

2. Material und Methoden

2.1	Allgemeine Geräte	28
2.2	Häufig verwendete Reagenzien, Chemikalien und Puffer	28
2.3	Antikörper und Antiseren	29
2.4	Oligonukleotide	30
2.5	Tiere und Tierversuche	30
2.6	Manipulation und Propagation von DNA	33
2.7	Kultivierung und Manipulation der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293	36
2.8	Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie von fixierten Zellen	38
2.9	Vertikale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	39
2.10	Western Blot-Analysen	40
2.11	Herstellung von Zell- und Gewebelysaten	41
2.12	<i>Pulse-Chase</i> Experimente	42
2.13	Rekombinante Proteinexpression und Affinitätsaufreinigungen	43
2.14	Kombinierte <i>in vitro</i> -Transkription und –Translation	45
2.15	Subzelluläre Fraktionierung von Mäusenieren	45
2.16	Mitochondrienimport-Experimente, <i>Protease Protection Assays</i> und Analyse der Membranassoziation	47
2.17	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	48
2.18	Internetressourcen zur Proteinsequenzanalyse	49
2.19	RNA-Präparation und Genchip-Analysen	49
2.20	RT-PCR	50
2.21	<i>in situ</i> -Hybridisierung	50

2.1 Allgemeine Geräte

Alle photometrischen Messungen wurden in einem *Ultrospec3100 pro* Spektrophotometer von Amersham Biosciences durchgeführt. Das Gerät verfügt über einen eingebauten Computer zur Berechnung von Konzentrationen bei allen gängigen Meßmethoden der Molekularbiologie.

Zur Zentrifugation von 1,5 ml- oder 2 ml-Reaktionsgefäßen wurden Eppendorf 5415 D bzw. 5417 R-Kühlzentrifugen eingesetzt. Zentrifugationen im größeren Maßstab wurden in einer Herolab Hicen 21-Kühlzentrifuge durchgeführt, Ultrazentrifugationen in einer Beckman-Coulter Optima LE-80K Ultrazentrifuge, bzw. in einer Beckman-Coulter Optima TLX Tischultrazentrifuge. Zentrifugationen von 15 ml- bzw. 50 ml-Röhrchen erfolgten in Eppendorff 5810 R Kühlzentrifugen.

Zum Aufschließen von Bakterien- und Mitochondrienmembranen wurde ein *Sonoplus* Ultraschallgenerator (Bandelin Electronics) verwendet und stets bei 30 % Leistung betrieben.

2.2 Häufig verwendete Reagenzien, Chemikalien und Puffer

Alle nicht besonders vermerkten Substanzen und Chemikalien wurden als analysenreine Reagentien von den Firmen Roche Biochemicals (Mannheim), Applichem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Gibco/BRL (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Difco (Augsburg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

2.2.1 Protease- und Phosphatase-Inhibitoren

Um ein möglichst großes Spektrum von Proteasen zu inhibieren, wurde eine Mischung verschiedener Protease-Inhibitoren (alle von Applichem) verwendet, deren Wirkspektrum und Endkonzentration im folgenden aufgeführt sind. Zur Inhibition von Metalloproteasen wurde einigen Puffern Ethylendiamintetraacetat (EDTA) hinzugefügt.

Tabelle 2.1 verwendete Proteaseinhibitoren

Inhibitor	Spezifität	Endkonzentration
Aprotinin	Serinproteasen	2 µg/ml
Benzamidin-HCl	Serinproteasen	1 mM
Leupeptin	Thiol-, Serin- und Cysteinproteasen	1 µg/ml
Pepstatin A	saure Proteasen	1 µg/ml
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serin- und einige Cysteinproteasen	25 µg/ml (0,14 mM)

Wenn der Phosphorylierungsstatus von Proteinen untersucht werden sollte, wurden den jeweils verwendeten Lysepuffern die Phosphatase-Inhibitoren Natriumorthovanadat und Natriumfluorid in den Endkonzentrationen 2,5 μM bzw. 10 μM zugesetzt.

2.2.2 Bakterienmedium und häufig verwendete Puffer

PBS-Puffer:

1,9 mM Natriumdihydrogenphosphat
8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat
154 mM NaCl
pH 7,4

STE-Puffer:

10 mM Tris, pH 7,5
1 mM EDTA
250 mM Sucrose
Protease-Inhibitoren (siehe Kapitel 2.2.1)

HSL-Puffer:

20 mM Hepes, pH 7,4
350 mM NaCl
1 mM MgCl_2
0,5 mM EDTA
0,1 mM EGTA
1 % [v/v] NP-40
0,5 mM DTT
Protease-Inhibitoren (siehe Kapitel 2.2.1)

LB-Bakterienmedium:

1 % [w/v] Trypton
0,5 % [w/v] Hefe Extrakt
0,5 % [w/v] NaCl

In dieser Arbeit wurde für alle Baktereinkulturen LB-Medium verwendet. Medium wurde grundsätzlich autoklaviert. Falls erforderlich, enthielten Bakterienmedien 25 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin oder 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin. Die Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren bei höchstens 60°C zugesetzt. Zum Gießen von LB-Agar-Platten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % [w/v] Agar zugefügt.

2.3 Antikörper und Antiseren

Die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren und aufgereinigten Antikörper sind in der Tabelle 2.2 aufgelistet. Zusätzlich sind die verwendeten Verdünnungen für Western Blot-Analysen auf Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen, sowie für die Immunpräzipitation (IP) angegeben.

Tabelle 2.2 In dieser Arbeit verwendete Antiseren und Antikörper

Name	Organismus und Typ	Hersteller/Quelle	verwendete Verdünnung
α -BiP/Grp78	IgG, monoklonal, Maus	Becton Dickinson	1:500 (Nitrozellulose)
α -CytochromC	IgG, monoklonal, Maus	Santa Cruz	1:5000 (Nitrozellulose)
α -GAPDH	IgG, monoklonal, Maus	Chemicon	1:2.500.000 (PVDF) 1:500.000 (Nitrozellulose)
α -EGFP	Kaninchen-Serum	Dr. Ralf Schüle	1:100 (IP)
α -EGFP	IgG, monoklonal, Maus	Chemicon	1:50.000 (PVDF)
α -Flag M2	IgG, monoklonal, Maus	Sigma	1:10.000 (PVDF)
α -Histon H1	IgG, monoklonal, Maus	Santa Cruz	1:1000 (Nitrozellulose)

Tabelle 2.2 In dieser Arbeit verwendete Antiseren und Antikörper

Name	Organismus und Typ	Hersteller/Quelle	verwendete Verdünnung
α -Hsp60	IgG, monoklonal, Maus	Stressgen	1:4000 (Nitrozellulose)
α -NDRG1	aufgereinigtes Ziegen-Serum	Dr. James Murray	1:100.000 (PVDF)
α -Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	IgG, monoclonal, Maus	Upstate Biochemicals	1:10.000 (PVDF)
α -p3T NDRG1	aufgereinigtes Ziegen-Serum	Dr. James Murray	1:20.000 (PVDF)
α -Sgk1	Kaninchen-Serum	Dr. Cecilia Canessa	1:5000 (PVDF)
α -Sgk1	Kaninchen-Serum	Dr. James Murray	1:2000 (PVDF)
α -Sgk1	polyklonales Kaninchen-IgG	Sigma	1:50.000 (PVDF)
α -Sgk1	polyklonales Kaninchen-IgG	Cell Signaling Technologies	1:2000 (PVDF)
α -Smac/Diablo	polyklonales Kaninchen-IgG	ProSci, Poway, Californien, USA	1:1000 (Nitrozellulose)

2.4 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Invitrogen bzw. MWG Biotech bezogen. Alle Oligonukleotide wurden als Primer für PCR-Reaktionen verwendet. Angefügte Restriktionsschnittstellen sind in den Sequenzen unterstrichen. Die Namen der jeweiligen Restriktionsnukleasen sind immer Bestandteil des Oligonukleotidnamens. Start- und Stopcodons eines Leserasters sind fett dargestellt. Oligonukleotide, die ein neues Startkodon einfügen, wurden zusätzlich um eine Kozak-Sequenz erweitert. Alle zur Klonierung eingesetzten Oligonukleotide, die nicht zur Generierung von Punktmutationen verwendet wurden, finden sich in Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3 In dieser Arbeit zur Klonierung verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (Orientierung 5' → 3')	Verwendung
NDRG1EcoRI5'	<u>CGAATTC</u> ACGGAA ATG TCCCCGAGAGCT	Klonierung von NDRG1 in pEGFP-N1
NDRG1BamHI3'	GCGGAT <u>CCGCGCAGGACACCTCCATGGACTT</u>	
Sgk1BamHI5'	GGGGAT <u>CCACC</u> ATG ACCGTCAAAGCCGAG	Generierung verschiedener Sgk1 Varianten
Sgk1EcoRI3'	CCGAAT <u>TCA</u> GAGGAAGGAATCCACAGG	Generierung verschiedener Sgk1 Varianten
Sgk1EcoRI3'Flag	GGGAAT <u>CTACTTGTGTCGTGTCCTTG-TAGT</u> CGAGGAAGGAATCCACAGG	Anhängen eines Flag-tag (kursiv) an den C-Terminus von Sgk1
Sgk1BamHI3'	CCGGAT <u>CCGAGGAAGGAATCCACAGG</u>	Generierung 3'Ende ohne Stopcodon
Sgk1d1-16BamHI5'	GGGGAT <u>CCCCACC</u> ATG AGGGGAATGGTAGCG	Generierung Δ 1-16 Varianten
Sgk1d1-33BamHI5'	GGGGAT <u>CCCCACC</u> ATG GGCCTGAACGATTTT	Generierung Δ 1-32 Varianten
Sgk1d1-47BamHI5'	GGGGAT <u>CCCCACC</u> ATG GCATGCAAACACGCT	Generierung Δ 1-47 Varianten
Sgk1d1-59BamHI5'	GGGGAT <u>CCCCACC</u> ATG TCCCATCCTCAGGAG	Generierung Δ 1-59 Varianten
Sgk1d60-431BamHI3'	CCGGAT <u>CCATTTTCAAATGGACTGA</u>	Generierung von Δ 60-431 Varianten
Sgk1 1-16KpnI3'	CGGGGT <u>ACCTCTGGAGTAGGTAAGGGT</u>	Generierung der 1-16 Variante
Sgk1 1-32KpnI3'	CGGGGT <u>ACCCCTCTCTGTTTCATAAA</u>	Generierung der 1-32 Variante
Sgk1 1-47KpnI3'	CGGGGT <u>ACCATAGGTGTTGCTGGCAAT</u>	Generierung der 1-47 Variante

