deckgläschen kultiviert. Die Morphologie der Zellen ist gut, jedoch gibt es keine fluoreszierenden Zellen (nicht gezeigt). Durchlichtmikroskopie. 100-fache Vergrößerung. Balken = 200 µm.

Aufgrund der erfolglosen Transfektion und schwereren Kultivierung von HeLa-Zellen, wurde wieder mit CHO-Zellen gearbeitet und mit diesen die Transfektionsbedingungen optimiert.

### 3.2.3 Vergleich der Transfektionsreagenzien Lipofectamine2000 und Fugene6

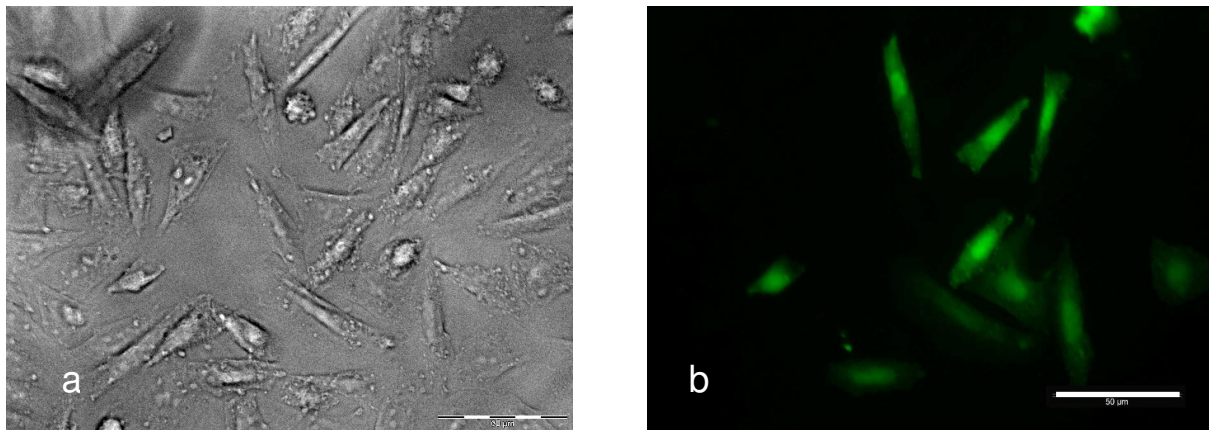
Aufgrund der großen Anzahl an toten Zellen in den ersten Tagen nach der Transfektion und der schlechten Morphologie der Zellen wurde ein anderes Transfektionsreagenz untersucht. Als ein weniger cytotoxisches Transfektionsreagenz wurde Fugene6 von der Firma Roche gewählt.

Aufgrund der geringen Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen wurde die Transfektion bei einer Zelldichte von etwa 50-70 % durchgeführt. Ein Wechsel des Mediums nach der Transfektion war nicht erforderlich, so dass die DNA-Liposomen-Komplexe bis zu zwei Tagen auf den Zellen verblieben (Durchführung siehe 2.3.4).

Bei der Transfektion mit Fugene6 wurden zwei verschiedene Verhältnisse von Fugene6 ( $\mu\text{l}$ ) zu DNA ( $\mu\text{g}$ ) getestet, 3:1 und 6:1. Hierbei wurde allerdings kein Unterschied in der Transfektionseffizienz oder in der Vitalität der Zellen festgestellt. Aus diesem Grunde wurden für die weiteren Transfektionen das Verhältnis von 3:1 verwendet, da das einen geringeren Verbrauch des Transfektionsreagenz bedeutete.

Zusätzlich zu dem neuen Transfektionsreagenz wurde auch eine andere Zellkulturschale verwendet. Statt in einer 24-well-Platte wurde die Transfektion mit Fugene6 in 10 cm-Zellkulturschalen durchgeführt (siehe 3.2.5).

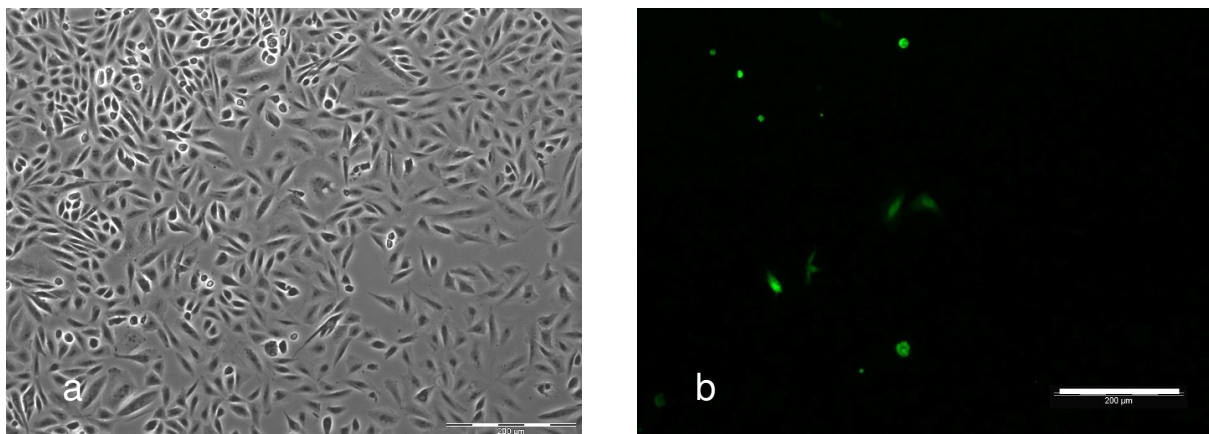
In den ersten Tagen nach der Transfektion hatten die Zellen eine gute Morphologie und nur ein geringer Teil der Zellen war abgestorben (siehe Abbildung 3.8). Nach nur zwei Tagen waren die Zellen konfluent und wurden in einer Verdünnung von 1:10 neu ausgesät, zusätzlich wurde dann das G418 in einer Konzentration von 600  $\mu\text{g/ml}$  dazu gegeben. Die Zelldichte nahm in den folgenden Tagen leicht zu, so dass die Kulturschale vier Tage nach dem Passagieren zu etwa 90 % konfluent war. Danach begann ein massives Zellsterben, wobei etwa 50 % der Zellen abstarben. Zwei Wochen nach dem Passagieren hatte sich die Zelldichte wieder erholt und lag bei 90 %. Während dieser Zeit wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt und die Zellen mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, um die toten Zellen zu entfernen. Die G418-Konzentration lag gleich bleibend bei 600  $\mu\text{g/ml}$ .



**Abbildung 3.8 CHO-Zellen 3 Tage nach der Transfektion mit Fugene6**

a), b) Die Zellen wurden 2 Tage nach der Transfektion mit dem Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> trypsinisiert, auf Deckgläschen ausgesät und für einen Tag kultiviert. Die Abbildungen zeigen den gleichen Ausschnitt, einmal unter dem Durchlichtmikroskop (a) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (b). Die Zellen weisen eine gute Morphologie auf und mehr als 10 % fluoreszieren. 400-fache Vergrößerung. Balken = 50 µm.

Genau wie bei der Transfektion mit Lipofectamine2000 gab es in den ersten Tagen nach der Transfektion viele fluoreszierende Zellen (siehe Abbildung 3.8), dieser Anteil nahm jedoch in den folgenden Tagen rapide ab. Der größte Teil der Zellen zeigte keine Fluoreszenz, war aber resistent gegenüber dem G418 (siehe Abbildung 3.9). Auch nach mehrmaligem Passagieren konnte hierbei keine Veränderung beobachtet werden.



**Abbildung 3.9 CHO-Zellen 10 Tage nach der Transfektion mit Fugene6**

a), b) Die Zellen wurden für 2 Tage auf Deckgläschen kultiviert, 10 Tage nach der Transfektion mit dem Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub>. Die Abbildungen zeigen den gleichen Ausschnitt, einmal unter dem Durchlichtmikroskop (a) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (b). Der Anteil an fluoreszierenden Zellen ist auf unter 5 % gesunken, diese wurden von nicht fluoreszierenden, aber G418-resistenten Zellen überwachsen. 100-fache Vergrößerung. Balken = 200 µm.



Das Auftreten von über 95 % nicht fluoreszierenden, aber resistenten CHO-Zellen konnte somit auch nicht durch ein neues Transfektionsreagenz behoben werden. Aufgrund der geringeren Toxizität gegenüber den CHO-Zellen und der einfacheren Anwendung wurden die weiteren Transfektionen mit Fugene6 durchgeführt.

### **3.2.4 Effekt durch die Linearisierung des Vektors auf die Transfektion**

Da die Transfektionseffizienz nicht zufrieden stellend war, wurde die Transfektion parallel mit linearisierter und cirkulärer DNA durchgeführt. Durch die Linearisierung sollte ein besserer Einbau der DNA in das Genom der Zelle erfolgen. Um äußere Einflüsse ausschließen zu können, waren alle Transfektions- und Kultivierungsbedingungen identisch. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Transfektionseffizienz festgestellt werden, es waren bei beiden DNA-Konformationen etwa gleich viele fluoreszierende Zellen vorhanden (nicht abgebildet). Ebenfalls gab es bei beiden eine große Anzahl an nicht fluoreszierenden, aber G418-resistenten Zellen.

Da die Konformation der DNA offensichtlich keinen Einfluss auf die Transfektion hatte, wurde diese später nur noch mit cirkulärer DNA durchgeführt. Für die Linearisierung musste die DNA zusätzlich mit Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend aufgereinigt werden. Da dieses eine Kontaminationsgefahr und einen Verlust der DNA darstellte, wurde die Linearisierung aus diesem Grunde nicht weiter durchgeführt.

### **3.2.5 Auswirkungen von der Größe der Kulturschalen auf die Transfektion**

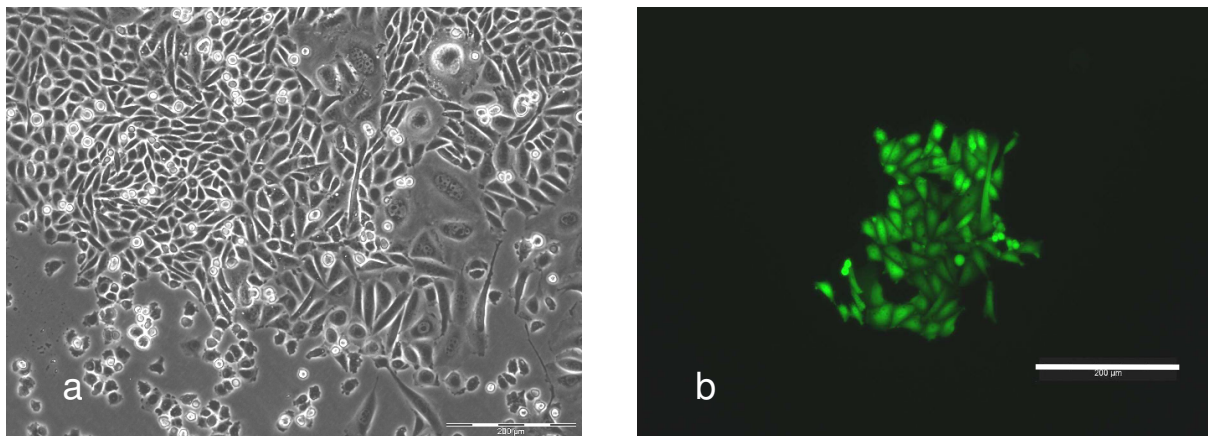
Die Transfektionen wurden zunächst in 24-well-Platten durchgeführt, da hierbei ein geringerer Verbrauch an DNA und Transfektionsreagenz bestand. Zusätzlich konnten die Zellen auf kleinen Deckgläschen ausgesät werden und so problemlos unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Direkt nach der Transfektion konnte so die Morphologie der Zellen beobachtet und die Transfektionseffizienz bestimmt werden.

Der Anteil an fluoreszierenden Zellen war aber von Beginn an sehr gering und nahm durch das häufige Passagieren sehr stark ab, bis keine fluoreszierenden Zellen mehr vorhanden waren. Um eine größere Anzahl an fluoreszierenden Zellen zu erhalten und häufiges Passagieren

zu vermeiden wurde die Transfektion statt in 24-well-Platten in 10 cm-Kulturschalen durchgeführt. Als Transfektionsreagenz wurde Fugene6 verwendet.

Bis zum Erreichen einer Konfluenz von 95 % in den 10 cm-Kulturschalen dauerte es deutlich länger als in den 24-well-Platten. So hatten die fluoreszierenden Zellen mehr Zeit um sich zu teilen und man erreichte eine höhere Anzahl diesen Zellen. Es mussten auch nicht so häufig passagiert werden, so dass die fluoreszierenden Zellen dadurch nicht verdünnt wurden. Durch die längere Kultivierungsdauer konnten sich kleine „Inseln“ von fluoreszierenden Zellen bilden (siehe Abbildung 3.10), welche dann isoliert werden konnten (siehe 2.4).

Ein Nachteil bestand jedoch in der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Bei der Kultivierung in 10 cm-Kulturschalen konnten die Zellen nicht auf Deckgläschen ausgesät werden. Um sie trotzdem betrachten zu können, musste die ganze Kulturschale unter das Mikroskop gestellt werden. Hierfür musste der Deckel abgenommen werden, so dass eine Kontamination der Zellkultur theoretisch erfolgen konnte. Ein weiteres Problem bestand in der Fokussierung der Zellen. Um das Medium nicht von den Zellen abnehmen zu müssen, konnte lediglich eine 100-fache Vergrößerung verwendet werden, da hier ein größerer Abstand des Objektivs zu den Zellen eingestellt werden konnte. Fixierte Zellen auf einem Deckgläschen konnten bei einer 400-fachen oder 1000-fachen Vergrößerung betrachtet werden.



**Abbildung 3.10 CHO-Zellen 5 Tage nach dem Aussäen in 10 cm-Kulturschalen**

a), b) Die Zellen wurden 14 Tage nach der Transfektion mit dem Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> mit Fugene6 in einer 10 cm-Kulturschale trypsiniert und in einer Verdünnung von 1:50 in einer neuen 10 cm-Kulturschale ausgesät. Die Abbildungen zeigen den gleichen Ausschnitt, einmal unter dem Durchlichtmikroskop (a) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (b). Die fluoreszierenden Zellen hatten genug Zeit und Platz um sich zu teilen, so dass kleine „Inseln“ von diesen entstanden. Die umliegenden Zellen zeigen keine Fluoreszenz, sind aber gegen das G418 resistent. 100-fache Vergrößerung. Balken = 200 µm.

### 3.2.6 Optimierte Transfektionsbedingungen

Die Isolierung von nur fluoreszierenden Zellen mit dem G418 war nicht in dem gewünschten Maße erfolgreich, es wurde lediglich ein Wert von maximal 10 % erreicht. Um die Zellen mit anderen Methoden (siehe 3.3) isolieren zu können, sollte dieser Wert so groß wie möglich sein. Hierfür wurden die Transfektionsbedingungen da hingegen optimiert (siehe 3.2.2 bis 3.2.5).