Tabelle 2.3 In dieser Arbeit zur Klonierung verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (Orientierung 5' → 3')	Verwendung
Sgk1-N-NoI3'	TTATGATCTAGAGTCGCGGCCGCT	bindet am 3'-Ende der EGFP-cDNA in pEGFP-N-Plasmiden; Generierung von Sgk1-EGFP-Deletionsvarianten
Sgk1d1-289EcoRI5'	GGGAATTCCCATGCTCTACGGCCTGCCC	Generierung von Sgk1 290-431 für die rekombinante Expression in E.coli
Sgk1pGEX3'AflIII	CCACATGTTAGAGGAAGGAATCCACAGG	

Oligonukleotide, mit deren Hilfe eine Punktmutationen in der Sgk1-Sequenz generiert wurde, sind in Tabelle 2.4 aufgelistet. Die ausgetauschten Nukleotide sind invertiert dargestellt.

Tabelle 2.4 Oligonukleotide zum Einfügen von Punktmutationen in Sgk1

Name	Sequenz (Orientierung 5' → 3')	Mutation
Sgk1-M1ABamHI5'	GGGGATCCGACG GC GACCGTCAAAGCCGAGGC	M1A
Sgk1-E53A-for	CACGCT GCC GTTTCAGTCCATTTTGAAA	E53A
Sgk1-E53A-rev	GGACTGAAC GC AGCGTGTTCATGCATA	
Sgk1-V54A-for	GCTGAA GCC CAGTCCATTTTGAAAATG	V54A
Sgk1-V54A-rev	AATGGACTG GC TTTCAGCGTGTTCATGC	
Sgk1-Q55A-for	GAAGTT GC TCCATTTTGAAAATGTCC	Q55A
Sgk1-Q55A-rev	CAAAATGGAG GC AACTTCAGCGTGTTCGA	
Sgk1-S56A-for	GTTTCAG GCC ATTTTGAAAATGTCCCAT	S56A
Sgk1-S56A-rev	TTTCAAAT GC CTGAACTTCAGCGTGTTC	
Sgk1-I57A-for	CAGTCC GC TTGAAAATGTCCCATCCT	I57A
Sgk1-I57A-rev	CATTTTCAA GC GGACTGAACTTCAGCGTG	
Sgk1-L58A-for	TCCATT GC AAAATGTCCCATCCTCAG	L58A
Sgk1-L58A-rev	GGACATTTT GC AAATGGACTGAACTTCAGC	
Sgk1-K59A-for	ATTTT GC CATGTCCCATCCTCAGGAG	K59A
Sgk1-K59A-rev	ATGGGACAT GC CAAAATGGACTGAACTTC	
Sgk1-M60A-for	TTGAAA GC TCCCATCCTCAGGAGCCG	M60A
Sgk1-M60A-rev	AGGATGGGA GC TTTCAAATGGACTGAAC	
Sgk1-S61A-for	AAAAT GC CATCCTCAGGAGCCGGAG	S61A
Sgk1-S61A-rev	CTGAGGATG GC CATTTTCAAATGGACTG	
Sgk1-H62A-for	ATGTCC GC CCTCAGGAGCCGGAGCTT	H62A
Sgk1-H62A-rev	CTCCTGAGG GC GGACATTTTCAAATGGA	
Sgk1-P63A-for	TCCCAT GC CAGGAGCCGGAGCTTATG	P63A
Sgk1-P63A-rev	CGGCTCCTG GC ATGGGACATTTTCAAAT	
Sgk1-Q64A-for	CATCCT GC GAGCCGGAGCTTATGAAC	Q64A
Sgk1-Q64A-rev	CTCCGGCTC GC AGGATGGGACATTTTCAA	
Sgk1-E65A-for	CCTCAG GC CCGGAGCTTATGAACGCT	E65A
Sgk1-E65A-rev	AAGCTCCGG GC CTGAGGATGGGACATTTT	

Tabelle 2.4 Oligonukleotide zum Einfügen von Punktmutationen in Sgk1

Name	Sequenz (Orientierung 5' → 3')	Mutation
Sgk1-P66A-for	CAGGAG GCC GAGCTTATGAACGCTAAC	P66A
Sgk1-P66A-rev	CATAAGCTC GGC CTCCTGAGGATGGGACAT	
Sgk1-E67A-for	GAGCCG GCC CTTATGAACGCTAACCCC	E67A
Sgk1-E67A-rev	GTTTCATAAG GGC CGGCTCCTGAGGATGGGA	
Sgk1-L68A-for	CCGGAG GCC ATGAACGCTAACCCCTCT	L68A
Sgk1-L68A-rev	AGCGTTCAT GGC CTCCGGCTCCTGAGGATG	
Sgk1-K127Q-for	TATGCAGTC CAA GTTTTACAGAAGAAA	K127Q
Sgk1-K127Q-rev	TAAAAC TTG GACTGCATAGAATACTTC	
Sgk1-S422D $EcoRI$ 3'	GGGAATTCAGAGGAAGGAATCCACAGGAGGTGCATAG TC GAAGCC-GAGGAA	S422D

Für RT-PCR (siehe Kapitel 2.20) eingesetzte Oligonukleotide sind in Tabelle 2.5 zusammengefaßt.

Tabelle 2.5 Oligonukleotide für RT-PCR Analysen

Name	Sequenz (Orientierung 5'→3')	Nachweis von / <i>annealing</i> -Temperatur / Anzahl RCR-Zyklen
PDH-for	GGTATGGATGAGGAGCTGGA	Pyruvatdehydrogenase 57°C, 35 Zyklen
PDH-rev	CTTCCACAGCCCTCGACTAA	
CCL20-for	GCGCAAATCCAAAACAGACT	MIP3 α (<i>macrophage inflammatory protein 3α</i>) 55°C, 38 Zyklen
CCL20-rev	CAAGTCCAGTGAGGCACAAA	
IKBALPHA-for	ATCAGCCCTCATTTTGTGTC	IkB α 57°C, 33 Zyklen
IKBALPHA-rev	ACCACTGGGGTCAGTCACTC	
TNFAIP3-for	GGTCACAGGAAAGATGTGG	Tumornekrosefaktor α -induziertes Protein 3 57°C, 33 Zyklen
TNFAIP3-rev	AGCAACCACAAAGCACACAG	
TNFRSF9-for	GTGAATGGGACGAAGGAGAG	TNF-Rezeptor Superfamilie, Mitglied 9 55°C, 38 Zyklen
TNFRSF9-rev	TTTCTGCCCGTTTAACAAC	

2.5 Tiere und Tierversuche

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi) Berlin genehmigt (Projekt Nr. G0241/02). Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité Berlin, Campus Klinikum Benjamin Franklin, gehalten.

Es wurden Mäuse der Linie C57Bl/6, sowie Sgk1 knockout-Mäuse (Wulff *et al.*, 2002) und deren Wildtyp-Geschwister verwendet.

In dieser Arbeit wurde Mäusen 100 μ g/Kg Körpergewicht Dexamethason bzw. 25 mg/Kg Körpergewicht des Glutamatrezeptoragonisten Kainat intraperitoneal verabreicht. Kainat wurde in PBS gelöst.

Dexamethason wurde zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und in PBS mit 20% [v/v] DMSO appliziert. Dazu wurden die Tiere im Nacken und am Schwanzansatz fixiert, und die Substanzen mit einer Kanüle paramedian in die untere Hälfte des überstreckten Abdomens intraperitoneal injiziert.

Die Immunisierung eines Kaninchens zur Gewinnung eines spezifischen Antiserums und die damit verbundenen Blutentnahmen wurden von der Firma Biogenes in Berlin durchgeführt. Dabei wurden bei vier aufeinanderfolgenden Immunisierungen jeweils 0,5 mg Antigen zusammen mit Freund's inkomplettem Adjuvans subkutan injiziert. Vor dem Immunisierungsprotokoll, sowie eine Woche nach jeder Injektion wurden Blutentnahmen durchgeführt. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde das Tier ausgeblutet.

2.6 Manipulation und Propagation von DNA

2.6.1 Plasmide

In dieser Arbeit wurden die Plasmide pcDNA3.1(+) (Invitrogen), pEGFP-N3 und pEGFP-N1 (Clontech), pDsRed2 (Clontech), pGEX-KG (Guan & Dixon, 1991), pBluescriptII KS(+) (Stratagene) und pQE30 (Qiagen, Hilden) verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Fumarase- und NDRG1-cDNAs der Maus lagen jeweils in das Plasmid pSPORT6 einkloniert vor und wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH in Berlin (RZPD) bezogen. Zur Vermehrung in *E. coli* tragen alle Plasmide ein Gen, das für eine Ampicillin- oder Kanamycin-Resistenz kodiert.

2.6.2 Puffer

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Base
1 mM EDTA
mit Essigsäure auf pH 8,4 einstellen

6x DNA-Ladepuffer:

20% [w/v] Ficoll
100 mM EDTA
je 0,25% [w/v] Bromphenolblau und Xylencyanol

2.6.3 Manipulation von DNA mit Restriktionsendonukleasen, T4 Polymerase und Alkalischer Phosphatase

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen wird doppelsträngige DNA sequenzspezifisch an definierten Stellen hydrolysiert. Je nach Restriktionsenzym kommt es dabei zu 5'- oder 3'-Überhängen, oder zu glatten Enden. Mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut DNA-Fragmente können später ligiert werden. In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme der Firmen MBI Fermentas und New England Biolabs verwendet. In einem Reaktionsansatz von 10 µl wurden für die Hydrolyse von einem µg DNA 3 U Restriktionsenzym unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen eingesetzt. Für Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen wurden die Pufferbedingungen so gewählt, daß beide Enzyme ausreichende Aktivität hatten. Wo dies nicht möglich war, wurde nach Anpassung der Bedingungen sequentiell verdaut. Die Ansätze wurden für mindestens 60 min. bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Um kohäsive Enden zu glätten, wurde nach einem Restriktionsverdau die T4 Poly-

merase (MBI Fermentas) nach Erhöhung des Reaktionsvolumens genau nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach der Behandlung und Hitzeinaktivierung des Enzyms wurde zur Extraktion der Plasmid-DNA aus dem Reaktionsgemisch das Volumen mit H₂O auf 200 µl erhöht, 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, von Roth) hinzugegeben und gut gemischt. Nach fünfminütiger Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 14.000 UpM wurde die obere Phase abgenommen, die darin enthaltene DNA mit 600 µl Ethanol und 80 µl 3M Natriumacetat pH 5.2 gefällt und für 30 min. bei 14.000 UpM pelletiert. Nach kurzem Waschen in 70 % [v/v] Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in H₂O oder einem geeigneten Puffer für die weitere Behandlung aufgenommen.

Um die Religationen von Plasmid-DNA zu verhindern, wurden unmittelbar nach dem Restriktionsverdau die 5'-Enden dephosphoryliert. Dazu wurde dem Ansatz Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (MBI Fermentas) zugegeben, und für weitere 30 min. bei 37°C inkubiert. Eine Ligation der Plasmid-DNA kann jetzt nur noch mit Fragmenten erfolgen, die noch eine 5'-Phosphatgruppe tragen.

2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur analytischen und präparativen Längenauftrennung von Nukleinsäuren im Bereich von ca. 50 Bp bis 20 kB eingesetzt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Gel mit 0,8% - 2,0% [w/v] Agarose (Roth) in TAE-Puffer verwendet. Der Ansatz wurde im Mikrowellenherd solange aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Um die Nukleinsäuren später im UV-Licht sichtbar zu machen, wurde das Gel nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt und in noch flüssigem Zustand in Kunststoffgelträger gegossen. Die Taschen zum Beladen mit der mit 6x DNA-Ladepuffer versetzten Proben wurden mit verschiedenen Kämmen geformt. Die Auftrennung in TAE-Puffer erfolgte bei 80 bis 120 V in Elektrophorese-Kammern der Firma Owl. Als Längenstandard wurde eine 100 bp-Leiter oder eine 1 kb-Leiter (beide MBI Fermentas) mitgeführt. Die DNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators in Verbindung mit einer Biorad *Ge/Doc2000* Geldokumentationsanlage sichtbar gemacht.

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht-Durchleuchtung mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufarbeitung erfolgt mit Hilfe des *QIAEX II gel extraction kit* (Qiagen). Die Isolierung beruht auf der Auflösung der Gelmatrix und anschließender Adsorption der DNA an Kunststoffpartikel unter Hochsalzbedingungen. Von diesen wird die DNA dann mit einem geeigneten Volumen sterilen Wassers eluiert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.6.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas) wurden in dieser Arbeit dephosphorylierte Plasmide mit kleineren DNA-Fragmenten ligiert. Alle Reaktionen wurden in einem 10 µl-Ansatz durchgeführt, in dem das molare Verhältnis von Plasmid zu Insert 1:3 betrug. Die Masse der eingesetzten Fragmente richtet sich dabei nach ihrer Größe: Von einem 3 kb-Plasmids wurden 20 ng eingesetzt. Die Reaktion erfolgte ü/N bei 16°C in dem von MBI Fermentas mitgelieferten Ligase-Puffer.

2.6.6 Präparative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur präparativen Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die *Pwo* DNA-Polymerase (Roche Biochemicals) eingesetzt, die über eine 3'-5' Korrektur-Exonukleaseaktivität verfügt und damit eine im Vergleich zur *Taq* DNA-Polymerase sehr geringe Fehlerrate besitzt. Zur späteren Klonierung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden beide Oligonukleotide eines Primerpaares an ihren 5'-Enden um die Sequenzen von Restriktionschnittstellen verlängert. Auf diese Weise werden während der PCR auf beiden Seiten des Amplifikats komplette Schnittstellen generiert.

Alle Reaktionen fanden in Gegenwart von Reaktionspuffer mit $MgCl_2$ (Roche Biochemicals), 1 mM dNTPs (Rapidozym, Berlin), beiden Primern (jeweils 20 μM) und 10 ng Templat-DNA in einem Volumen von 50 μl unter den von Roche Biochemicals angegebenen Standardbedingungen statt. Es wurden standardmäßig 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Die Primerbindungstemperatur wurde abhängig von Länge und GC-Gehalt der Primer gewählt und ggf. variiert. Die für die PCR notwendigen Temperaturprofile wurden mit einem PTC-200 Thermocycler (MJ Research) generiert.

Zum gezielten Austausch einzelner Aminosäuren eines Proteins wurde ein aus zwei Schritten bestehendes PCR-Protokoll verwendet, mit dem einzelne Basen einer cDNA ausgetauscht werden (Ho *et al.*, 1989). Dabei werden zunächst ein 5' und ein 3' von der einzufügenden Mutation gelegenes Fragment generiert, die sich im Bereich der Mutation um 18 Basenpaare überschneiden. Für diesen Schritt werden also zwei flankierende Primer benötigt, die in dieser Arbeit zur späteren Klonierung um Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen verlängert waren, sowie zwei Primer, die im Bereich der zu modifizierenden Sequenz binden und die Mutation beinhalten. In einer zweiten PCR-Reaktion, die jetzt nur die flankierenden Primer enthält, wurden jeweils ca. 10 ng der beiden Fragmente als Templat eingesetzt. Durch die Überlappung der beiden internen Primer können beide Fragmente nach der ersten Denaturierung in diesem Bereich hybridisieren und sind der Ausgangspunkt für das Auffüllen der Einzelstränge durch die Polymerase. Während der folgenden Reaktionszyklen wird das neue Fragment mit Hilfe der flankierenden Primer amplifiziert.

Sämtliche PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese analysiert, ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 2.6.4).

2.6.7 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Transformationen wurden mit Hilfe eines Hitzeschocks in chemokompetente *E. coli* XL-1 blue, bzw. *E. coli* BL21 Bakterien (beide von Stratagene) durchgeführt. Der Rekombinase-defiziente Stamm XL-1 blue wurde für die Vermehrung von Plasmiden eingesetzt, der Protease-defiziente Stamm BL21 DE3 für die rekombinante Proteinexpression (siehe Kapitel 2.13). Für die Transformation in *E. coli* BL21 wurde 1 μg DNA, für die Transformation in *E. coli* XL-1 blue wurden 10 ng DNA, bzw. ein kompletter Ligationsansatz eingesetzt. Zu der DNA wurden 100 μl Suspension kompetenter Bakterien unmittelbar nach deren Auftauen gegeben. Nach 30 min. Inkubation auf Eis erfolgte ein 45 sec. dauernder Hitzeschock in einem auf 42°C erwärmten Wasserbad. Nach 2 min. Abkühlen auf Eis wurden 900 μl LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und dieser 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bak-

terien pelletiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde je nach Resistenz auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin bzw. Kanamycin ausplattiert. Die Bebrütung erfolgt ü/N bei 37°C.

2.6.8 Plasmidschnellisolierung (Miniprep)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) eingesetzt. Dafür wurden Bakterienkulturen in je 3 ml LB-Medium mit Ampicillin- bzw. Kanamycinresistenz überimpft und ü/n bei 37°C geschüttelt. Je ein ml der Kulturen wird dann in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, die Bakterien für 5 min. bei 8.000 UpM pelletiert und in 200 µl 10 mM EDTA resuspendiert. Nacheinander werden 400 µl 200 mM NaOH, 1% w/v SDS und 300 µl 2,5 M Kaliumacetat pH 4,8 dazugegeben und kräftig geschüttelt, bis sich ein Präzipitat bildet. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 UpM werden 900 µl des klaren Überstandes zu 600 µl Isopropanol gegeben und gut gemischt. Die dadurch ausgefällte Plasmid-DNA wird 5 min. bei 13.000 UpM sedimentiert und einmal mit 70 % v/v Ethanol gewaschen. Die ausgefällte Plasmid-DNA wurde bei 65°C getrocknet und bei der gleichen Temperatur in 50 µl H₂O gelöst.