Die ermittelten Bedingungen für eine optimale Transfektion sind folgende: Die CHO-Zellen sollten in einer 10 cm-Kulturschale mit Fugene6 transfiziert werden. Die CHO-Zellen sollten in einer Verdünnung von 1:10 ausgesät und zwei Tage kultiviert werden. Das Verhältnis von Fugene6 ( $\mu\text{l}$ ) zu DNA ( $\mu\text{g}$ ) sollte bei 3:1 liegen. Zwei Tage nach der Transfektion sollten die Zellen mit einer Verdünnung von 1:5 passagiert werden und G418 in einer Konzentration von 600  $\mu\text{g/ml}$  erhalten. Bis zur Konfluenz der Zellen sollte alle 2-3 Tage das Medium gewechselt und tote Zellen mit PBS<sup>-</sup> abgewaschen werden. Haben sich dann einige Kolonien von fluoreszierenden Zellen gebildet, kann die weitere Isolierung dieser Kolonien erfolgen.

## 3.3 Etablierung einer Methode zur Isolierung von Zellkolonien

### 3.3.1 Angewandte Methoden

Nachdem geeignete Transfektionsbedingungen ermittelt werden konnte, waren in den 10 cm-Kulturschalen Kolonien von fluoreszierenden Zellen mit einer geeigneten Größe zur Isolierung vorhanden. Da durch das G418 keine ausreichende Selektion erreicht werden konnte, mussten die Kolonien mit einer mechanischen Methode isoliert werden.

Eine einfache und effektive Methode zur Isolierung von fluoreszierenden Zellen ist die Durchflusscytometrie. Mit einem FACS-Gerät können fluoreszierenden von nicht fluoreszierenden Zellen separiert werden. Dabei kann eine Genauigkeit von fast 100 % erreicht werden (Barka et al., 2004). Ein solches Gerät stand aber leider nicht zur Verfügung.

Eine stabile Zelllinie leitet sich aus einer einzigen Zelle her, dafür muss eine einzelne fluoreszierende Zelle isoliert werden. Dieses geschieht durch Verdünnung auf eine 96-well-Platte (siehe 2.4.7). Dafür durfte jedoch nur eine geringe Anzahl an Zellen in einer Kulturschale

vorhanden sein und der Anteil an fluoreszierenden Zellen sollte bei etwa 75 % liegen. Um diese Bedingungen zu erreichen wurden folgende Methoden getestet (siehe 2.4).

#### Isolierung von Zellkolonien mit Papierstückchen

Mit dieser Methode sollte nur die gewünschte Kolonie trypsinisiert werden und in eine neue Kulturschale überführt werden (siehe 2.4.3). Ein in Trypsin getränktes Papierstück wurde auf die Zellen in einer Kulturschale gelegt. Die Zellen haben sich daraufhin abgelöst und an das Papier geheftet. Das Papierstück wurde in eine neue mit Medium gefüllte 35 mm-Kulturschale gelegt. Bereits nach wenigen Stunden hatten sich die Zellen wieder von dem Papier abgelöst und an den Boden der Kulturschale geheftet.

Es war jedoch nicht möglich mit dem Papierstück ausschließlich fluoreszierende Zellen zu trypsinieren, da es davon nur einen sehr geringen Teil gab und diese auch meist von anderen überwachsen waren. So wurden auch nicht fluoreszierende Zellen in die neue Schale überführt. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen konnte zwar kurzfristig erhöht werden, durch eine schnellere Zellteilung der nicht fluoreszierenden Zellen wurden diese doch schnell wieder überwachsen.

Bei der Anwendung konnten nur wenige fluoreszierende Zellen in eine neue Kulturschale überführt werden. Diese Zellen haben sich entweder schlechter an das Papierstück angeheftet, oder später nicht wieder von diesem gelöst.

Kolonien konnten mit dieser Methode zwar isoliert werden, jedoch wurden auch immer zu viele nicht fluoreszierende Zellen mit überführt, die zu einer Verdrängung führten. Der Anteil an fluoreszierenden Zellen wurde erhöht, allerdings nicht auf etwa 75 %, wie es für eine Vereinzelung der Zellen hätte notwendig sein müssen.

#### Isolierung von Zellkolonien mit Deckgläschen

Auch mit der Methode fluoreszierende Zellen auf Deckgläschen zu kultivieren und auf diese Weise zu isolieren (siehe 2.4.4) konnte kein Erfolg erzielt werden. Die Zellen wurden hierfür in einer Verdünnung von 1:500 ausgesät, um möglichst nur sehr wenige Zellen auf den Deckgläschen zu kultivieren. Das Ziel, nur fluoreszierende Zellen auf einem Deckgläschen zu kultivieren, konnte allerdings nicht erreicht werden. Aufgrund der geringen Anzahl an fluoreszierenden Zellen wurden diese durch die große Verdünnung von 1:500 noch stärker verdünnt. Es

waren nur noch sehr wenige fluoreszierende Zellen vorhanden. Diese wurden auch hier von den nicht fluoreszierenden Zellen überwachsen. Auf keinem der etwa 30 Deckgläschen konnte ein erhöhter Anteil an fluoreszierenden Zellen festgestellt werden.

#### Isolierung von Zellkolonien durch Klonierungszyylinder

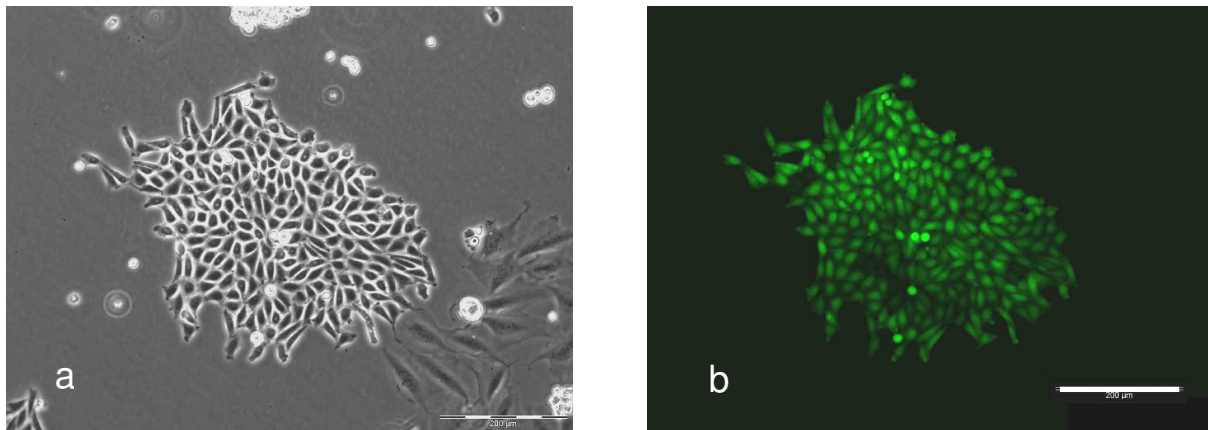
Bei dem Versuch der Isolierung von Zellkolonien durch die Papierstücke konnten nur wenige fluoreszierende Zellen überführt werden. Um die Probleme mit der Anheftung der Zellen an das Papier zu umgehen, sollte nur die gewünschte Kolonie weiter kultiviert werden (siehe 2.4.5). Den Zellen außerhalb des Klonierungszyinders wurde das Medium entzogen, so dass sie innerhalb von kurzer Zeit austrockneten. Der Klonierungszyylinder war dabei aufgrund des geringen Gewichts nicht ganz dicht, so dass Medium auslief. Etwa in einem Umkreis von 2 mm um den Klonierungszyylinder blieben die Zellen vital.

So konnte zwar die gewünschte Kolonie isoliert werden, aufgrund des Auslaufens des Mediums blieben aber auch hier zu viele nicht fluoreszierende Zellen in Kultur, die die fluoreszierenden wieder langfristig überwachsen.

#### Isolierung von Zellkolonien mit dem Zellschaber

Eine sehr effektive und praktikable Methode ist die Isolierung von Zellkolonien mit einem Zellschaber. Da die zu isolierenden Kolonien nur eine geringe Größe hatten, musste der Kopf des Schabers auf wenige Millimeter gekürzt werden (siehe 2.4.6).

Kolonien mit mindestens 50 fluoreszierenden Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop markiert (siehe Abbildung 3.11). Das Abschaben der Zellen konnte unter dem Mikroskop beobachtet werden, so konnte sehr genau die markierte Zellkolonie abgeschabt werden. Diese blieb an dem Kopf des Zellschabers haften und wurde durch leichtes Schwenken in dem Medium einer neuen Schale wieder abgelöst. Die Überführung der Zellen erfolgte in eine 35 mm-Kulturschale. Obwohl hierbei nur wenige Zellen isoliert wurden, und somit eine große Verdünnung stattgefunden hat, sind bei jedem Versuch Zellen in den 35 mm-Kulturschalen angewachsen.



**Abbildung 3.11 Fluoreszierende CHO-Zellen vor dem Abschaben mit einem Zellschaber**

a), b) Die Zellen wurden mit dem Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> transfiziert. Die Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:200 ausgesät und 5 Tage in einer 35 mm-Zellkulturschale kultiviert. Die Abbildungen zeigen den gleichen Ausschnitt, einmal unter dem Durchlichtmikroskop (a) und unter dem Fluoreszenzmikroskop (b). Die Kolonie der fluoreszierenden Zellen wurde mit einem Zellschaber abgeschabt. 100-fache Vergrößerung. Balken = 200 µm.

Auch bei dieser Methode war es nicht möglich nur fluoreszierende Zellen zu isolieren. Jedoch wurde in etwa 25 % der Versuche eine größere Anzahl an fluoreszierenden Zellen überführt. Diese Methode konnte somit zur Isolierung von Zellkolonien angewandt werden, bevor es zu einer Verdünnung und Herstellung einer stabilen Zelllinie kam.

### 3.3.2 Gewinnung von Zellklonen durch Verdünnung

Nachdem eine geeignete Methode zur Isolierung von Zellkolonien entwickelt wurde konnten die Zellen vereinzelt werden. Hierfür wurde die Zellzahl in der Kulturschale bestimmt. Durch das Mikroskop konnten aber nicht alle Zellen gesehen werden, Zellen im Randbereich konnte nicht erkannt werden. Somit konnte die Zellzahl nicht exakt bestimmt, sondern nur abgeschätzt werden.

Die Zellen wurden mit Trysin abgelöst und mit Medium auf eine Konzentration von 2,5 Zellen/ml in einem 50 ml-Röhrchen verdünnt. Durch häufiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen so gut wie möglich verdünnt und vereinzelt. Je 200 µl der Zellsuspension wurden in eine Vertiefung einer 96-well-Platte pipettiert. Aufgrund der geringen Zellzahl in einer 35 mm-Kulturschale wurde immer nur eine 96-well-Platte pro 35 mm-Kulturschale befüllt.

Nach 3-4 Stunden hatten sich die Zellen an den Boden der 96-well-Platte angeheftet und die Anzahl der Zellen pro Vertiefung konnte bestimmt werden. Vertiefungen in denen mehr als eine Zelle zu erkennen war, wurden markiert und das Medium in diesen Vertiefungen abgezogen. Nach etwa 3 Tagen konnten dann kleine Kolonien in den Vertiefungen beobachtet werden. Vertiefungen in denen mehr als eine Kolonie vorhanden war, wurden wieder markiert. Das Medium aus den markierten Vertiefungen wurde abgezogen, so blieben nur solche Vertiefungen in Kultur, die nur eine Kolonie oder noch keine erkennbare Kolonie enthielten.

Alle Kolonien, die schon nach wenigen Tagen erkennbar waren, vermehrten sich auch weiterhin. Bei einigen wenigen Vertiefungen, in denen zunächst keine Zellen zu erkennen waren, bildeten sich nach mehr als einer Woche kleine Kolonien. Die Zellteilung war dabei sehr langsam, so dass solche Zellen nicht verwendet wurden.

Da die Zellen in einer Verdünnung von 0,5 Zellen pro Vertiefung ausgesät wurden, hätte rein rechnerisch nur in jeder zweiten Vertiefung eine Zelle sein dürfen. Es zeigte sich jedoch, dass deutlich mehr Zellen vorhanden waren, als vorher gezählt. Für die Herstellung der beiden stabilen Zelllinien wurden 5 Verdünnungen angesetzt, die Ergebnisse der Verdünnungen sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

**Tabelle 3.1 Ergebnisse bei der Verdünnung der Zellen in 96-well-Platten**

96-well-Platte	befüllte Vertiefungen	Anzahl Vertiefungen ohne Zellen	Anzahl Vertiefungen > 1 Kolonie	Anzahl Vertiefungen mit einer Kolonie
1	79	4	66	9
2	96	21	49	26
3	96	6	86	4
4	96	10	64	22
5	96	9	69	18

Bei einer Zelldichte von mindestens 50 % pro Vertiefung einer 96-well-Platte wurden die Zellen einer Vertiefung mit 10  $\mu$ l Trypsin abgelöst und komplett in eine 35 mm-Kulturschale überführt. Am nächsten Tag konnten sie unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Zellen hatten sich gut angeheftet und zeigten eine gute Morphologie. Da alle Zellen aus nur einer hervorgegangen sind, gab es entweder nur fluoreszierende oder nur nicht fluoreszieren-

rende Zellen in der Kulturschale. Mehr als die Hälfte der vorbereiteten Kulturschalen enthielten nur fluoreszierende Zellen. Kulturschalen mit nicht fluoreszierenden Zellen wurden nicht weiter kultiviert.

So wurden 4 verschiedene GFP exprimierende und 5 verschiedene His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierende Zelllinien hergestellt. Die fluoreszierenden Zellen wurden dann bis zur Konfluenz in den 35 mm-Kulturschalen weiter kultiviert und dann in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen überführt. Dafür wurden die Zellen mit 100 µl Trypsin abgelöst, in 1,1 ml Medium aufgenommen und 1 ml dieser Zellsuspension wurde in eine mit 19 ml Medium gefüllte 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche gegeben. Um die Zellen weiterhin unter dem Mikroskop zu betrachten, wurden 100 µl Zellsuspension weiter in einer mit 1,9 ml Medium gefüllten 35 mm-Kulturschale kultiviert.

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in den 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen kultiviert und dann mit 1 ml Trypsin abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen. Je 5 ml wurden in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche gegeben und in insgesamt 20 ml Medium kultiviert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen eingefroren. Dafür wurden sie erneut mit Trypsin abgelöst und in 10 ml Medium aufgenommen. Dieses wurde in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und 3 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium (FKS + 10 % DMSO) resuspendiert. Je 1 ml Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und schrittweise eingefroren. Von jeder stabilen Zelllinie konnten so mehrere Kryoröhrchen eingefroren werden, um die Zellen für spätere Versuche zu verwenden.

## **3.4 Analyse durch die Fluoreszenzmikroskopie**

### **3.4.1 Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop**

Mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX41 wurde regelmäßig die Fluoreszenz der Zellen beobachtet. Nach der Herstellung mehrerer stabilen Zelllinien konnte anschließend die genaue Lokalisation des GFP und His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in den Zellen bestimmt werden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Transfektion der CHO-Zellen in 24-well-Platten durchgeführt, dabei wurden die Zellen zusätzlich auch auf einem Deckgläschen ausgesät. Dieses konnte dann unter dem Mikroskop bei einer 1000-fachen Vergrößerung betrachtet werden. So



konnte die genaue Morphologie der Zellen und die Lokalisation des GFP erkannt werden. Für diese Vergrößerung musste jedoch ein Tropfen Immersionsöl zwischen dem Objektiv und dem Objektträger aufgetragen werden, da ansonsten kein geeignetes Bild entsteht.