Minipreps wurden in dieser Arbeit zur Überprüfung von DNA-Klonierungen eingesetzt. In der Regel wurde Plasmid-DNA aus acht verschiedenen Bakterienklonen präpariert und 5 µl der so gewonnenen Plasmid-DNA Restriktionsanalysen unterzogen.

2.6.9 Plasmidgroßisolierung (Maxiprep), photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung

Mit im Maxiprep-Maßstab durchgeführten Plasmidpräparationen können Ausbeuten von etwa einem mg hochreiner Plasmid-DNA erzielt werden. Hierfür wurden 250 ml Kultur mit einem das Plasmid tragenden Bakterienklon angeimpft und ü/n bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden 20 min. bei 6000 UpM in einem GSA-Rotor (Sorvall) pelletiert und die Plasmide mit Hilfe des Qiagen Maxi Prep Kits nach Angaben des Herstellers isoliert. Die so präparierte DNA wurde in 200 µl H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde als Maß für die DNA-Reinheit die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient $\text{Absorption}_{260 \text{ nm}} / \text{Absorption}_{280 \text{ nm}}$ sollte größer 1,7 sein.

Alle in dieser Arbeit mit Hilfe einer präparativen PCR erzeugten Konstrukte wurden anschließend sequenziert. Die Sequenzierungen wurden von den Firmen InViTek (Berlin) oder MWG (Ebersberg) durchgeführt.

2.7 Kultivierung und Manipulation der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293

Alle Zellkulturarbeiten fanden unter einer *LaminAir* Sterilbank der Firma Holten statt. Es wurden ausschließlich sterilisierte Plastikwaren verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 5 % CO₂ und 37°C in einem Inkubator der Firma Binder.

2.7.1 Einfrieren, Auftauen und Passagieren

Die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 wurde in DMEM-Medium (Biochrom, Berlin), ergänzt mit 10 % [v/v] fetalem Kälberserum (FCS, von Biochrom), kultiviert. Zum Passagieren wurde das Medium abgesaugt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 0,05 % [w/v] Trypsin/0,02 % [w/v] EDTA-Lösung (Biochrom) von den Kunststoff-Kulturgefäßen abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit der dreifachen Menge Kulturmedium versetzt und die Zellen 3 min. bei 500 g pelletiert, die Zellpellets in einer geeigneten Menge Medium resuspendiert und auf ein oder mehrere Kulturgefäße verteilt.

Die Langzeitkonservierung von kultivierten Zellen ist bei -196°C in flüssigem Stickstoff möglich. Zur Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden etwa 5×10^6 Zellen in einem ml FCS mit 10 % [v/v] DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen pipettiert. Es folgt eine Lagerung ü/n bei -80°C , welche ein langsames Einfrieren ermöglicht, bevor die Röhrchen am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff konserviert werden.

Zum Auftauen wurden die Kryo-Röhrchen nach der Entnahme aus dem Stickstofftank in einem auf 37°C temperierten Wasserbad kurz erwärmt und die Zellen mit vorgewärmtem Medium gewaschen. Dazu wurde die Zellsuspension zu 10 ml Medium gegeben, die Zellen sedimentiert, in frischem Medium aufgenommen und in Kulturgefäße pipettiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

2.7.2 Transienter Gentransfer durch Elektroporation

Für transiente Transfektionen im großen Maßstab wurde in dieser Arbeit die Methode der Elektroporation angewandt. Dazu wurden 2×10^6 - 4×10^6 Zellen in 500 μl serumfreiem DMEM-Medium aufgenommen und zusammen mit 5-30 μg der zu transfizierenden Plasmid-DNA in eine *GenePulser* Elektroporationsküvette mit 0,4 cm Elektrodenabstand (Biorad) gegeben. Die Elektroporation erfolgte durch einen kurzen Gleichstromimpuls, der durch einen Biorad *GenePulser II* mit den Einstellungen 180 V und 975 μF appliziert wurde. Anschließend wurden die Zellen in 15 ml serumhaltigem Medium suspendiert und in einer 10 cm-Schale ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um abgestorbene Zellen aus der Kultur zu entfernen. Die Zellen wurden standardmäßig 48 h nach der Elektroporation analysiert.

2.7.3 Transienter Gentransfer mit Hilfe des FuGENE6-Reagenz

Transiente Transfektionen im kleinen Maßstab wurden mit Hilfe des FuGENE6-Reagenz (Roche Biochemicals) nach Angaben des Herstellers in 3,5 cm-Platten durchgeführt. Für fluoreszenzmikroskopische Analysen wurden zuvor runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm (Roth) in die Platten gelegt. Am Vortag der Transfektion wurden $1,3 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Für die Transfektion einer Platte wurden 1 μg DNA und 3 μl FuGENE6-Reagenz eingesetzt. Bei Doppeltransfektionen von Sgk1-EGFP-Varianten und Mito-DsRed2 (siehe Ergebnisse) wurden 0,5 μg Mito-DsRed2-Plasmid und 1 μg des jeweiligen Sgk-Plasmids eingesetzt. Der Transfektionsansatz wurde für 5 h in serumfreiem

Medium inkubiert, dann wurde FCS bis zu einer Endkonzentration von 10 % zugeben und die Zellen bis zur Analyse weiter kultiviert.

2.7.4 Behandlung mit Serum, Hitzeschock, Proteasominhibitor und Dexamethason

In dieser Arbeit wurden kultivierte HEK293 Zellen mit Dexamethason, hochkonzentriertem Serum nach vorherigem Serumentzug, sowie mit dem reversiblen Proteasominhibitor Carboxybenzyl-Leucinyl-Leucinyl-Norleucinal (CBZ-L₃-CHO, Handelsname MG132, von Sigma) behandelt.

Die Dexamethason-Behandlung erfolgte für 3 h mit 2 μ M Dexamethason im Kulturmedium. Für den Serumschock wurden die Zellen zunächst $\frac{1}{N}$ in Medium mit 1 % [v/v] FCS kultiviert und dann die Serumkonzentration für 3 h auf 20 % [v/v] erhöht. Zur Inhibition des Proteasoms wurden HEK293-Zellen für 4-8 h in Gegenwart von 25 μ M CBZ-L₃-CHO kultiviert. Für einen Hitzeschock wurden die Zellen für 30 min. bei 42°C kultiviert.

Die weitere Analyse der Zellen schloss sich unmittelbar an diese Behandlungen an.

2.8 Konfokale Laser Scanning-Mikroskopie von fixierten Zellen

Mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning-Mikroskopie werden Computer-generierte Schnittbilder eines Fluoreszenz-gefärbten Präparates erzeugt. Das Präparat wird dabei von einem fokussierten Laserstrahl abgetastet und die emittierte Fluoreszenz von sogenannten Photomultipliern detektiert. Der Lichtstrahl passiert dabei eine variable Blende. Vereinfacht kann gesagt werden, daß je nach der Weite der Blendenöffnung (*pinhole*) ein sehr dünner Schnitt (bei kleinem *pinhole*) oder ein dicker Schnitt (bei großem *pinhole*) durch das Präparat optisch detektiert wird. Je kleiner das *pinhole* ist, desto geringer ist jedoch auch die Lichtausbeute.

Zur Vorbereitung für die Mikroskopie wurden die auf Deckgläschen ausgesäten, transfizierten Zellen (s. Kapitel 2.7.3) 48 h nach der Transfektion mit PBS-Puffer gewaschen und für 20 min. mit 4 % [w/v] Paraformaldehyd (PFA) in PBS bei RT fixiert. Die Kerne der Zellen wurden anschließend für 5 min. mit dem 1:20.000 in PBS verdünnten Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma, Stocklösung 10mg/ml) gefärbt, bevor die Zellen ein weiteres mal kurz mit PBS gewaschen und mit dem wässrigen Eindeckmedium *ImmuMount* (Thermo Electron) auf *SuperFrost*-Deckgläschen (Roth) eingedeckt wurden.

Die Mikroskopie erfolgte im Institut für Molekulare Pharmakologie in Berlin-Buch mit einem konfokalen *LSM510*-Mikroskop (Carl Zeiss), dessen Filter so konfiguriert waren, daß die Fluoreszenzen von DAPI, EGFP und DsRed2 nacheinander und völlig unabhängig voneinander detektiert werden konnten. Für die Detektion des DAPI- sowie des EGFP-Signales wurden Bandpass-Filter mit $\lambda_{em.} = 385-470$ nm), bzw. $\lambda_{em.} = 505-550$ nm verwendet, für die Detektion des DsRed2-Signales ein Kurzpass-Filter mit $\lambda_{em.} > 560$ nm. DAPI wurde dabei von einem UV-Laser mit $\lambda_{exc.} = 364$ nm angeregt, EGFP

von einem Argon-Laser mit $\lambda_{\text{exc.}} = 488 \text{ nm}$ und DsRed2 von einem Helium-Neon-Laser mit $\lambda_{\text{exc.}} = 543 \text{ nm}$. Die Leistungsstärke der Laser und die Empfindlichkeit der Detektoren (*detector gain*) wurden bei jeder Aufnahme individuell angepaßt.

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe der Carl Zeiss *LSM Image Browser* Software ausgewertet und ggf. nachbearbeitet, d.h. Helligkeit und Kontrast angepaßt.