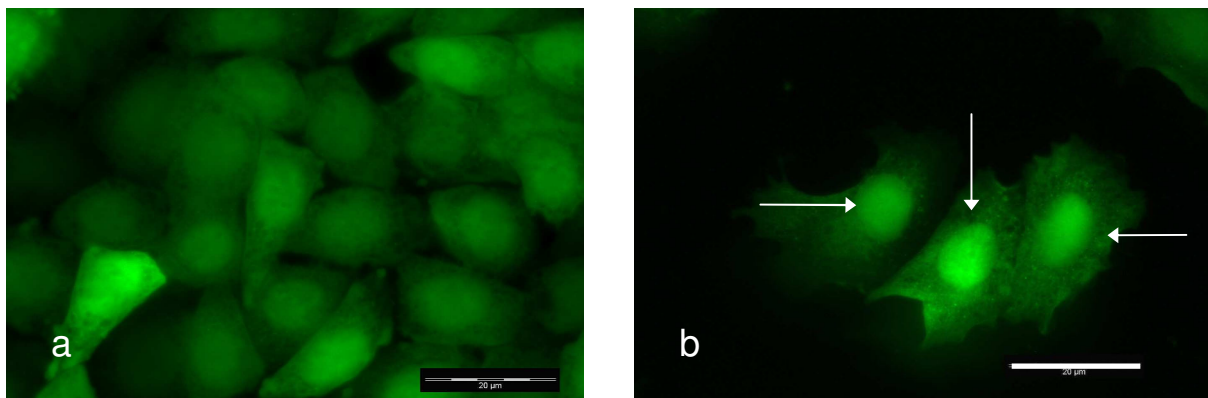
Im Verlauf der Arbeit zeigte sich eine optimale Transfektion der CHO-Zellen in 10 cm-Kulturschalen. Die Zellen wurden hierbei nicht zusätzlich auf Deckgläschen ausgesät, da die Größe der Kulturschale einen Einfluss auf die Transfektionsbedingungen ausübte. In diesen Kulturgefäßen konnten die Zellen allerdings nicht mit einer 1000-fachen oder 400-fachen Vergrößerung beobachtet werden. Eine 1000-fache Vergrößerung war nicht möglich, da hierfür das Medium hätte entfernt und Immersionsöl auf die Zellen gebracht werden müssen. Für eine 400-fache Vergrößerung hätte das Objektiv bis auf etwa 2 mm an die Zellen heran gemusst, auch hierfür hätte das Medium nahezu komplett abgezogen werden müssen, was ein Austrocknen der Zellen verursacht hätte. Bei der 100-fachen Vergrößerung musste das Objektiv nur bis auf etwa 1 cm an die Zellen heran, so dass keine Berührung mit dem Medium stattfand. Um die Zellen überhaupt sehen zu können, musste hierfür der Deckel der Kulturschale abgenommen werden. Da das Mikroskop nicht in einem absolut sterilen Umfeld stand, entstand hierbei eine Kontaminationsgefahr. Um diese Gefahr so gering wie möglich zu halten, wurden die Zellen in den ersten Tagen nach der Transfektion nicht mikroskopiert. Auch nachdem sich die Zellen von der Transfektion und der Zugabe des G418 erholt hatten wurden sie nur selten mikroskopiert. Bei einer 100-fachen Vergrößerung konnte das Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen bestimmt werden, wie auch ein Überblick über die Morphologie der Zellen. Die genaue Lokalisation des GFP konnte nicht beobachtet werden. Ein weiterer Nachteil war die Betrachtung von Zellen, die sich noch in Kultur befanden. Optimale Kultivierungsbedingungen der CHO-Zellen sind bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>, die Fluoreszenzmikroskopie fand aber bei Raumtemperatur und < 5 % CO<sub>2</sub> statt.

Nach der Isolierung von fluoreszierenden Zellen durch den Zellschaber und der anschließenden Vereinzelung dieser Zellen, wurden die Zellen zusätzlich auch auf Deckgläschen kultiviert. Ab diesem Zeitpunkt konnten die Zellen auch mit 1000-facher Vergrößerung betrachtet werden, womit eine genaue Analyse der Lokalisation des GFP und His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in der Zelle möglich war.

### 3.4.2 Lokalisation von GFP und His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in stabil transfizierten CHO-Zellen

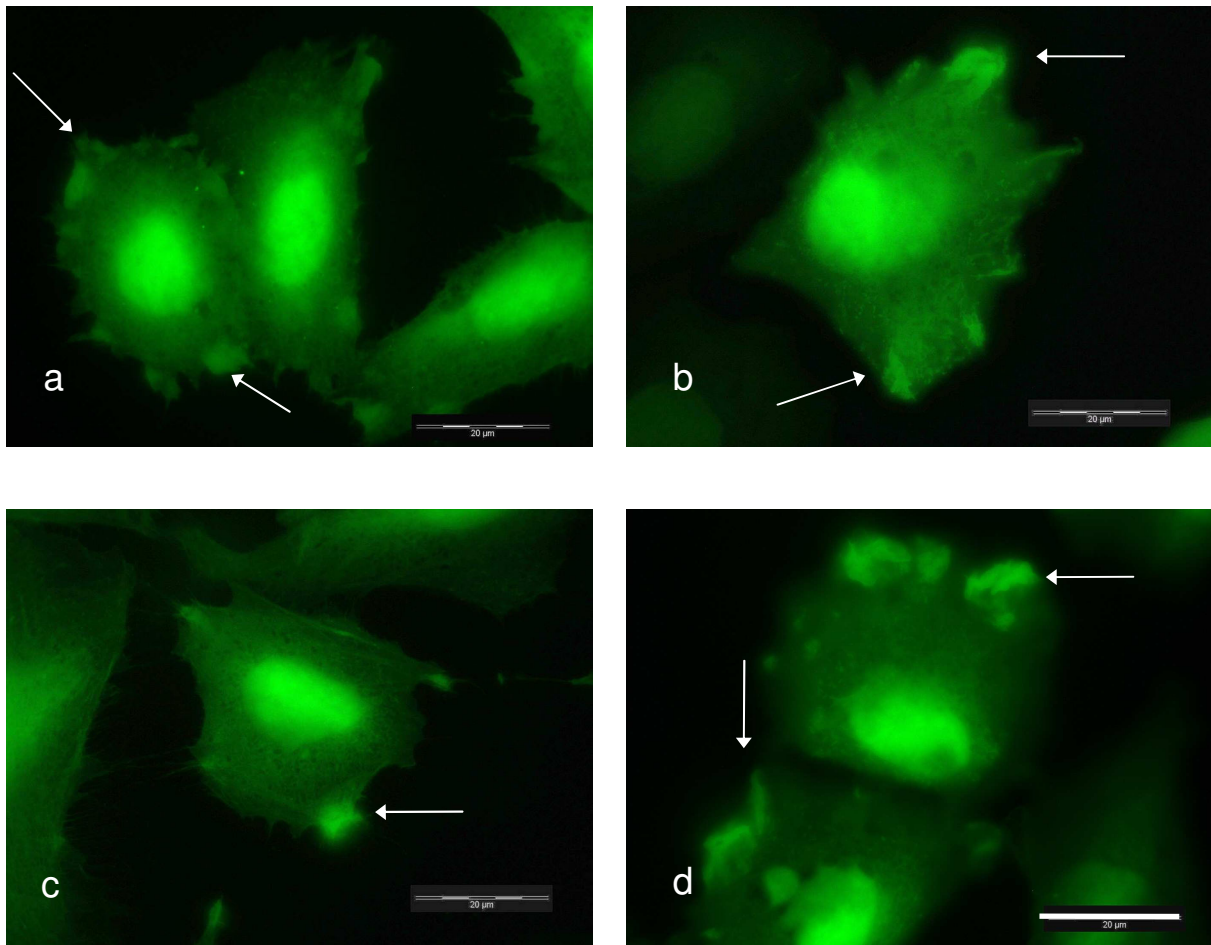
Rab11 ist ein membrangebundenes Protein, das sich vorwiegend in der perinuklearen Region in der Zelle befindet (Ullrich et al., 1996). Es ist am Vesikeltransport bei der Endocytose beteiligt und ist so auf dem Recycling Endosom lokalisiert. Das GFP hingegen ist ein cytosolisches Protein und so gleichmäßig in der Zelle verteilt. Bei der Untersuchung der His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 und GFP exprimierenden stabilen Zelllinien wurden Unterschiede in der Lokalisation der Fluoreszenz festgestellt.

Die GFP exprimierenden Zellen zeigen wie erwartet eine cytosolische Fluoreszenz, wobei hier der Zellkern verstärkt angefärbt war (siehe Abbildung 3.12). Bei den His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen lassen sich auch eine leichte cytosolische Fluoreszenz und ein stärker angefärbter Zellkern beobachten. Es ist auch eine deutliche Anhäufung von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in den Zellauswüchsen zu erkennen (siehe Abbildung 3.13), sowie in den Bereichen um den Zellkern (siehe Abbildung 3.14).



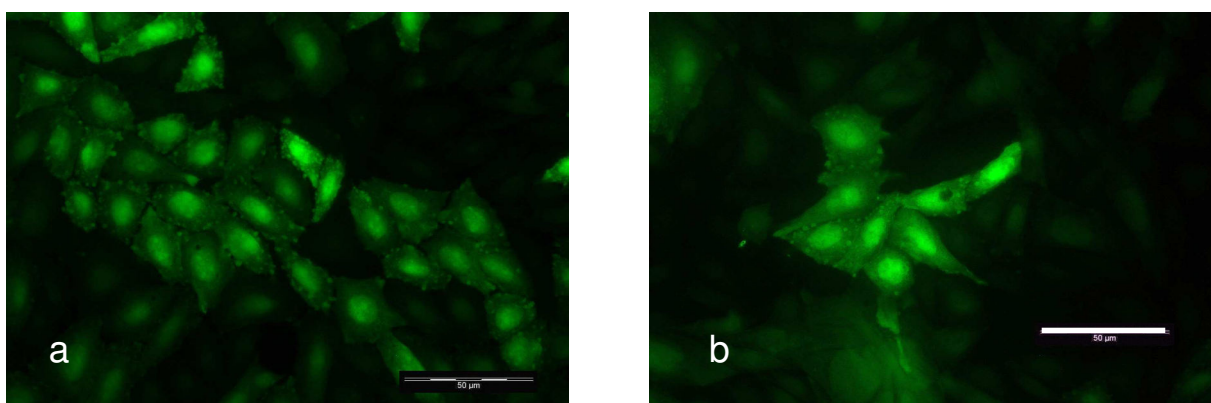
**Abbildung 3.12 Lokalisation von GFP in CHO-Zellen**

a), b) Die Zellen wurden zwei Tage auf Deckgläschen kultiviert, 2 Monate nach der Transfektion. Die Zellen zeigen eine eindeutige cytosolische Fluoreszenz, wobei der Zellkern deutlich erkennbar ist (Pfeile). 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.



**Abbildung 3.13 Lokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in CHO-Zellen**

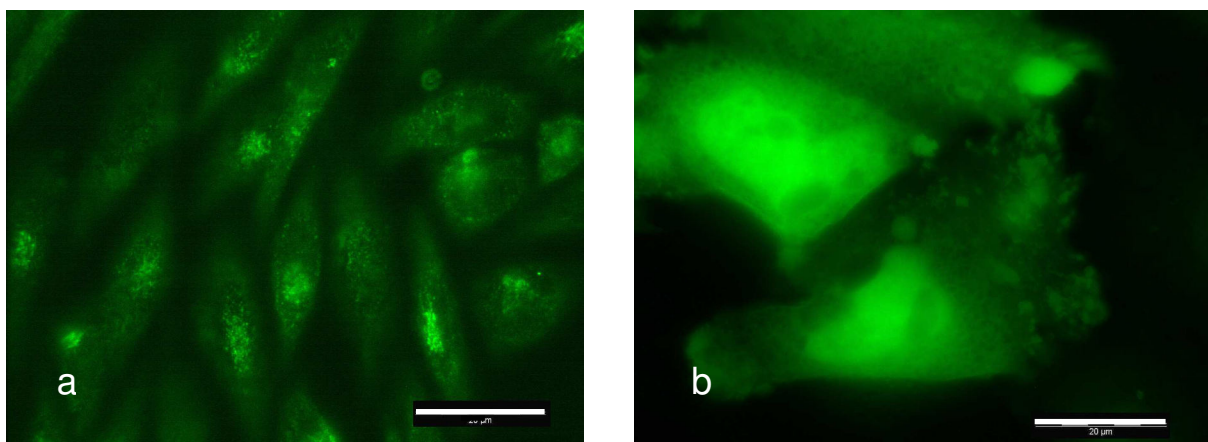
a), b), c), d) Die Zellen wurden zwei Tage auf Deckgläschen kultiviert, 2 Monate nach der Transfektion. Der Zellkern ist deutlich angefärbt, es lassen sich jedoch auch viele Bereiche mit membrangebundenem His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 lokalisieren (Pfeile). 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.



**Abbildung 3.14 Lokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in CHO-Zellen**

a), b) Die Zellen wurden zwei Tage auf Deckgläschen kultiviert, 2 Monate nach der Transfektion. Im Zellverband lassen sich deutlich die Anhäufungen von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 um den Zellkern erkennen, wobei dieser wieder stark angefärbt ist. 400-fache Vergrößerung. Balken = 50 µm.

Wie unter 2.5.4 beschrieben wurde eine Immunfluoreszenzanalyse des endogenen Rab11 in nicht transfizierten Zellen durchgeführt. Dafür wurde ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter sekundärer Antikörper gegen einen primären Rab11-Antikörper verwendet. Somit konnte die Lokalisation von Rab11 in nicht transfizierten Zellen bestimmt werden. Es ist ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenz zwischen diesen Zellen und den transfizierten erkennbar. Der Zellkern ist nicht stark angefärbt und es lässt sich keine so deutliche cytosolische Fluoreszenz aufweisen. Rab11 ist deutlich membrangebunden und befindet sich hauptsächlich in den Bereichen um den Zellkern (siehe Abbildung 3.15).



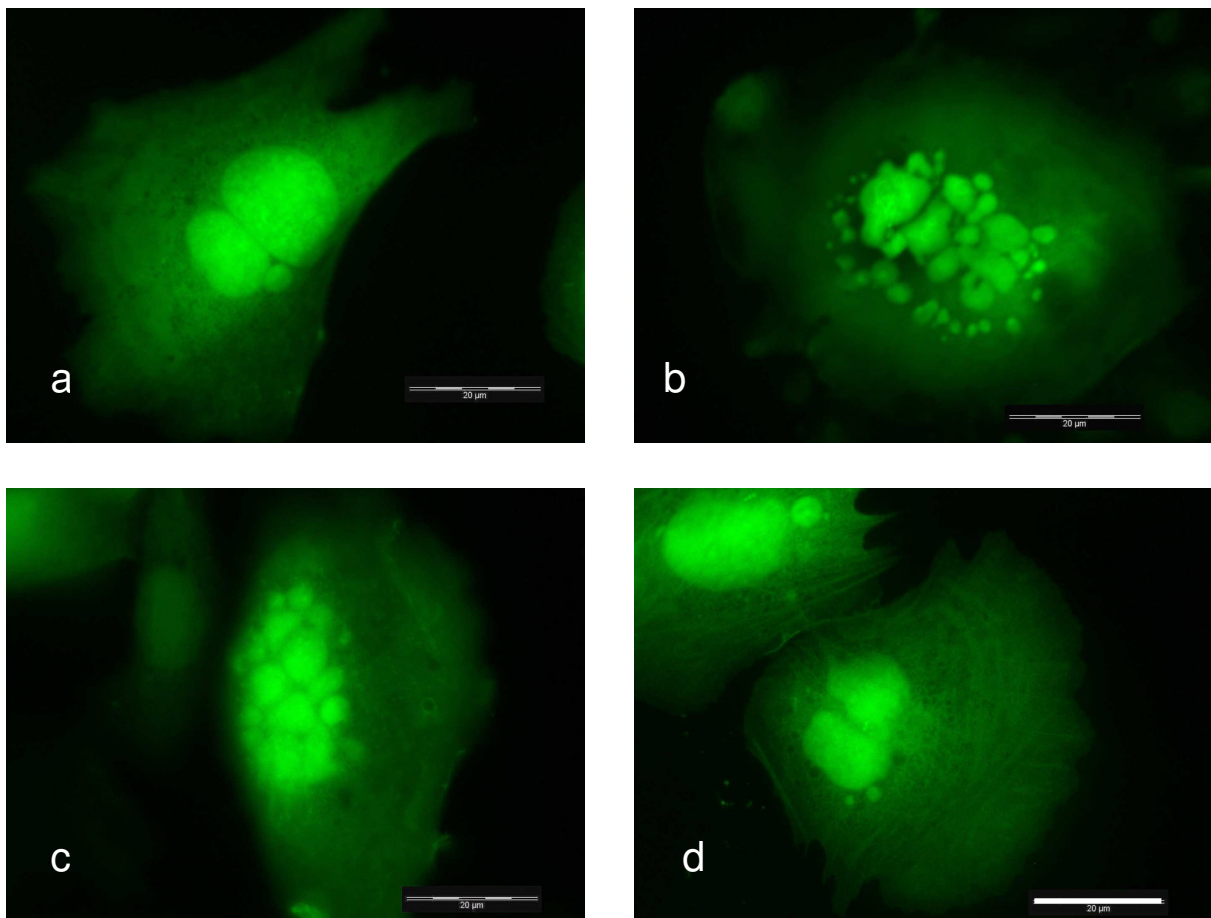
**Abbildung 3.15 Immunfluoreszenzanalyse von Rab11 und His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in CHO-Zellen**

a) Die Zellen wurden drei Tage auf Deckgläschen kultiviert. Durch indirekte Immunfluoreszenz wurde Rab11 mit einem Fluoreszenz-markiertem Antikörper inkubiert. Hierbei ist wenig cytosolische Fluoreszenz erkennbar, auch der Zellkern ist nicht stärker angefärbt. Das Rab11 befindet sich hauptsächlich in perinuklearer Region. b) Zum Vergleich eine mit His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 transfizierte Zelle. Der Zellkern ist verstärkt angefärbt und es ist eine deutliche cytosolische Fluoreszenz vorhanden. 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.

### 3.4.3 Besonderheiten in der Morphologie und Physiologie der Zellen

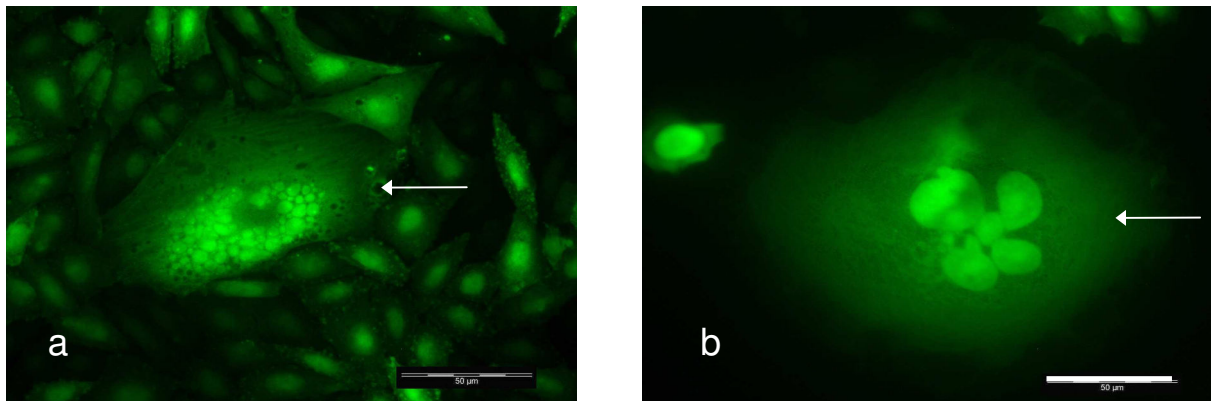
Die Morphologie der transfizierten Zellen hat sich teilweise von nicht transfizierten Zellen unterschieden. Die GFP exprimierenden Zellen hatten allerdings keine andere Morphologie als die His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden. Es gab auch keine Unterschiede in der Dichte der Zellen, die Zellteilung war bei beiden transfizierten Zelllinien in etwa gleich, jedoch ein wenig geringer als bei nicht transfizierten Zellen. Besonders deutlich wurde dieses bei der Isolierung von fluoreszierenden Zellen. Nach der Transfektion gab es ein vermehrtes Vorkommen von nicht fluoreszierenden aber G418-resistenten Zellen. Diese Zellen teilten sich schneller als die erfolgreich transfizierten GFP exprimierenden Zellen. Durch diese Tatsache wurde die Isolierung der fluoreszierenden Zellen erschwert.

Bei beiden stabilen Zelllinien ließen sich dennoch spezifische Merkmale feststellen. Sehr auffällig war das Vorkommen von mehreren Zellkernen bei His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen. Hier waren häufig Zellen mit mehr als 2 Zellkernen vorhanden, die sich nicht in der Zellteilung befanden. Da durch die Transfektion der Zellkern stark angefärbt wurde, ließen sich die Kerne gut beobachten (siehe Abbildung 3.16). In einigen Fällen waren diese Zellen im Vergleich zu den umliegenden deutlich vergrößert (siehe Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.16 Mehrere Zellkerne bei His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden CHO-Zellen**

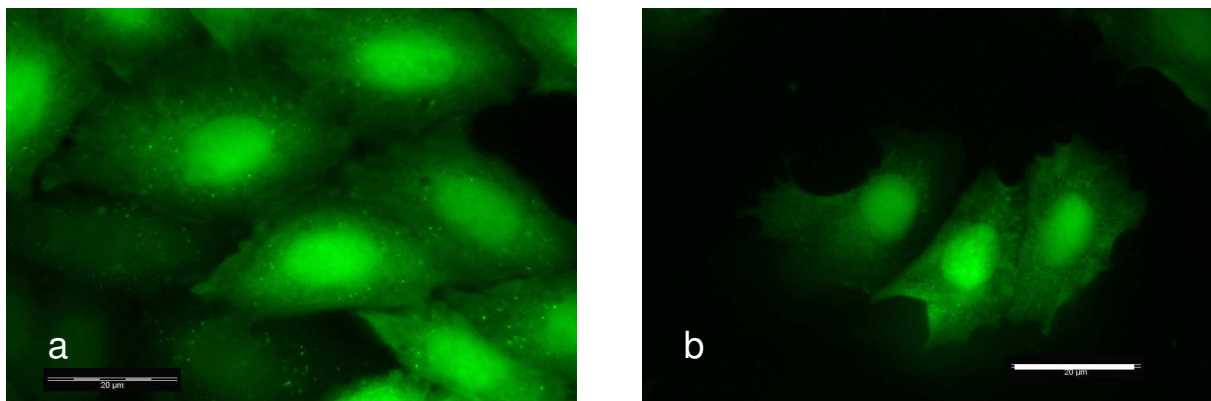
a), b), c), d) Besonderes Merkmal bei His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen sind mehrfache Zellkerne, wobei deutlich mehr als 2 (Abbildungen b und c) vorhanden sein können, es handelt sich hier nicht um eine Zellteilung, 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.



**Abbildung 3.17 Mehrere Zellkerne in deutlich vergrößerten Zellen bei His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen**

a), b) Zellen mit mehreren Zellkernen sind in einigen Fällen deutlich vergrößert und haben keine normale Morphologie mehr. 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.

Auch bei GFP exprimierenden Zellen konnte eine Besonderheit festgestellt werden. Bei einigen Zellen, die sich in räumlicher Nähe befanden, waren viele kleine fluoreszierende Vesikel erkennbar (siehe Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18 Besonderheiten bei GFP exprimierenden Zellen**

Bei GFP exprimierenden Zellen waren kleine Zellkolonien mit sehr kleinen fluoreszierenden Vesikeln erkennbar. 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.

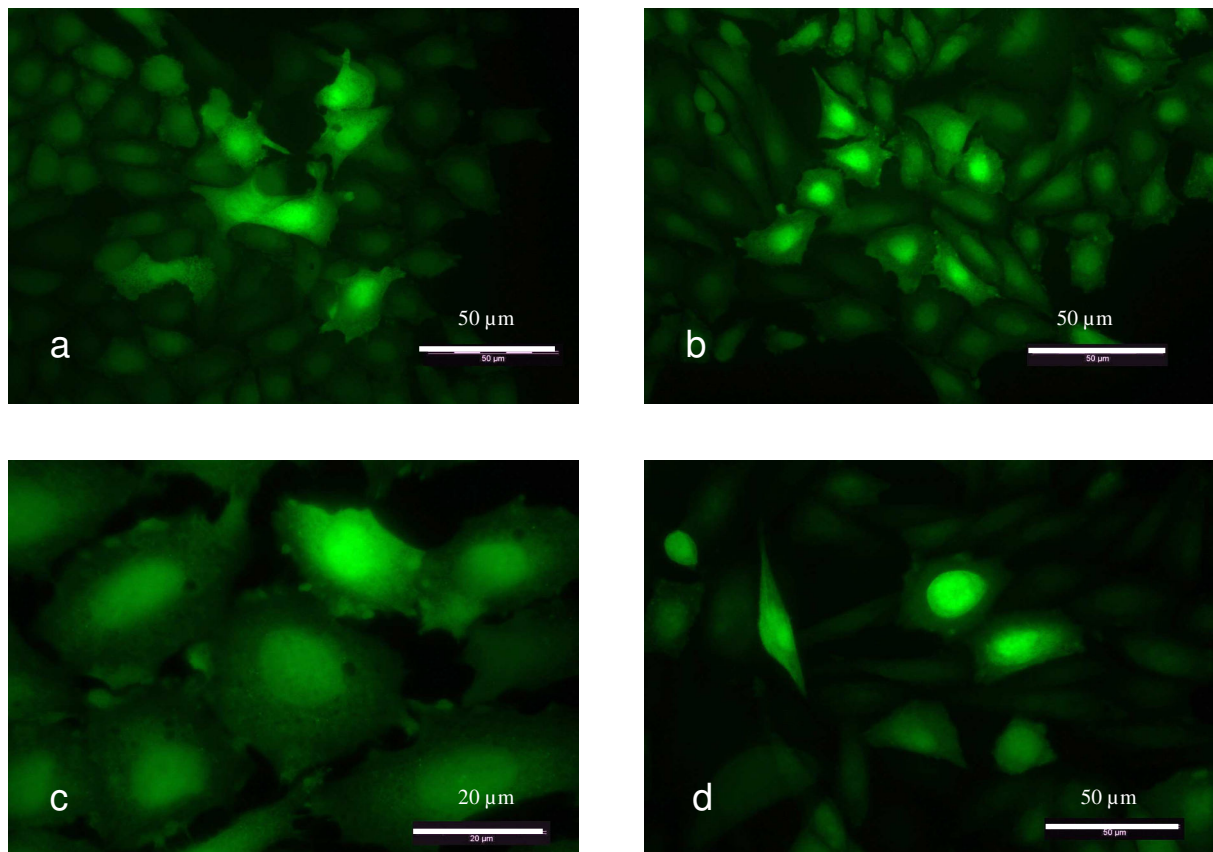
### 3.4.4 Stabilität der stabilen Zelllinien

Eine stabile Zelllinie ist leider nicht immer wie der Name eigentlich sagt stabil. Die fremde DNA wird zwar in das Genom der Wirtszelle eingebaut, kann aber auch wieder herausgeschnitten und abgebaut werden. Ebenso kann es zu Mutationen der eingebauten fremden DNA kommen. Bei einer längeren Kultivierung können diese Veränderungen auftreten, so dass nicht mehr alle Zellen die gleichen Eigenschaften besitzen und sich für Versuchszwecke nur

bedingt eignen. Nach der Herstellung einer stabilen Zelllinie sollten deshalb diese Zellen möglichst rasch in flüssigem Stickstoff gelagert werden, um für spätere Versuche noch stabile Zellen zu gewährleisten.

In dieser Arbeit wurden die Zellen über 10 Wochen nach der Transfektion in Kultur gehalten, um die Stabilität zu überprüfen. Obwohl alle Zellen aus nur einer hervorgegangen sind, lassen sich deutliche Unterschiede feststellen. Wie schon unter 3.4.3 beschrieben, gab es einige Besonderheiten, wie mehrere Zellkerne oder kleine fluoreszierende Vesikel. Diese Besonderheiten kamen jedoch spezifisch bei der jeweiligen Zelllinie vor. Es konnten aber Unterschiede festgestellt werden, die unabhängig von der Zelllinie auftraten und so bei GFP und His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen zu sehen waren. Deutlich zu erkennen war der Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz (siehe Abbildung 3.19). Nach längerer Kultivierungsdauer waren Zellkolonien mit stärkerer Fluoreszenz vorhanden. Diese Zellen müssen somit mehr GFP exprimieren als die übrigen, was auf eine Veränderung dieser Zellen schließen lässt. Die stärkere GFP-Expression wird auch bei der Zellteilung beibehalten, so dass sich meistens kleine Kolonien von stärker fluoreszierenden Zellen bildeten. Sie zeigten ansonsten aber keine Unterschiede in der Morphologie zu den übrigen.