2.9 Vertikale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen wurde in dieser Arbeit die vertikale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) eingesetzt. Bei diesem Gelsystem werden Proteine in Gegenwart des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) nach Anlegen einer Spannung zunächst in einem Sammelgel konzentriert, um dann in einem darunterliegenden Trenngel nach ihrer molekularen Masse in Richtung der Anode aufgetrennt zu werden. Der Acrylamid/Bisacrylamidgehalt des Trenngels bestimmt dabei die Trenneigenschaften des Gels. In dieser Arbeit wurden 10, 12 und 15%ige Proteingele zur Auftrennung von mittleren bis kleinen Proteinen eingesetzt.

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach der Elektrophorese mit Hilfe der Fluorographie nachgewiesen, nicht-radioaktive Proteine mit Hilfe einer Coomassie-Färbung.

2.9.1 Puffer und Lösungen

SDS-Laufpuffer:

25 mM Tris-Base
192 mM Glycin
0,1 % [w/v] SDS

4x reduzierender Protein-Probenpuffer (rSB):

200 mM Tris-HCl, pH 6,8
8 % [w/v] SDS
40 % Glycerin
400 mM DTT

Sammelgellösung:

125 mM Tris-HCl, pH 6,8
5 % [v/v] Acrylamid/Bisacrylamidmix
0,1 % [w/v] SDS

Trenngellösungen:

375 mM Tris-HCl pH 8,8
10–15 % [v/v] Acrylamid/Bisacrylamidmix
0,1 % [w/v] SDS

Es wurde ein 29:1 Acrylamid/Bisacrylamidmix von Applichem verwendet.

Die Polymerisation der Sammel- und Trenngele wurde durch Zugabe von 0,1 % [w/v] Ammoniumper-sulfat (APS) und 0,1 % [v/v] N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet und nahm 30-60 min. in Anspruch.

Coomassiefärbelösung:

50 % [v/v] Ethanol
10 % [v/v] Essigsäure
0,125 % [w/v] Coomassie Blue R250

Entfärbelösung:

10 % [v/v] Essigsäure
50 % [v/v] Ethanol

PPO-Lösung:

1 M 2,5-Diphenyloxazol (PPO) in DMSO

2.9.2 Elektrophorese

Die Elektrophoresen wurden in Twin-Minigelkammern (Biometra) bei 20 mA pro Gel für etwa 90 min., bzw. in P10DS-Kammern (Owl) ü/N bei 65 Volt mit SDS-Laufpuffer durchgeführt. Die Apparaturen wurden nach Angaben der Hersteller aufgebaut. Als Längenstandard wurde bei allen Elektrophoresen die eingefärbte *PageRuler Prestained Ladder* von MBI Fermentas mitgeführt.

2.9.3 Fluorographie

Bei der Fluorographie wird die korpuskuläre Strahlung schwacher Betastrahler in kurzwelliges Licht umgewandelt, welches auf einem Röntgenfilm detektiert werden kann. In dieser Arbeit wurden Proteingele mit ³⁵S-markierten Proteinen zur Fluorographie mit PPO behandelt. Da PPO nicht wasserlöslich ist, müssen die Gele zuvor für eine Stunde mit DMSO unter Agitation entwässert werden. Es folgt eine einstündige Behandlung mit einer PPO-Lösung, bevor das Gel in Leitungswasser rehydratisiert wird. Bei der Rehydratisierung fällt das PPO im Gel aus. Das Gel wird anschließend getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert.

2.9.4 Coomassiefärbung von Proteingelen

Zur Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden die Gele mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Dazu wurden die Gele für 30 min. in Coomassie-Färbelösung unter Agitation inkubiert und anschließend solange in Entfärbelösung unter mehrfachem Austauschen der Lösung entfärbt, bis die Proteinbanden eindeutig zu identifizieren sind und der Hintergrund vollständig entfärbt ist.

2.9.5 Trocknen von Proteingelen

Für die Lagerung von Proteingelen wurden diese getrocknet und damit gleichzeitig dauerhaft auf Filterpapier fixiert. Dafür wurden die Gele auf Whatman 3MM-Filterpapier gelegt und mit Saran-Folie (Dow Chemicals) bedeckt. Das Trocknen der Gele erfolgte unter Vakuum für 2 h bei 75°C auf dem Gelrockner *DryGelSr Model SE1160* (Hofer).

2.10 Western Blot-Analysen

Western Blot-Analysen erlauben den spezifisch Nachweis eines bestimmten Proteins in Proben, die zuvor über eine Gelelektrophorese aufgetrennt worden sind. Dazu werden die Proteine in einem elektrischen Feld aus dem Gel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen (Western Blot), welche dann mit spezifischen Antikörpern inkubiert werden kann. Mit Hilfe Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper wurden die gebundenen Erstantikörper in dieser Arbeit über eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen.

2.10.1 Puffer und Lösungen

Transfer-Puffer:

25 mM Tris-Base
192 mM Glycin
20 % [v/v] Methanol

Ponceau S-Färbelösung

0,2 % [w/v] Ponceau S
3 % [v/v] Essigsäure

PBS-T

0,05 % Tween 20 (Roth) in PBS

Block-Puffer:

5 % [w/v] Magermilchpulver (Roth) in PBS-T

2.10.2 Western Blot

Der Proteintransfer von Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose oder PVDF erfolgte in einer vollständig mit Transferpuffer gefüllten *Trans-Blot-Cell*-Kammer (Biorad) ü/N bei 80 mA oder für 2 h bei 400 mA. Dazu wurde zunächst das Trenngel auf drei mit Transferpuffer angefeuchtete Whatman 3MM-Papiere gelegt und mit einer auf Größe des Gels zurechtgeschnittenen Nitrocellulose-Membran luftblasenfrei bedeckt. Auf die Membran wurden weitere drei Lagen Whatman-Papier gelegt, das Haltesystem der Transferrammer geschlossen und in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer eingehängt.

Zur Kontrolle des Transfers wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen nach dem Western Blot für 5 min. mit Ponceau S-Färbelösung angefärbt. Der Farbstoff lässt sich mit Wasser abwaschen.

2.10.3 Antikörperbindung und Detektion

Sämtliche im folgenden beschriebenen Inkubationsschritte fanden unter leichter Agitation statt. Um die Proteinbindungskapazität der Membranen vollständig abzusättigen und damit eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurde die Membran zunächst mit Block-Puffer für 1 h bei RT geblockt. Für Antikörper aus der Ziege wurde statt mit Block-Puffer mit Roti-Block (Roth) geblockt. Die anschließende Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte ü/N bei 4°C oder für 2 h bei RT. Die jeweilige Verdünnung des Erstantikörpers in PBS-T mit 1 % [w/v] Magermilchpulver ist Tabelle 2.2 zu entnehmen. Nach viermaligem Waschen der Membran mit PBS-T für je 10 min. erfolgte die einstündige Inkubation mit dem 1:10.000 in PBS-T verdünnten Peroxidase-gekoppelten Anti-Kaninchen, Anti-Maus, bzw. Anti-Ziege Sekundärantikörper (alle von Vector Laboratories). Anschließend wurde wieder wie oben gewaschen und die Bindung der Antikörper mit einer Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Dazu wurden die Lösungen des *SuperSignal Pico-Kits* (Pierce) oder des *ECL-Kits* (Amersham Pharmacia) verwendet. Die Lichtsignale wurden durch Exposition gegenüber einem Röntgenfilm für eine Sekunde bis zu 30 min. detektiert.

2.11 Herstellung von Zell- und Gewebelysaten

Für Western Blot-Analysen wurden in dieser Arbeit Lysate aus kultivierten HEK293 Zellen und aus verschiedenen Maus-Geweben hergestellt.

HEK293 Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers in 120 mM NaCl, 50 mM Tris pH7,5, 0,5 % NP40 mit Protease-Inhibitoren und ggf. Phosphataseinhibitoren (siehe Kapitel 2.2.1) aufgenommen. Nach einer kurzen Ultraschallbehandlung wurde das Lysat für 30 min. bei 4°C inkubiert, Zelltrümmer und -Kerne bei 14.000 RpM und 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Mausgewebe wurden entweder direkt nach der Entnahme homogenisiert oder sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bis zur Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Gewebe wurden mit einem Pestel in einem Dounce-Homogenisator in HSL-Puffer mit 0,5% Natriumdesoxycholat und Protease-Inhibitoren sorgfältig homogenisiert und das Homogenat ü/N bei 4°C unter Rotation inkubiert. Größere Gewebereste, Zelltrümmer und -Kerne wurden bei 14.000 RpM und 4°C in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Aus den Überständen wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt (siehe Kapitel 2.17).

2.12 *Pulse-Chase* Experimente

Mit Hilfe von *Pulse-Chase* Experimenten kann das Schicksal einzelner Proteine in lebenden Zellen biochemisch verfolgt werden. Dazu werden die Zellen für einen kurzen Zeitraum mit radioaktivem Methionin und Cystein inkubiert, was zur radioaktiven Markierung der in diesem Zeitraum synthetisierten Proteine führt (*pulse*). Durch die anschließende Zugabe von nichtradioaktivem Methionin und Cystein im Überschuß wird die Synthese radioaktiver Proteine beendet. Durch die Immunpräzipitation eines bestimmten Proteins aus den lysierten Zellen zu definierten Zeitpunkten nach dem *pulse* kann dieses Protein nun über einen bestimmten Zeitraum verfolgt werden (*chase*). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von *Pulse-Chase* Experimenten die Lebensdauer von Proteinen bestimmt.