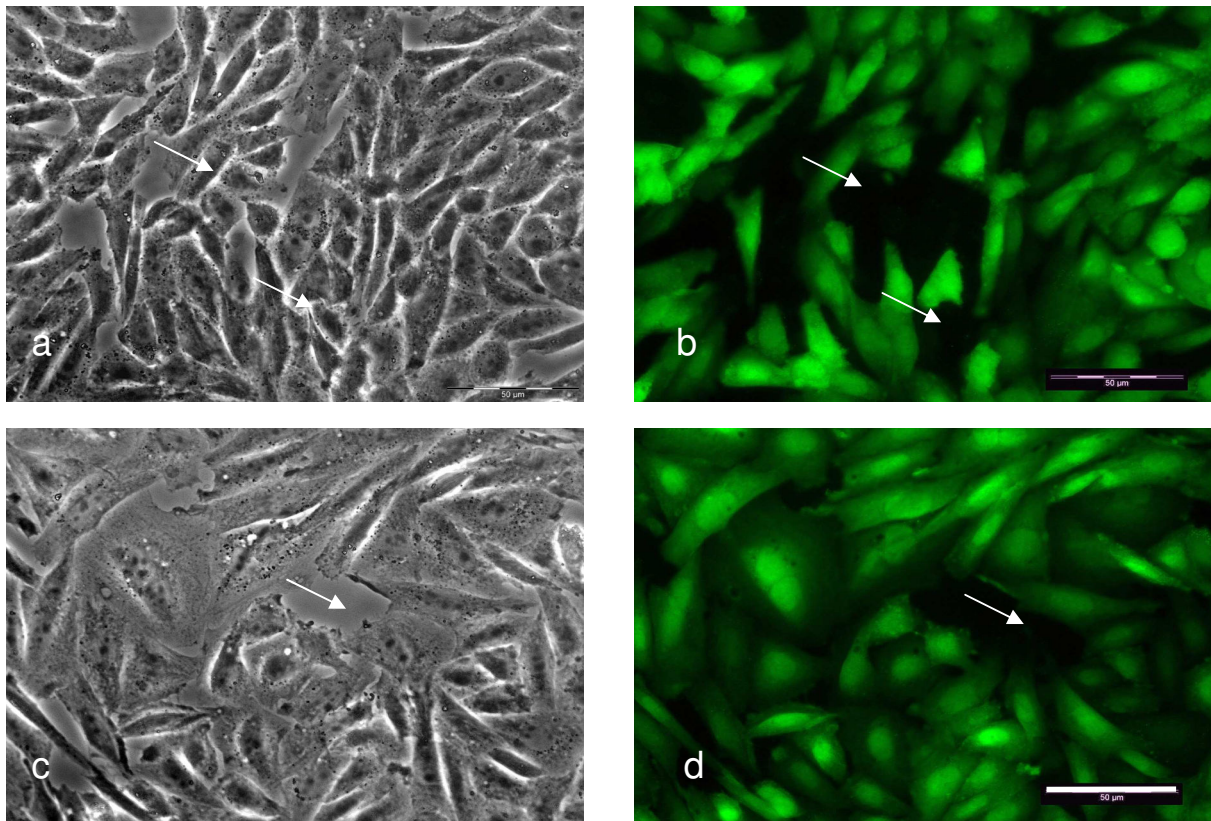
Auch konnte ein vollständiger Verlust der Fluoreszenz der Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 3.20 und Abbildung 3.21). Nach 10 Wochen Kultivierung war bei maximal 1 % der Zellen die Fluoreszenz verloren gegangen. Diese waren aber weiterhin gegen das G418 resistent, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nur das Gen für GFP abgebaut oder nicht mehr abgelesen wurde. Die nicht mehr fluoreszierenden Zellen blieben in Kultur und teilten sich, so dass kleine Kolonien mit nicht fluoreszierenden Zellen entstanden. Bei beiden Zelllinien, der GFP und His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden, zeigten sich die Veränderungen in gleichem Maße.



**Abbildung 3.19 Unterschiede in den Intensitäten der Fluoreszenz**

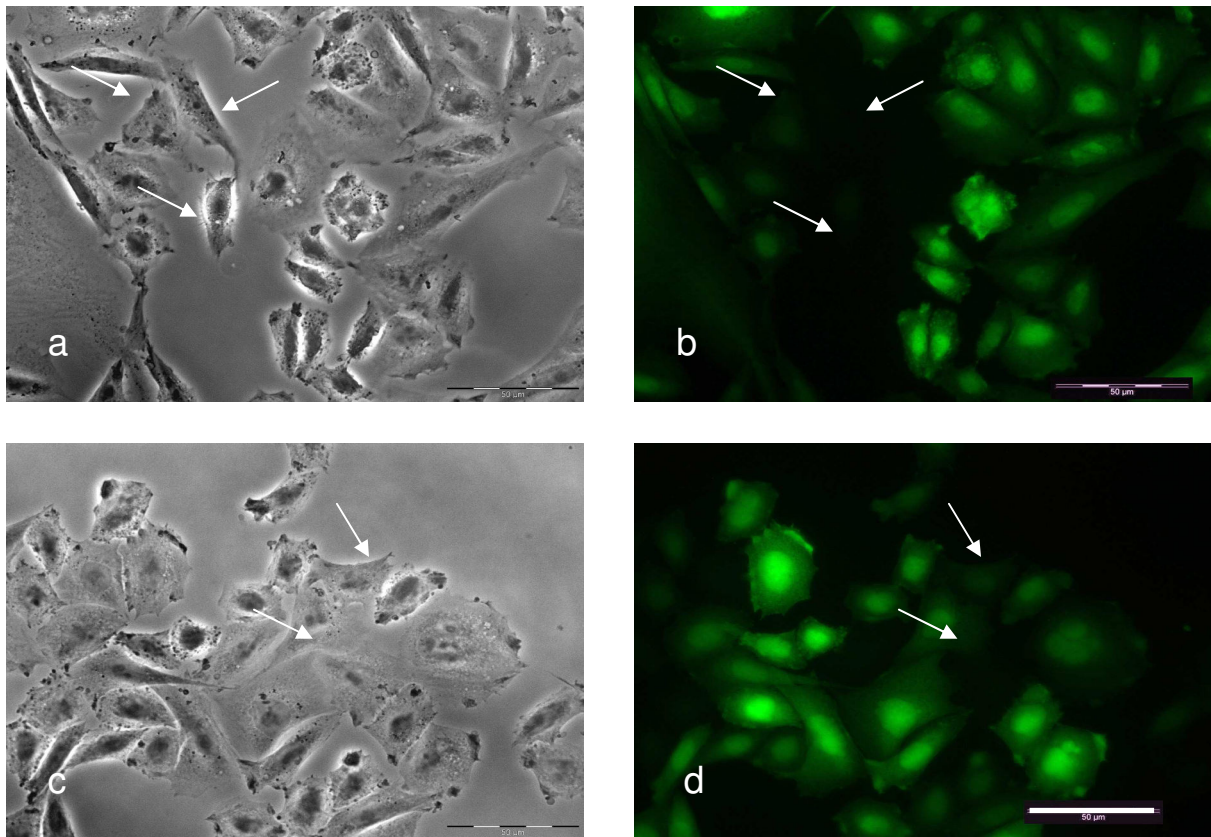
Die GFP (a und b) und His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 (c und d) exprimierenden Zellen wurden drei Tage auf Deckgläschen kultiviert, 10 Wochen nach der Transfektion. Es lassen sich deutliche Unterschiede in der Intensität der Fluoreszenz einzelner Zellen beobachtender, was auf eine Veränderung der eingebauten DNA schließen lässt. a, b, d) 400-fache Vergrößerung, c) 1000-fache Vergrößerung.





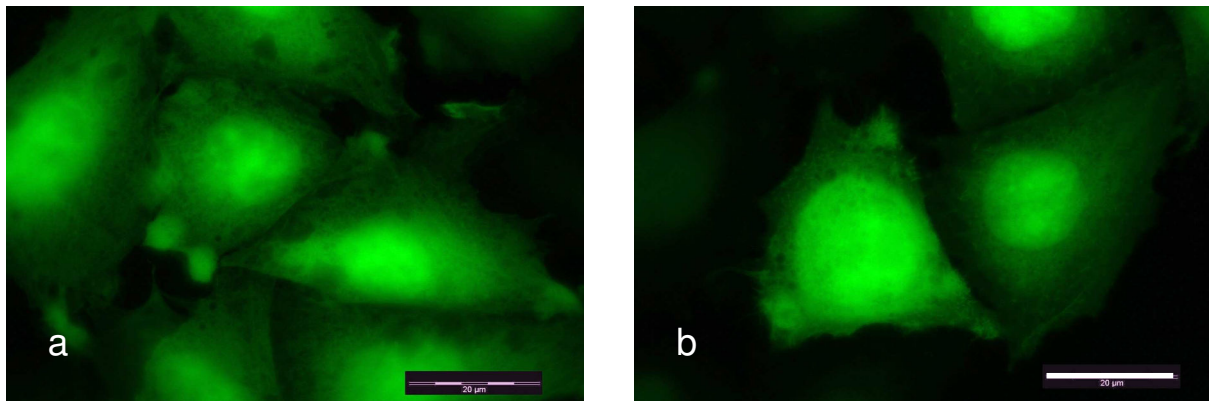
**Abbildung 3.20 Verlust der Fluoreszenz bei einzelnen GFP exprimierenden CHO-Zellen**

a), b), c), d) Die Zellen wurden drei Tage auf Deckgläschen kultiviert, 10 Wochen nach der Transfektion. Die Abbildungen a und b sowie c und d zeigen den gleichen Ausschnitt einmal im Durchlichtmikroskop und einmal unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Pfeile markieren den gleichen Bereich, dabei ist deutlich zu erkennen, dass einige G418-resistente Zellen keine Fluoreszenz mehr aufweisen. 400-fache Vergrößerung. Balken = 50 µm.



**Abbildung 3.21 Verlust der Fluoreszenz bei einzelnen His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden CHO-Zellen**  
 a), b), c), d) Die Zellen wurden drei Tage auf Deckgläschen kultiviert, 10 Wochen nach der Transfektion. Die Abbildungen a und b sowie c und d zeigen den gleichen Ausschnitt einmal im Durchlichtmikroskop und einmal unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Pfeile markieren den gleichen Bereich, dabei ist deutlich zu erkennen, dass einige Zellen keine Fluoreszenz mehr aufweisen. 400-fache Vergrößerung. Balken = 50 µm.

Es wurde ebenfalls geprüft, ob das Einfrieren und Auftauen einen Einfluss auf die Stabilität der Zelllinien hat. Hierfür wurden beide Zelllinien 4 Wochen nach dem Einfrieren wieder aufgetaut (siehe 2.2.6). Bis zur ersten Passagierung wurden die Zellen nicht mit G418 versetzt, um sie nicht zusätzlich unter Stress zu setzen. Danach war G418 mit einer Konzentration von 600 µg/ml gleich bleibend vorhanden. Die Zellen zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu denen, die nicht eingefroren waren (siehe Abbildung 3.22). Alle beschriebenen Eigenschaften (siehe 3.4.2 und 3.4.3) waren weiterhin vorhanden, so dass man von keiner Beeinflussung durch das Einfrieren und Auftauen ausgehen kann.



**Abbildung 3.22** Stabil His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierende CHO-Zellen 4 Wochen nach dem Einfrieren  
 a), b) Die Zellen wurden 4 Wochen nach dem Einfrieren aufgetaut und bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden sie passagiert und für zwei Tage auf Deckgläschen kultiviert. Es sind keine Einflüsse durch das Einfrieren auf die Morphologie erkennbar. 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.

### 3.4.5 Ergebnisse der Extraktion der cytosolischen Proteine mit Saponin

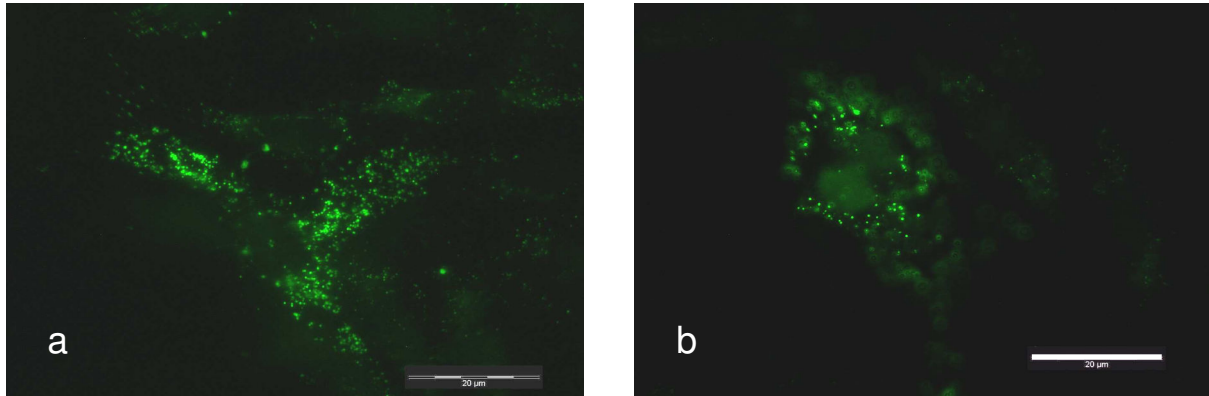
Bei der Analyse der Lokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in stabil transfizierten Zellen sind deutlich angefärbte Zellkerne und eine starke cytosolische Fluoreszenz aufgefallen (siehe Abbildung 3.13). Rab11 ist ein membrangebundenes Protein, und sollte aus diesem Grund spezifisch dort vorkommen (siehe Abbildung 3.15). Aufgrund der starken cytosolischen Fluoreszenz konnte eine genaue Lokalisationsüberprüfung von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in stabil transfizierten Zellen nicht durchgeführt werden. Es konnten dennoch Bereiche mit vermehrter, wahrscheinlich membrangebundener Fluoreszenz, festgestellt werden.

Zur Überprüfung der membrangebundenen Rab11-Lokalisation wurde deshalb eine Protein-Extraktion mit Saponin durchgeführt (siehe 2.5.5). Das Saponin führt zu einer Permeabilisierung der Plasmamembran, so dass das Cytosol aus der Zelle entweicht. So bleiben ausschließlich membrangebundene Proteine wie die membrangebundene Rab11-Fraktion in den Zellen vorhanden.

Bei den stabil GFP exprimierenden Zellen wurde ebenfalls eine Protein-Extraktion mit Saponin durchgeführt. Bei dem GFP handelt es sich um ein cytosolisches Protein, welches nach der Extraktion nicht mehr in der Zelle vorhanden sein sollte. Diese Zellen dienten somit als Kontrolle, um die Effizienz der Saponin-Extraktion zu überprüfen.

Nach der Behandlung der GFP exprimierenden Zellen mit 0,05 % Saponin war in einigen Zellen noch eine Fluoreszenz zu beobachten (siehe Abbildung 3.23). Der Zellkern hatte sich

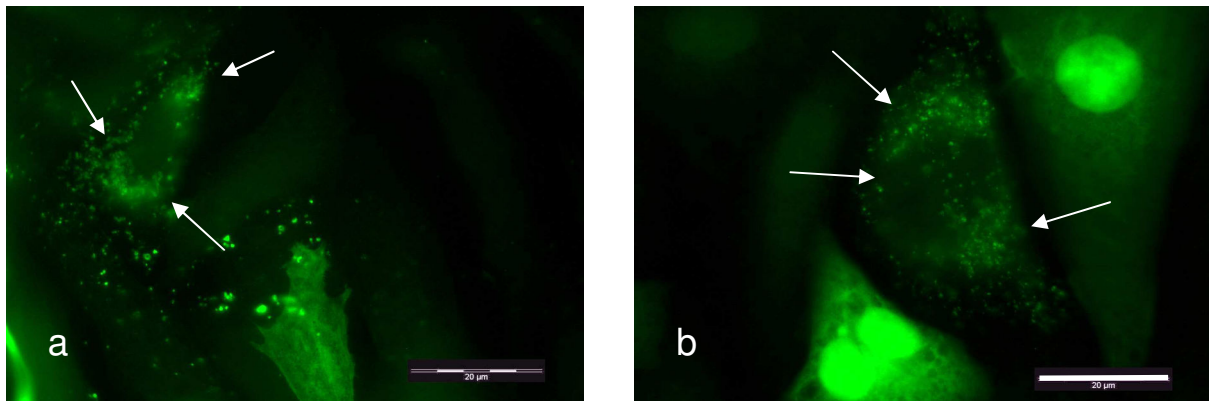
dagegen komplett entfärbt, es waren aber noch kleine, definiert fluoreszierende Vesikel erkennbar.