2.12.1 Puffer und Medien

NP-40-Lysispuffer:

50 mM Tris pH 7,5
5 mM MgCl₂
0,5 % NP-40
Protease-Inhibitoren (s. Kapitel 2.2.1)

NET-Puffer:

50 mM Tris pH 7,5
5 mM EDTA
150 mM NaCl
0,5 % NP-40

Hungermedium:

DMEM-Medium ohne
Methionin und Cystein

Chase-Medium:

DMEM-Medium mit
150 mM Methionin und
50 mM Cystein

2.12.2 *Pulse-Chase*

Für ein Experiment mit vier Chase-Zeitpunkten wurde eine subkonfluente 10 cm-Petri-Schale mit HEK293-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden trypsinisiert, sedimentiert, in 5 ml Hungermedium aufge-

nommen und für 45 min. im CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert, in 500 µl Hungermedium resuspendiert und für 10 min. mit 200 µCi [³⁵S] *Methionine/Cysteine-labeling mix* (Hartmann, Braunschweig) markiert. Sofort nach der Markierung wurde die *Chase*-Phase durch Zugabe von 4 ml *Chase*-Medium gestartet und unmittelbar danach, sowie nach 15 min., 60 min. und 4 h je 1 ml aus der Kultur entnommen, zu 750 µl eiskaltem PBS gegeben und sofort für 3 min. bei 500 g und 4°C pelletiert. Während der *Chase*-Periode wurden die Zellen in Suspension bei 37°C inkubiert.

2.12.3 Immunpräzipitation

Für die anschließende Immunpräzipitation wurden die Zellen in 300 µl NP-40 Lysispuffer resuspendiert und für 30 min. auf Eis lysiert. Zelltrümmer und Zellkerne wurden bei 4°C für 10 min. bei 20.000 g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um unspezifische Bindungen aus dem Zellysat an den invariablen Teil von Antikörpern oder an Protein A zu minimieren, wurden zu dem Zellysat 3 µl normales Kaninchenserum und 50 µl einer formaldehyd-inaktivierten *Staphylococcus aureus*-Präparation (Pansorbin Cells, Calbiochem) gegeben und das Gemisch für 1 h unter ständiger Agitation bei 4°C inkubiert. Die Bakterien mit den gebundenen Antikörpern wurden 2 min. bei 20.000 g pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, bevor 5 µl des Antiserums zur spezifischen Immunpräzipitation dazugegeben wurden. Die Antikörperbindung erfolgte unter ständiger Agitation bei 4°C. Zum Präzipitieren der Antikörper und der von ihnen gebundenen Proteine wurde Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia) verwendet. Die Sepharose wurde 1 h mit dem Lysat unter Agitation bei 4°C inkubiert, für 1 min. bei 20.000 g pelletiert und fünfmal mit 800 µl NET-Puffer gewaschen. Die Elution der Immunkomplexe von der Sepharose erfolgte 5 min. bei 95°C mit 1x rSB (siehe Kapitel 2.9.1). Die so präzipitierten Proteine wurden über SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und mit Hilfe der Fluorographie detektiert (siehe Kapitel 2.9).

2.13 Rekombinante Proteinexpression und Affinitätsaufreinigungen

Für die rekombinante bakterielle Expression von Fusionsproteinen mit einem Hexahistidin-*tag* (His₆) wurden das Plasmid pQE30 verwendet, welches eine N-terminale Fusion des zu exprimierenden Proteins mit His₆ erlaubt. Die Transkription steht bei pQE30 unter dem Einfluß des sehr starken T5-Promotors und des *lac*-Operators, an den das *lac*-Repressorprotein bindet. Durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) wird das Repressorprotein inaktiviert und die Transkription gestartet. His₆-*tag* Proteine können durch Metall-Affinitätschromatographie an Nickel-Nitrolotriessigsäure (Ni-NTA, von Qiagen) aufgereinigt werden.

2.13.1 Proteinexpression in *E. coli*

Für die rekombinante Expression von His₆-Sgk1 290-431 wurde das entsprechende Expressionsplasmid pQE30-Sgk1 290-431 in den *E.coli*-Stamm BL21 transformiert. Zehn Liter Bakterienkultur wurden 1:100 aus einer ü/N gewachsenen Vorkultur angeimpft und so lange kultiviert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0,4 - 0,6 betrug. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Da die maximale Proteinausbeute bereits nach etwa 2 h erreicht wurde, wurden die Bakterien nach 2 h für 15 min. bei 6000 UpM in einem GSA-Rotor (Sorvall) pelletiert.

2.13.2 Affinitätsaufreinigung von His₆-tag-Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Die Bakterienpellets aus 10 L Kultur wurden zum Waschen in insgesamt 150 ml PBS resuspendiert und erneut pelletiert. Anschließend wurden die Bakterien in insgesamt 40 ml Harnstoffpuffer (10 mM Tris, 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 8 M Harnstoff) pH 8.0 aufgenommen, für 30 min. bei RT unter Agitation lysiert und die unlöslichen Bestandteile durch 30-minütige Zentrifugation bei 10.000 g und RT in einem SS34-Rotor abgetrennt. Zur Affinitätsaufreinigung der rekombinanten His₆-Sgk1 290-431 Proteine wurden Ni-NTA-Silicat-Säulchen (Ni-NTA Spin columns von Qiagen) verwendet, da es selbst in Gegenwart von 8 M Harnstoff nicht möglich war, das Protein aus Ni-NTA-Agarose zu eluieren. Da die Säulchen nur eine Kapazität von 600 µl haben und höchstens 150 µg His₆-tag-Protein binden können, wurden zehn Säulchen parallel verwendet und mehrfach hintereinander äquilibriert, beladen und eluiert. Die Säulchen wurden mit Harnstoffpuffer pH 8.0 äquilibriert, mit dem löslichen Überstand des Bakterienlysats beladen, zweimal mit 600 µl Harnstoffpuffer pH 5,9 gewaschen und dreimal mit je 100 µl Harnstoffpuffer pH 4,5 eluiert. Zwischen allen Schritten wurden die Säulen 4 min. bei RT und 700 g zentrifugiert. Sämtliche Eluate wurden vereint und bei RT gelagert.

2.13.3 Affinitätsaufreinigung von Immunglobulinen aus Blutserum mit Protein A-Sepharose

Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet den Fc-Teil von IgG1, IgG2 und IgG4, und kann daher zur Affinitätsaufreinigung dieser Antikörperklassen eingesetzt werden. Zur Aufreinigung von Immunglobulinen aus 3 ml Kaninchenblutserum wurden 500 mg Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia) in PBS aufgequollen und in eine Säule gegossen. Die Antikörperbindung von Protein A wird bei leicht basischem pH verstärkt, weshalb alle Schritte bis zur Elution in auf pH 8,0 eingestelltem PBS durchgeführt wurden. Die Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von etwa 100 µl/min. wurde mit 10 ml PBS äquilibriert bevor das 1:5 in PBS verdünnte Kaninchenserum appliziert wurde. Das Serum war zuvor durch Sterilfiltration und fünfzehnminütige Zentrifugation bei 14.000 UpM und von allen korpuskulären Bestandteilen befreit worden. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml PBS gewaschen, die gebundenen Immunglobuline mit 5 ml 100 mM Glycin pH 2,5 eluiert und die Eluate in 500 µl-Portionen aufgefangen. In die Elutionsgefäße wurden zuvor 50 µl 2 M Tris pH 7,4 vorgelegt, um den

niedrigen pH-Wert zu neutralisieren. Der Proteingehalt in den Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm photometrisch bestimmt.

2.14 Kombinierte *in vitro*-Transkription und –Translation

Die *in vitro*-Herstellung von Proteinen erfolgte in dieser Arbeit mit dem *FlexiRabbit TnT*-Kit, bzw. mit dem *Quick Coupled T7 TnT*-Kit (beide von Promega) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wird mit Hilfe einer RNA-Polymerase eine Plasmid-kodierte cDNA transkribiert und die RNA anschließend durch Ribosomen aus Kaninchen Retikulozyten translatiert. In dieser Arbeit wurde für diesen Zweck ausschließlich das Plasmid pcDNA3.1(+) verwendet, daß neben einem CMV-Promoter für die eukaryotische Expression auch über einen bakteriellen T7-Promoter verfügt. Für die Generierung radioaktiv markierter Proteine wurde die Reaktion in Abwesenheit von nichtradioaktivem Methionin nach Zugabe von 20 µCi/50 µl Reaktionsvolumen [³⁵S]-markiertem Methionin/Cystein *labeling mix* (Hartmann, Braunschweig) durchgeführt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 60 min. bei 30°C. Für den Einsatz in Mitochondrienimport-Experimenten (siehe Kapitel 2.16) wurden die Ansätze anschließend über eine Sephadex G-50-Säule (*Mini Quick Spin DNA columns*, von Roche) aufgereinigt. Dazu wurden die Säulchen mit zweimal 100 µl Import-Puffer äquilibriert, der Reaktionsansatz appliziert und die Säulchen ein weiteres mal mit 50 µl Import-Puffer eluiert.

2.15 Subzelluläre Fraktionierung von Mäusenieren

In dieser Arbeit wurde Nierengewebe von Mäusen mit Hilfe eines differentiellen Zentrifugationsprotokolls in vier subzelluläre Fraktionen aufgetrennt: Zellkerne, Cytosol, Mitochondrien und Mikrosomen. Mikrosomen beinhalten hauptsächlich Membranen aus Endoplasmatischen Retikulum, intracellulären Vesikeln und dem Golgi-Apparat.