**Abbildung 3.23 GFP exprimierende CHO-Zellen mit Saponin extrahiert**

a), b) Die Zellen wurden zwei Tage auf Deckgläschen kultiviert und dann mit 0,05 % Saponin behandelt. Die cytosolische und kernspezifische Fluoreszenz war verschwunden, aber eine vollständige Extraktion von GFP konnte nicht erreicht werden. Kleine fluoreszierende Vesikel sind noch in den Zellen erkennbar. 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.

Die Protein-Extraktion bei den His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen erfolgte nicht vollständig. Etwa 50 % der Zellen zeigte keine Veränderung nach der Behandlung mit Saponin, die Fluoreszenzsignale hatten sich nicht verändert (nicht abgebildet). Bei etwa 10 % der Zellen war keine Fluoreszenz mehr erkennbar, hier sind auch membrangebundene Proteine aus den Zellen extrahiert. Bei einer erfolgreichen Extraktion der cytosolischen Proteine waren keine störende cytosolische Fluoreszenz und kein angefärbter Zellkern erkennbar, das membrangebundene His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 aber noch vorhanden (siehe Abbildung 3.24). Eine vermehrte Lokalisation des His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 Proteins ist im Bereich um den Zellkern zu erkennen.



**Abbildung 3.24 His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierende CHO-Zellen mit Saponin extrahiert**

a), b) Die Zellen wurden zwei Tage auf Deckgläschen kultiviert und dann mit 0,05 % Saponin behandelt. Nicht bei allen Zellen erfolgte eine vollständige Extraktion der cytosolischen Proteine, ein angefärbter Zellkern ist noch erkennbar (b). Bei erfolgreich extrahierten Zellen ist eine vermehrte Fluoreszenz im Bereich um den Zellkern erkennbar (Pfeile). 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 µm.

Durch die Protein-Extraktion der CHO-Zellen konnten die cytosolischen Proteine in den Zellen entfernt werden. Dadurch war eine genaue Bestimmung der Lokalisation des Proteins His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 möglich. Es sollte aber noch zusätzlich überprüft werden, ob das transfizierte Rab11 an den gleichen Positionen innerhalb der Zelle vorhanden ist, wie das endogene Rab11. Diese Überprüfung erfolgte mit einer Immunfluoreszenzanalyse im Anschluss an die Protein-Extraktion mit Saponin (siehe 2.5.5).

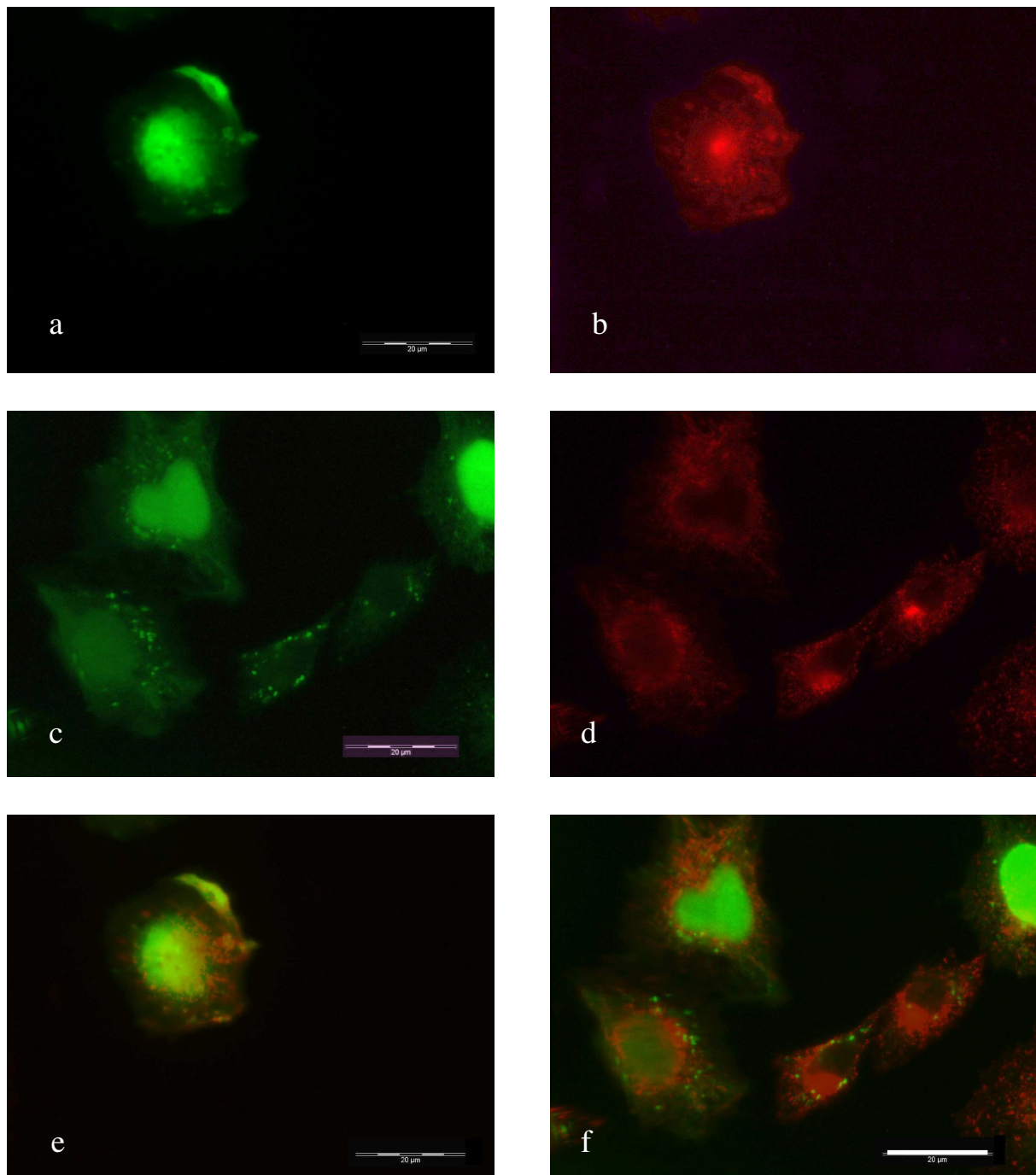
Für die Immunfluoreszenzanalyse konnte jedoch kein Antikörper gegen das Rab11 verwendet werden, sondern gegen den Transferrin-Rezeptor, da ansonsten keine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen dem endogenen und exogenen Rab11 möglich gewesen wäre. Transferrin ist ein Glykoprotein, welches für den Transport von Eisen-Ionen in den Zellen zuständig ist. Nach dem Erreichen der Zielzelle bindet das eisenbeladene Holotransferrin an einen Rezeptor, der sich auf der Oberfläche der Zelle befindet. Durch Vesikelbildung gelangt das Transferrin in die Zelle und verschmilzt mit dem Sorting Endosom (Bliel and Bretscher, 1982; Pearse, 1982; Hopkins and Trowbridge, 1983). Dort spalten sich die Eisen-Ionen durch eine pH-Wert Änderung vom Transferrin (Apotransferrin) ab (Morgan, 1981; Rao et al., 1983; Klausner et al., 1984).

Der Transferrin-Rezeptor und das eisenfreie Apotransferrin gelangen über das Recycling Endosom zurück zur Zelloberfläche, wo der Rezeptor wieder für die Aufnahme von Transferrin zur Verfügung steht. Das Apotransferrin wird in den Extrazellularraum entlassen, wo es wieder Eisen-Ionen aufnehmen kann (Yamashiro et al., 1984; Hopkins et al., 1994; Sheff et al.,

1999). Das Recycling Endosom beinhaltet Rab11, welches eine entscheidende Rolle bei dem Recycling von Proteinen zur Plasmamembran spielen soll (Ullrich et al., 1996).

Seit gezeigt werden konnte, dass Transferrin mit Rab11 kolokalisiert, ist Transferrin ein geeignetes Hilfsmittel zur Untersuchung der Rab11 Funktion und Lokalisation.

Der Transferrin-Rezeptor wurde mit einem Erstantikörper gegen den Rezeptor markiert und dann mit einem Cy3-markierten Zweitantikörper inkubiert, um eine Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop durchführen zu können. Das GFP emittiert das Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm und sendet eine grüne Fluoreszenz, das Cy3 hingegen emittiert das Licht mit einer Wellenlänge von 570 nm und sendet eine rote Fluoreszenz. So konnten beide Signale unabhängig voneinander unter dem Fluoreszenzmikroskop mit unterschiedlichen Filtern betrachtet werden. Durch eine Überlagerung beider Bilder konnte eine partielle gemeinsame Lokalisation des Proteins Rab11 und des Transferrin-Rezeptors festgestellt werden (siehe Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25 Kolokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 und dem Transferrin-Rezeptor**

a), b), c), d) Die His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen wurden zwei Tage auf Deckgläschen kultiviert, mit Saponin behandelt und mit einem Cy3-markiertem Zweitantikörper angefärbt. Abbildungen a und b sowie c und d zeigen den gleichen Bildausschnitt, jeweils einmal mit grüner (durch GFP) und roter (durch Cy3) Fluoreszenz. Abbildung e ist eine Überlagerung der Bilder a und b, Abbildung f ist eine Überlagerung der Bilder c und d. 1000-fache Vergrößerung. Balken = 20 μm.

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer stabilen Zelllinie, welche das Fusionsprotein His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimiert. Hierzu wurde das dazu benötigte DNA-Konstrukt hergestellt, CHO-Zellen mit dem Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> transfiziert und stabil transfizierte Zellen isoliert. Durch die Vereinzelnung dieser Zellen konnte eine stabile Zelllinie aus einem Zellklon hergestellt werden.

Der His-tag am Fusionsprotein dient dem Ziel einer vereinfachten Subproteom-Analyse. So können Zellorganellen, auf denen Rab11 lokalisiert ist, mit Hilfe des His-tags aus den Zellen isoliert werden. Frühere Arbeitsgruppen haben zur Isolierung von Zellorganellen eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. Diese Methode war jedoch sehr zeitaufwendig und die Auftrennung nur ungenügend. Der nächste Fortschritt war die Immunisolierung von Organellen, die aber bei größeren Präparationen aufgrund des limitierenden Antikörpers an ihre Grenzen stößt (Trischler et al., 1999; Bartz et al., 2001; Bartz et al., 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine stabile His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierende Zelllinie hergestellt werden. Des Weiteren konnte die Lokalisation des Fusionsproteins durch die Fluoreszenzmikroskopie und Immunfluoreszenzanalyse bestimmt werden.

### 4.1 Bewertung der Transfektionseffizienz

Eine hohe Transfektionseffizienz ist das Ziel bei einer stabilen Transfektion. Bei maximal 0,1 % der transient transfizierten Zellen wird die fremde DNA stabil in das Genom der Zelle integriert (Mühlhardt, 2002). Es eignen sich aus diesem Grund nur wenige Zellen für die Herstellung einer stabilen Zelllinie. Ein wichtiger Faktor bei der Transfektion ist neben der verwendeten Zelllinie die Transfektionsmethode. In dieser Arbeit wurden CHO-Zellen durch die biologische Methode der Lipofektion transfiziert. Hierfür wurde zunächst die übliche Transfektionslösung Lipofectamine2000 verwendet. Schon die transiente Transfektion verlief mit einer schlechten Effizienz, nur maximal 20 % der Zellen wiesen eine Fluoreszenz auf. Die Fluoreszenz der Zellen diente als Maß der Transfektionseffizienz. Zusätzlich zu der niedrigen Transfektionseffizienz wiesen die Zellen eine schlechte Morphologie auf, sie waren stark abgerundet und bis zu 50 % der Zellen starben innerhalb der ersten Tage. Eine stabile Integration der vollständigen Vektor-DNA erfolgte nur bei maximal 5 % der transfizierten Zellen. Ein Wechsel der Transfektionslösung führte zu besseren Ergebnissen bezogen auf die Morpholo-



gie der Zellen. Das verwendete Fugene6 hatte eine geringere Toxizität gegenüber den CHO-Zellen, die Morphologie der Zellen war unverändert und nur wenige Zellen starben. Dabei konnte der Anteil an fluoreszierenden Zellen nicht wesentlich erhöht werden.

Ein zusätzliches Problem hierbei war die ungenügende Selektion der transfizierten Zellen durch das Antibiotikum G418. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor enthält das Resistenzgen Neomycin, mit dem Antibiotikum G418 sollen stabil transfizierte Zellen selektioniert werden. Diese Selektion war jedoch nur ungenügend, da nicht fluoreszierende und somit nicht vollständig transfizierte Zellen weiterhin in Kultur blieben. Diese Zellen zeigten zudem eine höhere Teilungsrates und verdrängten aus diesem Grund relativ schnell die transfizierten GFP exprimierenden Zellen. Die Wirkungsweise von G418 wurde überprüft, indem nicht transfizierte Zellen ebenfalls mit diesem Antibiotikum behandelt wurden. Diese Zellen starben innerhalb von wenigen Tagen. Aufgrund dieses Ergebnisses muss angenommen werden, dass bei der Integration der Vektor-DNA in die Zelle Probleme aufgetreten sind. Eine Möglichkeit ist der unvollständige Einbau der Vektor-DNA, das Resistenzgen für Neomycin wurde in das Genom der Zellen stabil eingebaut, das Gen für das Fusionsprotein His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 hingegen nicht. Des Weiteren kann ein vollständiger Einbau zwar stattgefunden haben, eine Expression des Fusionsproteins wird jedoch nicht ausgeführt. Ebenfalls sind aufgetretene Mutationen an der eingebauten DNA oder ein schneller Abbau des Proteins als Ursachen in Betracht zu ziehen. Da nur maximal 5 % der Zellen das Fusionsprotein exprimierten, fanden ein unvollständiger Einbau der DNA oder weitere Fehler in großem Maße statt. Eine Selektion nur mit einem Selektionsmarker war deshalb nicht ausreichend.

Auch bei anderen Arbeitsgruppen trat ein unvollständiger Einbau der fremden DNA in das Genom der Zellen auf (Nielsen et al., 1999; Savina et al., 2005). Auch hier blieben anscheinend nicht vollständig transfizierte Zellen trotz des Selektionsmarkers in Kultur, ein Fluoreszenzprotein diente hier ebenfalls als Marker für die Effizienz. Barka et al. erreichten 2004 eine Effizienz der stabil transfizierten Zellen von etwa 20 %. Es wurden ebenso CHO-Zellen mit der Transfektionslösung Fugene6 transfiziert. Hierbei wurde allerdings der Vektor pEGFP-N1 (BD Biosciences; Palo Alto, CA) verwendet. Dieser Vektor wurde auch erfolgreich von anderen Gruppen zur Transfektion verwendet (Chen et al., 1998; Savina et al., 2002). Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pAcGFP-C2 wurde bisher nicht verwendet, so dass hier keine Vergleiche vorliegen. Die schlechte Transfektionseffizienz kann nicht auf die verwendete Zelllinie zurück geführt werden, da CHO-Zellen auch von anderen Arbeitsgruppen verwendet wurden, zusätzlich wurde in dieser Arbeit auch mit HeLa-Zellen gearbeitet. Auch das verwendete Transfektionsreagenz kann nicht der Grund für die geringe Effizienz

sein, da Fugene6 ebenfalls erfolgreich angewandt wurde. Die geringe Transfektionseffizienz und der fehlerhafte Einbau der DNA können folglich nur auf den Vektor zurückzuführen sein.

## 4.2 Etablierung einer Methode zur Isolierung von Zellkolonien

Wie oben schon beschrieben, war eine Selektion der stabilen His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen mit dem Antibiotikum G418 nicht ausreichend. In der Literatur wird häufig die Isolierung von fluoreszierenden Zellen mit einem FACS-Gerät beschrieben. Hierbei werden fluoreszierende Zellen mit einer Genauigkeit von bis zu 99 % isoliert. Da ein solches Gerät bei dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand, wurden die fluoreszierenden Zellen mit einer mechanischen Methode isoliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 4 verschiedene Methoden zur Isolierung von fluoreszierenden Zellen getestet. Wie schon oben beschrieben, wiesen nur maximal 5 % der transfizierten Zellen auch noch nach wenigen Tagen eine Fluoreszenz auf. Aufgrund der geringen Anzahl dieser Zellen mussten diese bis zur Konfluenz kultiviert werden um eine lokale Anhäufung zu erreichen. Die Methoden der Isolierung mit Deckgläschen und dem Klonierungszyylinder waren nicht erfolgreich, da fluoreszierende Zellen aufgrund der langen Kultivierungsdauer von nicht fluoreszierenden Zellen überwachsen wurden. Die hohe Zelldichte war dagegen ideal für die Methoden der Isolierung durch Papierstückchen und den Zellschaber. Durch die lange Kultivierungsdauer wuchsen kleine fluoreszierende Zellkolonien heran, die mit Hilfe von in Trypsin getränkten Papierstückchen entfernt werden sollten. Die fluoreszierenden Zellen konnten dabei nicht erfolgreich isoliert werden. Es konnte nicht geklärt werden, ob diese sich nicht an das Papier anlagerten, oder sich von diesem nicht mehr ablösten. Bei der Isolierung mit dem Zellschaber wurde der gesamte Zellverband abgelöst und in eine neue Kulturschale überführt. Bei einer genauen Markierung der fluoreszierenden Zellen und einem genauen Abschaben dieser, konnten mit großem Erfolg hauptsächlich fluoreszierende Zellen isoliert werden. Innerhalb von 1-2 Tagen mussten die abgeschabten Zellen dann durch Verdünnung weiter isoliert werden, da sich aufgrund des fehlenden Fusionsproteins die nicht fluoreszierenden Zellen schneller teilten und die langsamer wachsenden verdrängten. Obwohl die Zellen durch das Abschaben und kurze Zeit später durch das Verdünnen in großen Stress versetzt wurden, erholten sich die einzelnen Zellen sehr schnell und wuchsen zu Kolonien heran. Ein Aufkonzentrieren der fluoreszierenden Zellen war mit dieser Methode erfolgreich.

### **4.3 Veränderte Morphologie bei His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 transfizierten Zellen**

Die Transfektion der Zellen mit dem Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub> führte zu einer Überexpression des Proteins Rab11 in den CHO-Zellen. Durch diese Überexpression zeigte sich bei einigen Zellen eine veränderte Morphologie. Bei etwa 10-15 % der transfizierten Zellen zeigte sich eine ungewöhnliche Anhäufung von Zellen mit mehr als einem Zellkern. Bei nur mit GFP transfizierten oder nicht transfizierten Zellen kam es nur bei etwa 1 % der Zellen zu dieser Veränderung. Wilson et al. zeigten 2005 einen Zusammenhang zwischen dem Protein Rab11 und der Zytokinese der Zellen. Rab11 reguliert den Vesikeltransport zwischen dem Recycling Endosom und der Teilungsfurche und ist somit für den Erfolg der Zytokinese verantwortlich. Eine Überexpression des Proteins Rab11 hemmt die Zytokinese und das führt zu einer Anhäufung von Zellkernen in den transfizierten Zellen. Dieser Defekt führte auch zu einer unnatürlichen Vergrößerung der Zellen mit mehreren Zellkernen. Diese waren zusätzlich auch nicht mehr in der Lage eine Zellteilung auszuführen.

### **4.4 Lokalisation von GFP in stabil transfizierten CHO-Zellen**

Die Transfektion der Zellen mit dem Vektor pAcGFP-C2 diente in erster Linie als Kontrolle. Diese Zellen sollten in allen Kultivierungseigenschaften mit denen der His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 transfizierten Zellen übereinstimmen. Neben den erwarteten Unterschieden in der Lokalisation des GFP gab es jedoch noch einen in der Morphologie der Zellen. Wie unter 4.3 beschrieben, kam es bei einigen His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 transfizierten Zellen zu einer Mehrkernigkeit, bei GFP transfizierten Zellen war keine Anhäufung zu sehen.

Bei GFP handelt es sich um ein cytosolisches Protein, das gleichmäßig in der Zelle verteilt ist, und auch im Zellkern vorkommt (Barka et al., 2004; Savina et al., 2002). Als Besonderheit waren bei einigen Zellkolonien viele kleine fluoreszierende Vesikel in den Zellen erkennbar. Bei der Proteinextraktion mit Saponin waren diese Vesikel noch bei einigen Zellen erkennbar. Da GFP ein cytosolisches Protein ist, hätte dieses durch die Extraktion komplett entfernt werden müssen. Das GFP wird in den CHO-Zellen jedoch nicht nur exprimiert, es findet auch eine Sekretion statt, wobei das GFP in Vesikeln aus den Zellen in das Medium transportiert wird (Barka et al., 2004). Des Weiteren könnte das von sterbenden Zellen freigesetzte GFP

durch Endocytose von den Zellen aufgenommen werden. Auch hierbei wird das GFP in Vesikeln durch die Zelle transportiert. Da bei der Protein Extraktion mit Saponin hauptsächlich lösliche cytosolische Proteine entweichen, bleiben Proteine in Vesikeln weiter in den Zellen vorhanden. Bei etwa 70 % der Zellen fand jedoch eine vollständige Entfärbung der Zellen statt, das im Cytosol und im Zellkern befindliche GFP ist hierbei komplett aus den Zellen entwichen.

## **4.5 Lokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in stabil transfizierten CHO-Zellen**

Nach der erfolgreichen Etablierung einer stabilen His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zelllinie wurde zusätzlich die Lokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in CHO-Zellen untersucht. Rab11 ist an dem Vesikeltransport innerhalb der Zelle beteiligt und spezifisch auf Membranoberflächen von Vesikeln wie dem Recycling Endosom und dem Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert (Urbé et al., 1993; Ullrich et al., 1996; Wilcke et al., 2000). Die Untersuchung der stabil transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte jedoch zunächst nicht die erwartete Lokalisation des Proteins Rab11. Anhand der Kopplung von Rab11 mit dem GFP konnte das Rab11 unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Eine genaue Lokalisation des Proteins war nicht möglich, da das His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 auch im Cytosol vorhanden war, was zu einer diffusen Fluoreszenz in den Zellen führte. Des Weiteren war His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 im Zellkern vorhanden. Es konnten lediglich Bereiche mit erhöhter His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 Konzentration in den Zellauswüchsen und um den Zellkern erkannt werden. Die typische Fluoreszenz eines membrangebundenen Proteins konnte nicht festgestellt werden. Auch endogenes Rab11 befindet sich zu etwa 50 % im Cytosol, durch die Überexpression des Proteins kommt es in diesem Fall zu einem deutlichen Anstieg der Rab11-Konzentration im Cytosol (Ullrich et al., 1993). Eine mögliche Ursache hierfür kann die Überforderung der Proteinmodifikation sein. Durch die erhöhte Rab11 Konzentration wird der Lipidrest, der für die Lokalisation eines Proteins verantwortlich ist, nicht mehr korrekt an das Protein gebunden. Das His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 wird dadurch nicht mehr zu den spezifischen Membranen transportiert, sondern verbleibt im Cytosol.

Die Lokalisation von endogenem Rab11 in nicht transfizierten CHO-Zellen wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz überprüft und mit der des exogenen His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 ver-

glichen. Hierbei wurden die Zellen mit einem gegen das Rab11 gerichteten primären und einem FITC-markierten sekundären Antikörper behandelt. Rab11 zeigte sich spezifisch membrangebunden in perinuklearen Bereichen.

Die Unterschiede in der Fluoreszenz zwischen den stabil transfizierten und nicht transfizierten Zellen lassen sich durch die Überexpression des Proteins Rab11 erklären (Savina et al., 2002). Gutierrez et al. beobachteten 2004 ebenfalls eine cytosolische Fluoreszenz bei stabil GFP-Rab7 transfizierten CHO-Zellen.

Mit der Saponin Extraktion sollten cytosolische Proteine, hauptsächlich das cytosolisch vorhandene His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in stabil His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen, entfernt werden. Die Protein Extraktion war allerdings nicht vollständig, etwa 50 % der Zellen zeigten keine Veränderungen. Bei der anderen Hälfte war entweder gar keine Fluoreszenz mehr feststellbar oder aber die zu erwartende spezifische in Bereichen um den Zellkern oder den Zellauswüchsen. Um dieses jedoch eindeutig als spezifische Rab11, d.h. endosomale Lokalisation zu charakterisieren, wurde der Transferrin-Rezeptor, der durch das Rab11-positive Recycling Endosom wandert, als Marker verwendet. Stabil transfizierte Zellen wurden erneut mit Antikörpern behandelt, diesmal aber gegen den Transferrin-Rezeptor. Dieser wird bei der Endocytose durch Vesikel durch die Zelle transportiert. Genau wie das Rab11 ist er dabei mit dem Recycling Endosom verbunden (Ullrich et al., 1996). Eine Kolokalisation beider Signale konnte in einigen Bereichen der Zelle festgestellt werden. Eine vollständige Kolokalisation war auch nicht zu erwarten, da das Rab11 zusätzlich auch noch auf dem Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert ist (Ullrich et al., 1996). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass trotz der Überexpression des Proteins Rab11 dieses noch an den spezifischen Membranen in den Zellen lokalisiert ist. Die typische Bindung von Rab11 in den Zellen am Recycling Endosom wird durch die Transfektion nicht gestört. Eine Fehllokalisierung, wie dies bei einer Überexpression oft auftritt, scheint hier nicht vorzuliegen. Die stabil transfizierten Zellen lassen sich somit für die geplante Subproteom-Analyse verwenden.

## **4.6 Bewertung der Stabilität der transfizierten Zellen**

Die in dieser Arbeit etablierten stabilen Zelllinien gingen aus einer einzigen Zelle hervor. Damit sollten einheitliche Eigenschaften in der gesamten Zelllinie geschaffen werden. Während der Kultivierung zeigten sich jedoch deutliche Unterschieden innerhalb der Zellen. Der

deutlichste und am besten zu erkennende war hierbei der Unterschied in der Stärke der Fluoreszenz. Innerhalb einer Zellpopulation kamen stärker fluoreszierende Kolonien vor. Der Grund für diese Abweichungen ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die von Natur aus individuelle Expression der Gene dafür verantwortlich ist, auch die Transkriptionsrate hängt vom Zellzyklus ab und ist so von Zelle zu Zelle verschieden. Ebenfalls kann der Mechanismus der Umwandlung des GFP in die fluoreszierende Form oder das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Sekretion dafür verantwortlich sein (Barka et al., 2004).

Bei längerer Kultivierung der Zellen ist ein vollständiger Verlust der Fluoreszenz aufgetreten. Die Expression des Fusionsproteins oder nur des GFP fand nicht mehr statt. Da dieses bei beiden Zelllinien, der His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden und der GFP exprimierenden, in dem gleichen Maß auftrat, liegt es weder an der Größe des Proteins noch an dem Protein Rab11 alleine. Die Vektor-DNA wurde bei der Transfektion zufällig in das Genom der Zellen eingebaut. Während der Kultivierung kommt es immer wieder zu Veränderungen des Genoms, hierbei wird auch die fremde Vektor-DNA in einigen Fällen wieder ausgebaut (Mülhardt, 2002). Der Ausbau erfolgt dabei nicht unbedingt komplett, so dass einige Gene weiterhin vorhanden sein können. Bei der Kultivierung der stabilen Zelllinien wurde bei einigen Zellen das Gen für das GFP ausgebaut, das Resistenzgen gegen Neomycin blieb weiterhin erhalten, so dass es zu nicht fluoreszierenden aber G418-resistenten Zellen kam, die vitaler waren und die Kultur überwuchsen.

## 5 Zusammenfassung

Proteine sind an komplexen Vorgängen in eukaryotischen Zellen beteiligt. Die Gesamtheit aller Proteine innerhalb einer Zelle unter definierten Bedingungen wird als Proteom bezeichnet. Ein besseres Verständnis für die Abläufe und für physiologische und pathologische Vorgänge innerhalb der Zellen ist das Ziel der Proteom-Analyse. Bei der Untersuchung von komplexen Proteingemischen in Zellorganellen (Subproteom) können neben den Unterschieden in der Expression auch Interaktionen, Lokalisationen und Modifikationen von bestimmten Proteinen identifiziert werden. Zur vereinfachten Isolierung von Zellorganellen dienen hier erstmals so genannte „tags“, mit denen spezifische, organell-assoziierte Proteine markiert werden und sich mit Hilfe der Affinitätschromatographie aufreinigen lassen.

In dieser Arbeit wurde eine stabile Zelllinie etabliert, welche das Fusionsprotein His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimiert. Rab11 gehört zu den RabGTPasen und reguliert im endocytischen Transport das Recycling von Molekülen zwischen den Endosomen und der Plasmamembran. Darüber hinaus ist es im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisiert. Hierfür wurden zunächst das Gen für Rab11 und die His-tag-Sequenz in den Vektor pAcGFP-C2 kloniert. Mit dem biologischen Transfektionsreagenz Fugene6 wurde der Vektor in CHO-Zellen transfiziert. Mit Hilfe des Green Fluorescent Proteins (GFP) im Fusionsprotein konnten transfizierte Zellen durch die Fluoreszenz identifiziert werden. Stabil transfizierte Zellen wurden mit dem Aminoglykosidantibiotikum G418 (Geneticin) selektioniert. Aufgrund der geringen Anzahl der vollständig und stabil transfizierten Zellen von maximal 5 % und der nicht ausreichenden Selektion durch G418 mussten stabil transfizierte Zellen mit einer mechanischen Methode isoliert werden. Hierfür wurden fluoreszierende Zellkolonien mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale gelöst und in eine neue Zellkulturschale überführt. Durch Verdünnung der Zellen wurden einzelne Zellklone isoliert.

Nach der erfolgreichen Herstellung der stabilen Zelllinie wurde mit Hilfe der Fluoreszenz die Lokalisation des Proteins His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 überprüft. Aufgrund der Überexpression des Proteins kam es zu einer diffusen cytosolischen Fluoreszenz innerhalb der Zellen und dem Zellkern. Erst nach einer Extraktion der löslichen Proteine mit Saponin konnte die spezifische Lokalisation von Rab11 auf den Membranen im Bereich um den Zellkern und dessen Lokalisation mit dem endosomalen Markerprotein Transferrin-Rezeptor nachgewiesen werden.