2.15.1 Puffer und Lösungen

Kernprep-Puffer:

120 mM Tricin, pH 7,5
150 mM KCl
30 mM MgCl₂
1 mM DTT
0,1 % [v/v] Triton X-100

1,8 M-Sucrose-Lösung:

120 mM Tricin, pH 7,5
150 mM KCl
30 mM MgCl₂
1,8 M Sucrose

1 M-Sucrose-Lösung:

10 mM Tris, pH 7,5
1 mM EDTA
1 M Sucrose

1,5 M-Sucrose-Lösung:

10 mM Tris, pH 7,5
1 mM EDTA
1,5 M sucrose

2.15.2 Homogenisierung und differentielle Zentrifugation

Sämtliche Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Alle Lösungen waren auf 4°C vorgekühlt. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, auf dem Rücken liegend fixiert und beide Nieren nach medianem Öffnen der Bauchhaut und des Peritoneums freipräpariert. Nach Entnahme der Organe wurden diese sofort mit je 10 Pestel-Stößen in einem Dounce-Homogenisator in 5 ml STE-Puffer mit Protease-Inhibitoren (siehe Kapitel 2.2.1) homogenisiert. Zellkerne und Zelltrümmer wurden für 10 min. bei 500 g pelletiert und für die Präparation von Zellkernen und Plasmamembranen über Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kapitel 2.15.3) in Kernprep-Puffer resuspendiert. Der postnukleäre Überstand wurde zwei weitere Male zentrifugiert, um ihn vollständig von Zelltrümmern und -Kernen zu befreien. Aus dem postnukleären Überstand wurden die Mitochondrien bei 10.000 g für 20 min. in einem SS-34-Rotor (Sorvall) pelletiert. Da diese Fraktion noch mit anderen zellulären Elementen kontaminiert ist, wurden die Mitochondrien in STE-Puffer resuspendiert und über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten weiter aufgereinigt (siehe Kapitel 2.15.4). Der Überstand wurde für eine Stunde bei 100.000 g in einem TLA110-Rotor (Beckman-Coulter) zentrifugiert und damit in Cytosol im Überstand und Mikrosomen im Pellet getrennt. Das Mikrosomenpellet wurde ü/N in HSL-Puffer gelöst.

2.15.3 Diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation zur Gewinnung von Zellkernen und Plasmamembranen

Das hier verwendete Protokoll war ursprünglich für die Aufreinigung von Zellkernen beschrieben. Bei der Analyse der Fraktionen zeigte sich jedoch, daß die Zellkernfraktion substantielle Mengen an Plasmamembranbestandteilen aufwies (siehe Ergebnisse).

Die in Kernprep-Puffer resuspendierte Fraktion wurde 1:1,8 mit 1,8 M-Sucrose-Lösung gemischt, vorsichtig über 10 ml 1,8 M-Sucrose-Lösung geschichtet und für 2 h bei 38.000 g in einem SW32Ti-Rotor (Beckman-Coulter) zentrifugiert. Intakte Zellkerne und Plasmamembranfragmente durchwandern bei diesem Schritt das 1,8 M Sucrose-Kissen und befinden sich anschließend als Pellet auf dem Boden des Zentrifugenröhrchens, wo sie nach dem Dekantieren des Überstandes in HSL-Puffer mit 0,1 % [w/v] SDS resuspendiert wurden. Um die durch das SDS aus den Kernen freigesetzte DNA zu entfernen, wurde 1 U/100 µl DNaseI (Roche) zugefügt und der Ansatz für 15 min. bei 37°C inkubiert.

2.15.4 Diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation zu Gewinnung einer reinen Mitochondrienfraktion

In ein Ultrazentrifugenröhrchen wurden 8 ml 1,5 M-sucrose-Lösung vorgelegt und diese vorsichtig mit 10 ml 1 M-Sucrose-Lösung überschichtet. Zur Aufreinigung hochreiner Mitochondrien aus dem in STE-Puffer resuspendierten 10.000 g-Pellet (siehe Kapitel 2.15.2) wurde die Fraktion vorsichtig über die 1 M-Sucrose-Lösung geschichtet und der Gradient bei 80.000 g in einem SW32Ti-Rotor für 1 h ultrazentrifugiert. Die Mitochondrien reichern sich dabei als Interphase zwischen der 1 M- und der 1,5 M-Sucrose-Lösung an. Der Überstand bis zu dieser Interphase wurde vorsichtig abpipettiert, die Mitochondrien in ein mit 10 ml STE-Puffer gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min. bei

10.000 g erneut pelletiert, bevor sie – je nach weiterer Verwendung - in HSL-Puffer resuspendiert und ü/N gelöst bzw. in Importpuffer (siehe Kapitel 2.16.1) resuspendiert wurden.

2.16 Mitochondrienimport-Experimente, *Protease protection assays* und Analyse der Membranassoziation

Bei diesen Experimenten wurde der Einbau von *in vitro*-synthetisierten und radioaktiv markierten Proteinen in Mitochondrien, sowie deren anschließende Lokalisation untersucht. Für den zeitabhängigen Proteinimport in Mitochondrien wurden hochaufgereinigte Mitochondrien verwendet (siehe Kapitel 2.15), als Vorbereitung für *Protease protection assays* und für die Untersuchung der Membranassoziation wurde das *in vitro*-synthetisierte Protein zu einem postnukleären Überstand gegeben und die Mitochondrien anschließend pelletiert. Zur Analyse der radioaktiv markierten Proteine wurden Gelelektrophoresen mit anschließender Fluorographie durchgeführt (siehe Kapitel 2.9), nichtradioaktive Kontrollproteine aus den gleichen Proben wurden mit Hilfe von Western Blot-Analysen (siehe Kapitel 2.10) nachgewiesen.

2.16.1 Puffer

Import-Puffer:

250 mM Sucrose
50 mM Hepes
2 mM Kaliumdihydrogenphosphat
80 mM KCl
10 mM Magnesiumacetat
2,5 mM EDTA
2,5 mM ATP
5 mM NADH
2,5 mM Dinatriumsuccinat
pH 7,4

2.16.2 zeitabhängiger Import von [³⁵S]-markierten Proteinen in hochaufgereinigte Mitochondrien aus Mäusenieren

Für die Analyse des zeitabhängigen Imports von [³⁵S]-markierten Proteinen wurde eine Suspension hochaufgereinigte Mitochondrien (s. Kapitel 2.15) in Import-Puffer verwendet. Um in den Importansätzen eine definierte Menge an Mitochondrien einsetzen zu können, wurde die Proteinkonzentration der Suspension mit Hilfe der Bradford-Methode bestimmt (siehe Kapitel 2.17) und auf 10 mg/ml eingestellt. Die Importansätze hatten ein Gesamtvolumen von einem ml Importpuffer. Darin enthalten waren 100 µl des zu importierenden *in vitro*-generierten [³⁵S]-markierten Proteins, 1 mg Mitochondriensuspension und 200 µg fettsäurefreies BSA (Sigma). Zu den Zeitpunkten 0 min., 1 min., 5 min. und 20 min. wurden je 250 µl aus dem Importansatz entnommen, die Mitochondrien 5 min. bei 10.000 g pelletiert, der Überstand abgenommen und die Mitochondrien noch einmal in STE-Puffer gewaschen, bevor sie in 1x rSB (siehe Kapitel 2.9.1) aufgenommen wurden. Der abgenommene Überstand wurde

mit 4x rSB versetzt. Das Pellet und ein Zehntel des Überstandes wurden anschließend auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Signale mit Hilfe der Fluorographie detektiert.

2.16.3 Mitochondrienimport von [³⁵S]-markierten Proteinen in postnukleärem Überstand

Für die Analyse von Membranassoziation und –Topologie wurden *in vitro*-translatierte Proteine aus einem 50 µl-Translationsansatz (siehe Kapitel 2.14) zu 950 µl postnukleärem Überstand gegeben und für 20 min. bei 30 °C inkubiert, nachdem dem Ansatz 2,5 mM ATP, 5 mM NADH und 2,5 mM Dinatriumsuccinat zugefügt worden waren. Die Mitochondrien wurden anschließend für 15 min. bei 10.000 g in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß pelletiert, einmal mit STE-Puffer gewaschen, in 400 µl eiskaltem STE-Puffer aufgenommen und analysiert wie im folgenden beschrieben.

2.16.4 *Protease protection assays* an Mitochondrien

Die Protein-Topologie an der äußeren Mitochondrienmembran wurde mit Hilfe von *Protease protection assays* untersucht. Dazu wurde eine Mitochondriensuspension für 15 min. bei RT mit 200 µg/ml Proteinase K inkubiert. Die Proteinase kann die intakte äußere Mitochondrienmembran nicht durchdringen und verdaut nur Proteine oder deren Teile, die dem Cytoplasma zugewandt sind. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM PMSF gestoppt und mit 4x rSB versetzt. Zur Kontrolle wurden die Mitochondrienmembranen bei der Hälfte der Ansätze durch Zugabe von 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert.

2.16.5 Analyse der Membranassoziation von Mitochondrienproteinen

Um die Mitochondrienmembranen aufzuschließen, wurde die Suspension für 30 sec. mit Ultraschall behandelt und auf zwei dickwandige Polycarbonatröhrchen verteilt. Die Trennung der Mitochondrienmembranen vom Überstand erfolgte durch Ultrazentrifugation in einem TLA-100.3-Rotor (Beckman-Coulter) bei 300.000 g für 1 h bei 4°C. Der Überstand enthält alle nicht membrangebundenen Proteine. Eines der Membranpellets wurde in reduzierendem Probenpuffer (siehe Kapitel 2.9.1) gelöst, das andere in 200 µl 100 mM Natriumcarbonat pH 11. Die alkalische Carbonatlösung führt zum Ablösen aller peripher assoziierten Membranproteine. Die Behandlung erfolgte unter Agitation für 1 h bei 4°C. Die erneute Trennung der Membranen vom Überstand erfolgte wieder durch Ultrazentrifugation wie oben beschrieben. Danach wurde der pH-Wert des Überstandes durch Zugabe von 3 µl rauchender Salzsäure neutralisiert und das Pellet in reduzierendem Probenpuffer aufgenommen.

2.17 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung wurde die kolorimetrische Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Hierzu wurde ein µl der zu untersuchenden Lösung zu 799 µl H₂O gegeben, mit 200 µl Bradford Reagenz (Biorad) gut gemischt und nach fünfminütiger Inkubation

bei RT die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Variabilität der Farbreaktion macht bei jeder Proteinmengenbestimmung das Erstellen einer Eichgerade mit definierten Proteinmengen notwendig. Dazu wurden 2, 4, 6, 8, 10 und 12 µg BSA Fraktion V (Sigma) unter den gleichen Bedingungen photometrisch vermessen. Die eingesetzte Proteinmenge wird gegen die Absorption bei 595 nm aufgetragen und die Proteinmenge mit Hilfe einer Regressionsgeraden bestimmt. Befand sich die Proteinmenge außerhalb der von den Standards, wurde die Ausgangsmenge entsprechend angepaßt.

2.18 Internetressourcen zur Proteinsequenzanalyse

In dieser Arbeit wurden einige im Internet frei verfügbare Ressourcen zur Analyse von Proteinsequenzen verwendet.

In PSORT2 (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) sind eine Vielzahl von Algorithmen zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation eines Proteins zusammengefaßt. Als Ergebnis wird die Wahrscheinlichkeit der Lokalisation in einem bestimmten zellulären Kompartiment angegeben (Nakai & Horton, 1999). Target P V1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) trifft Vorhersagen über ein N-terminales Signalpeptid für den Proteinimport in Mitochondrien bzw. das ER (Emanuelsson *et al.*, 2000). Mitoprot II (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) identifiziert nicht nur Zielsteuerungssequenzen für den Proteinimport in Mitochondrien, sondern auch potenzielle Schnittstellen für die mitochondriale Matrix-Präsequenzpeptidase (Claros & Vincens, 1996).

TMMHM v2.0 und der Kyte-Doolittle Plot (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/> & z.B. bei <http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm>) wurden zur Analyse von Transmembransegmenten eingesetzt (Krogh *et al.*, 2001; Moller *et al.*, 2001; Kyte & Doolittle, 1982).

2.19 RNA-Präparation und Genchip-Analysen

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus HEK293 Zellen wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und je 3,5 cm-Schale in einem ml TRIzol-Reagenz (Invitrogen) aufgenommen. Die RNA wurde nach Angaben des Herstellers aus dem Zellysat isoliert und gefällt. Das Pellet wurde in 20 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-H₂O) aufgenommen und für 10 min. bei 55°C gelöst. Für die Expressionsanalysen mit Hilfe von Affymetrix Genchips wurde die RNA zusätzlich über RNeasy-Säulen (Qiagen) aufgereinigt. Qualität und Quantität der präparierten RNA wurden mit Hilfe eines Agarosegels sowie photometrisch bestimmt. Dazu wurde die optische Dichte bei 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient 260/280 sollte dabei >2,0 sein.

Das Umschreiben der mRNA in cRNA, sowie die Hybridisierung und das Auslesen der Genchips des Typs *human genome U133 Plus 2.0* wurden im Labor für Funktionelle Genomforschung der Charité Berlin durchgeführt.

2.20 RT-PCR

Für den Nachweis spezifischer mRNA wurde die PCR nach reverser Transkription (RT-PCR) eingesetzt. Um die RNA von kontaminierender DNA zu befreien, wurden zunächst 20 µg RNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl für 2 h bei 37°C in Gegenwart von 50 mM Tris pH 6,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 20 U RNase Inhibitor (Roche Biochemicals) mit 200 U DNaseI (Invitrogen) behandelt. Die DNase wurde anschließend für 5 min. bei 100°C inaktiviert.

Für die reverse Transkription wurden zu 9 µl der DNase-behandelten RNA 1 µl 50 µM Oligo-dT-Primer (Invitrogen) gegeben und der Ansatz für 5 min. bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 4 µl 5x cDNA Synthesepuffer (Invitrogen), 2 µl 10 mM dNTPs, 2 µl 50 mM DTT, 1 µl RNase Out (40 U/µl, Invitrogen) und 1 µl Thermoscript Reverse Transkriptase (15 U/µl, Invitrogen) ergänzt und für 1 h bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine fünfminütige Inkubation bei 85°C abgestoppt und anschließend die verbliebene RNA-Matrize durch Zugabe von 1 µl RNaseH für 20 min. bei 37°C verdaut.

Für die anschließende PCR-Reaktion in einem 50 µl-Ansatz wurden 1 µl oder 2 µl cDNA als Templat eingesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten außerdem 20 pMol eines jeden Primers, 1 U Taq-Polymerase (Rapidozym, Berlin), 1 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ und 5 µl 10x Reaktionspuffer (Rapidozym). Nach einer initialen fünfminütigen DNA-Denaturierung wurden die Ansätze bei jedem folgenden Reaktionszyklus zuerst 25 Sekunden bei 95°C, dann 45 Sekunden bei der entsprechenden *annealing*-Temperatur und schließlich für 60 Sekunden bei 72°C inkubiert. Abschließend folgte eine zehnminütige Inkubation bei 72°C. Die *annealing*-Temperaturen und die Anzahl der Reaktionszyklen sind in Tabelle 2.5 bei den entsprechenden Primern angegeben.

2.21 *in situ*-Hybridisierung

In situ-Hybridisierungen wurden auf 16 µm dicken, koronalen Gefrierschnitten von Mäusegehirnen angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem Kryostaten (Microm HM560, Walldorf) hergestellt, bei RT getrocknet und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Schnitte für 15 min. mit 4% [w/v] PFA in PBS fixiert, dreimal mit PBS gewaschen und 3 min. in 100 mM Triethanolamin pH 8 inkubiert, bevor sie für 10 min. in 200 ml 100 mM Triethanolamin mit 350 µl Essigsäureanhydrid acetyliert wurden. Vor der Sonden-Hybridisierung wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

2.21.1 Puffer und Lösungen

20x SSC:

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,0

100x Denhardts Reagenz:

0,2 % [w/v] Ficoll 400
0,2 % [w/v] Polyvinylpyrrolidon
0,2 % [w/v] Rinderserumalbumin

Hybridisierungslösung:

4x SSC
 1x Denhardts Reagenz
 0,5 mg/ml ss Heringssperma-DNA
 0,25 mg/ml Hefe-t-RNA (Invitrogen)
 10 % [w/v] Dextransulfat
 50 % [v/v] Formamid

RNAse-Puffer:

50 mM NaCl
 10 mM Tris
 1 mM EDTA
 pH 8,0
 16 µg/ml RNAseA (Applichem)

2.21.2 Sondenherstellung und Hybridisierung

Die radioaktiv markierten RNA-Sonden wurde durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Dazu wurden für eine *sense*- und *antisense*-Sonde je 1 µg linearisierte Plasmid-DNA in Gegenwart von 10 mM DTT, 1 mM ATP, 1 mM GTP, 1 mM CTP und 8 µl α-[³⁵S]UTP (10 µCi/µl, Hartmann Analytic) für 2 h bei 37°C durch T7-, bzw. T3-Polymerase (Promega) transkribiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden durch Zentrifugation über eine Sephadex G50-Säule (*Mini Quick Spin DNA columns*, von Roche) abgetrennt, und die Sonde aus dem Eluat durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2, 10 µl Hefe t-RNA (10 mg/ml), 100 mM DTT ad 100 µl und 200 µl Ethanol und anschließende Zentrifugation gefällt. Die getrocknete Sonde wurde in 40 µl 1 M DTT aufgenommen, 20 min. bei RT inkubiert und mit 100 µl Hybridisierungslösung versetzt. Ein µl der Sonde wurde im Szintillationszähler (Beckmann LS6000SC) gemessen und die Sondenlösung mit Hybridisierungslösung auf 5000 cpm/µl eingestellt.

Die getrockneten Objektträger wurden mit je 100 µl Sondenlösung beschichtet, mit einem Deckglas luftblasenfrei bedeckt und mit DPX *mounting solution* (Fluka) luftblasenfrei versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte ü/N bei 55°C.

2.21.3 Waschen und Entwickeln

Nach dem Abkühlen der Objektträger wurde zunächst das DPX mit einer Pinzette entfernt und die Objektträger für 20 min. bei RT in 4x SSC geschüttelt. Bei diesem Schritt lösen sich gleichzeitig die Deckgläschen ab. Anschließend wurde erneut für 2x 10 min. in 4x SSC gewaschen, bevor die Objektträger zum Abbau nicht hybridisierter, einzelsträngiger RNA für 30 min. bei 37°C in RNAse-Puffer inkubiert wurden. Nach drei 15-minütigen Waschschritten in 2x SSC, 1x SSC und 0,5x SSC bei RT, einem 30-minütigem Waschschriff in 0,1x SSC bei 55°C und einem letzten Waschschriff in 0,1x SSC bei RT wurden die Objektträger in 70% Ethanol und anschließend 100% Ethanol dehydratisiert und luftgetrocknet. Die Signale wurden mit Biomax MR-Filmen (Kodak) detektiert.