## 6 Literatur

- Barka, T., E. S. Gresik and S. C. Henderson.** Production of Cell Lines Secreting TAT Fusion Proteins. *J. Histochem. Cytochem.*, 2004, 52:469-477.
- Bartz, R., C. Benzing and O. Ullrich.** Vesikeltransport: Wie Zellen Proteine versenden. *BIOforum*, 2001, 9:587-588.
- Bartz, R., Benzing, C. and O. Ullrich.** Reconstitution of transport to recycling endosomes in vitro. *Methods Enzymol*, 2005, 404:480-490.
- Bliel, J. D. and M. S. Bretscher.** Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells. *EMBO J.*, 1982, 1:351-355.
- Bourne, H., D. Sanders and F. McCormick.** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, 1991, 349:117-127.
- Chavrier, P. and B. Goud.** The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999, 11:466-475.
- Chen, W., Y. Feng, D. Chen and A. Wandinger-Ness.** Rab11 Is Required for Trans-Golgi Network-to-Plasma Membrane Transport and a Preferential Target for GDP Dissociation Inhibitor. *Mol. Biol. Cell*, 1998, 9:3241-3257.
- Christea, I. M., S. J. Gaskell and A. D. Whetton.** Proteomics techniques and their application to hermatology. *Blood*, 2004, 103:3624-3634.
- Dunn, K. W., T. E. McGraw and F. R. Maxfield.** Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.*, 1989, 109:3303-3314.
- Gassen, H. G. and G. Schimpf.** *Gentechnische Methoden*. 1999, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Gosh, R. N. and F. R. Maxfield.** Evidence for nonvectoral, retrograde transferrin trafficking in the early endosoms of HEP2 cells. *J. Cell Biol.*, 1995, 128:549-561.
- Gruenberg, J. and F. R. Maxfield.** Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1995, 3:626-633.
- Gutierrez, M. G., D. B. Munafó, W. Berón and M. I. Colombo.** Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J. Cell. Sci.*, 2004, 117:2687-2697.
- Hopkins, C. R. and I. S. Trowbridge.** Internalization and processing of transferrin and the transferrin receptor in human carcinoma A431 cells. *J. Cell Biol.*, 1983, 97:508-521.



- Hopkins**, C. R., A. Gibson, M. Shipman, D. K. Stickland and I. S. Trowbridge. In migrating fibroblasts, recycling receptors are concentrated in narrow tubules in the pericentriolar area, and then routed to the plasma membrane of the leading lamella. *J. Cell Biol.*, 1994, 125:1265-1274.
- Huber**, L. A., K. Pfaller and I. Vietor. Organelle Proteomics: Implication for Subcellular Fractionation in Proteomics. *I. Circ. Res.*, 2003, 2:926-968.
- Klausner**, R-D., G. Ashwell, J. van Renswoude, J. B. Harford and K. R. Bridges. Binding of Apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferring cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, 80:2263-2266.
- Koch-Brandt**, C., *Gentransfer*. 1993, Thieme Verlag.
- Kumar**, A. and M. Snyder. Protein complexes take the bait. *Nature*, 2002, 415:123-124
- Lapierre**, L. A., R. Kumar, C. M. Hales, J. Navarre, S. G. Bhartur, J. O. Burnette, D. W. Provance, J. A. Mercer, M. Bähler and J. R. Goldenring. Myosin Vb Is Associated with Plasma Membrane Recycling System. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12:1843-1857.
- Lodish**, H., A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore and J. E. Darnell. *Molekulare Zellbiologie*. 2001, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mellman**, I. Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review Cell.Dev.Biol.*, 1996, 12:575-625.
- Morgan**, E. H. Inhibition of reticulocyte iron uptake by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and  $\text{CH}_3\text{NH}_2$ . *Biochem. Biophys. Acta.*, 1981, 642:119-134.
- Mülhardt**, C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. 2002, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
- Nielson**, E., F. Severin, J. M. Backer, A. A. Hyman and M. Zerial. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nature Cell Biol.*, 1999, 1:376-382.
- Pearse**, B. M. F. Coated vesicles from human placenta carry ferritin, transferrin and immunoglobulin G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79:451-455.
- Pfeffer**, S. and D. Aivazian. Targeting Rab-GTPases to distinct Membrane compartments. *Mol. Cell Biol. Review*, 2004, 5:886-896.
- Pfeffer**, S. R. Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.*, 2001, 12:487-491.
- Prasher**, D. C. Primary Structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. 1992, *Gene*, 111:229-233.
- Rao**, K., J. van Renswoude, C. Kempf and R. D. Klausner. Separation of  $\text{Fe}^{3+}$  from transferrin in endocytosis: Role of the acidic endosome. *FEBS Lett.*, 1983, 160:213-216.

- Savina, A., C. M. Fader, M. T. Damiani and M. I. Colombo.** Rab11 Promotes Docking and Fusion of Multivesicular Bodies in a Calcium-Dependent Manner. *Traffic*, 2005, 6:131-143.
- Savina, A., M. Vidal and M. I. Colombo.** The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J. Cell. Sci.*, 2002, 115:2505-2515.
- Seabra, M. C. and C. Wasmeier.** Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004, 16:451-457.
- Sheff, D., E. A. Daro, M. Hull and I. Mellman.** The Receptor Recycling Pathway Contains Two Distinct Populations of Early Endosomes with Different Sorting Functions. *J. Cell Biol.*, 1999, 145:123-139.
- Sönnichsen, B., S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf and M. Zerial.** Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J. Cell Biol.*, 2000, 149:901-913.
- Trischler, M., W. Stoorvogel and O. Ullrich.** Biochemical analysis of distinct Rab5- and Rab11-positive endosomes along the transferrin pathway. *J. Cell Sci.*, 1999, 112:4773-4783.
- Trowbridge, I. S., J. F. Collawn and C. R. Hopkins.** Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu., Rev. Cell Biol.*, 1993, 9:129-161.
- Ullrich, O., H. Stenmark, K. Alexandrov, L. A. Huber, K. Kaibuchi, T. Sasaki, Y. Takai and M. Zerial.** Rab GDP Dissociation Inhibitor as a General Regulator for the Membrane Association of Rab Proteins. *J. B. C.*, 1993, 24:18143-18150.
- Ullrich, O., H. Horiuchi, C. Bucci and M. Zerial.** Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature*, 1994, 368:157-160.
- Ullrich, O., S. Reinsch, S. Urbe, M. Zerial, and R. G. Parton.** Rab11 Regulates Recycling through the pericentriolar Recycling Endosome. *J. Cell Biol.*, 1996, 135:913-924.
- Urbé, S., L. A. Huber, M. Zerial, S. A. Tooze and R. G. Parton.** Rab11, a small GTPase associated with both constituted and regulated secretory pathway in PC12 cells. *FEBS (Fed. Euro. Biochem. Soc.)*, 1993, 334:175-182.
- Van der Sluijs, P., M. Hull, P. Webster, P. Mâle, B. Goud and I. Mellmann.** The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, 1992, 70:729-740.
- Watts, C. and M. Marsh.** Endocytosis: what goes in and how?. *J. Cell Sci.*, 1992, 103:1-8.
- Wilcke, M., L. Johannes, T. Galli, V. Mayau, B. Goud and J. Salamero.** Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *Eur. J. Cell Biol.*, 2000, 53:173-184.

**Wilson**, G. M., A. B. Fielding, G. C. Simon, X. Yu, P. D. Andrews, R. S. Hames, A. M. Frey, A. A. Peden, G. W. Gould and R. Prekeris. The FIP3-Rab11 Protein Complex Regulates Recycling Endosome Targeting to the Cleavage Furrow during Late Cytokinesis. *Mol. Biol. Cell*, 2005, 16:849-860.

**Wink**, M. *Molekulare Biotechnologie*. 2004, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

**Yamashiro**, D. J., B. Tycko, S. R. Fluss and F. R. Maxfield. Segregation of transferrin of mildly acidic (pH 6,5) para Golgi-compartments in the recycling pathway. *Cell*, 1984, 37:789-800.

**Zerial**, M. and H. McBride. RAB Proteins as membrane organizers. *Mol. Cell Biol.*, 2001, 2:107-119.

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CHO	Chinese hamster ovary
Cy3	Carbocyanin 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPE	Dioleylphosphatidylethanolamin
DOTMA	1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum
G418	Aminoglycosidantibiotikum Geneticin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HeLa	Zelllinie aus einem Cervixkarzinom
His	Histidin-Aminosäure
His-tag	Aminosäuresequenz mit sechs aufeinander folgenden Histidin-Aminosäuren
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
LB	Luria Broth
LDL	Low Density Lipoprotein
MCS	Multiple Cloning Site
MEM	Minimum Essential Medium
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UV	Ultraviolett

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Der Ablauf vom Genom zum Proteom
- Abbildung 1.2 Endocytose- und Exocytoseweg in eukaryotischen Zellen
- Abbildung 1.3 Aufbau einer RabGTPase
- Abbildung 1.4 Lokalisation der Rab-Proteine in einer eukaryotischen Zelle
- Abbildung 1.5 a) Struktur des GFP b) Fluoreszierende Qualle *Aequorea coerulescens*
- Abbildung 1.6 Strategie zur Herstellung einer stabilen Zelllinie
- Abbildung 2.1 Vektor pAcGFP-C2
- Abbildung 2.2 a) Vektor pCR-TOPO-His<sub>6</sub>-GFP b) Vektor pGEM-rab11
- Abbildung 2.3 Morphologie von CHO-Zellen 48 Stunden nach der Passagierung
- Abbildung 2.4 Morphologie von HeLa-Zellen 48 Stunden nach der Passagierung
- Abbildung 2.5 Papierstückchen in einer 10 cm-Kulturschale
- Abbildung 2.6 Klonierungszyylinder in einer 35 mm-Kulturschale
- Abbildung 2.7 Mit einem Zellschaber wird eine Kolonie abgeschabt
- Abbildung 3.1 Vorstellung von der Lokalisation des Fusionsproteins auf dem Recycling Endosom
- Abbildung 3.2 Überprüfung einer erfolgreiche Ligation mit Hilfe eines Agarosegels
- Abbildung 3.3 Isolierung des His-tags mit Hilfe eines Agarosegels
- Abbildung 3.4 Vektor pAcGFP-C2-rab11-His<sub>6</sub>
- Abbildung 3.5 CHO-Zellen 1-2 Tage nach der Transfektion mit Lipofectamine2000
- Abbildung 3.6 CHO-Zellen 7 Tage nach der Transfektion mit Lipofectamine2000
- Abbildung 3.7 HeLa-Zellen 2 Wochen nach der Transfektion mit Lipofectamine2000
- Abbildung 3.8 CHO-Zellen 3 Tage nach der Transfektion mit Fugene6
- Abbildung 3.9 CHO-Zellen 10 Tage nach der Transfektion mit Fugene6
- Abbildung 3.10 CHO-Zellen 5 Tage nach dem Aussäen in 10 cm-Kulturschalen
- Abbildung 3.11 Fluoreszierende CHO-Zellen vor dem Abschaben mit einem Zellschaber
- Abbildung 3.12 Lokalisation von GFP in CHO-Zellen
- Abbildung 3.13 Lokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in CHO-Zellen
- Abbildung 3.14 Lokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in CHO-Zellen
- Abbildung 3.15 Immunfluoreszenzanalyse von Rab11 und His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 in CHO-Zellen
- Abbildung 3.16 Mehrere Zellkerne bei His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden CHO-Zellen
- Abbildung 3.17 Mehrere Zellkerne in deutlich vergrößerten Zellen bei His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden Zellen
- Abbildung 3.18 Besonderheiten bei GFP exprimierenden Zellen
- Abbildung 3.19 Unterschiede in den Intensitäten der Fluoreszenz
- Abbildung 3.20 Verlust der Fluoreszenz bei einzelnen GFP exprimierenden CHO-Zellen
- Abbildung 3.21 Verlust der Fluoreszenz bei einzelnen His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierenden CHO-Zellen
- Abbildung 3.22 Stabil His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierende CHO-Zellen 4 Wochen nach dem Einfrieren
- Abbildung 3.23 GFP exprimierende CHO-Zellen mit Saponin extrahiert
- Abbildung 3.24 His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 exprimierende CHO-Zellen mit Saponin extrahiert
- Abbildung 3.25 Kolokalisation von His<sub>6</sub>-GFP-Rab11 und dem Transferrin-Rezeptor

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Typische Reaktion mit Restriktionsenzymen in einem Gesamtvolumen von 50 $\mu$ l
Tabelle 2.2	Typische Volumen bei der Ligation von Vektor und Fragment
Tabelle 2.3	Passagieren der verschiedenen Zellkulturgefäße, Angabe von Kulturgefäß und Volumen
Tabelle 2.4	Transfektion mit Lipofectamine2000, benötigte Volumina für eine Vertiefung einer 24-well-Platte
Tabelle 2.5	Verwendete primäre Antikörper
Tabelle 2.6	Verwendete sekundäre Antikörper
Tabelle 3.1	Ergebnisse bei der Verdünnung der Zellen in 96-well-Platten

# Anhang

## Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Cat. Nr.</b>	<b>Lot. Nr</b>
Agarose	Cambrex	840004	AG4675
Amino Acids (100x)	Biochrom	K0293	0758G
DMSO	Sigma	472381	07653EC
EGTA	Sigma	E4379-10G	014K5424
Ethidiumbromid	Roth	2218.1	50257297
FKS	Sigma	12070-106	40G5941K
Fugene6	Roche	11815091001	93363724
Geneticin (G418)	Gibco	10131-019	3104943
Ham's F12	Biochrom	FG0815	0797G
HEPES 1 M	Biochrom	L1613	1112G
LB Agar	Roth	X965.1	40026011
LB Medium	Roth	X964.1	12570798
L-Glutamine	Gibco	K0283	0125G
Lipofectamine2000	Invitrogen	52887	1255281
Mowiol	Calbiochem	475904	B23468
Natrium Bicarbonat	Biochrom	L1713	0867H
Natrium Pyruvat	Biochrom	L0473	0183H
OptiMEM I	Gibco	31985-047	33097690
Paraformaldehyd	Sigma	P-6148	3840574
PBS <sup>-</sup>	Biochrom	L182-50	1160G
Penicillin/ Streptomycin	Gibco	15140-122	1237306
PIPES dipotassium salt	Sigma	P7643-25G	030K5409
Saponin	Riedel	k.A.	k.A.
TBE Puffer (10x)	Roth	3061.2	05569948
Trypsin/EDTA	Biochrom	L2143	0505H

**Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agarosegelkammer	Pharmacia Biotech
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder
Inkubator, 37 °C	Heraeus
Kühltruhe, -20 °C	Liebherr
Kühltruhe, 4 °C	Liebherr
Kühltruhe, -80 °C	Heraeus
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX41
Mikroskop	Zeiss, Axiovert 40CSL
Schüttelschrank	GFL
Spectrophotometer, SmartSpec Plus	Bio-Rad
Sterilwerkbank	Hera Safe, Kendro Laboratory
UV-Tisch	LTF Labortechnik
Wasserbad	GFL
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R, Heraeus

**Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen



**Material**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
24-well-Platte	Nunc Brand Products, Nunclon
96-well-Platte	Nunc Brand Products, Nunclon
Deckgläschen	Menzel Classic
Kryoröhrchen	Nunc Brand Products, Nunclon
Kulturschale, 10 cm	Nunc Brand Products, Nunclon
Kulturschale, 35 mm	Nunc Brand Products, Nunclon
Mikroreaktionsgefäße, 1,5 ml	eppendorf
Objektträger	Roth
Parafilm	American National Can
Pinzette	Rubis, Switzerland
Pipetten 0,5-10 $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l, 100-1000 $\mu$ l	eppendorf
Pipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Falcon
sterile Pipettenspitzen	eppendorf
Röhrchen, 15 ml, 50 ml	Falcon
UV-Küvetten	Roth
Zellkulturflasche, T75	Nunc Brand Products, Nunclon