

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Kits

Reagenzien und Kits	Herkunft
<i>1 Kb DNA Ladder</i>	Gibco BRL, Deutschland
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (30 % / 0,8 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid, z. A.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Aprotinin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Aquasafe 300 plus	Zinsser Analytik, Deutschland
Bafilomyzin A1	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
<i>BamHI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
Benzamidin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
<i>BglII</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
BigDye [®] Terminator des V.1.1	Applied Biosystems, Perkin Elmer, USA
Cycle Sequencing Kit	
Bromphenolblau, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cacodylsäure, Natriumsalz-3-Hydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid-2-Hydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Denaturierungspuffer 10×	New England Biolabs, Ipswich, UK
Dikaliumhydrogenphosphat-3-Hydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP)	Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland
<i>DpnI</i>	New England Biolabs, Ipswich, UK
Essigsäure, reinst	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, z.A.	J.T. Baker, Niederlande
Ethidiumbromid	Carl Roth, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Deutschland
G5-Puffer 10×	New England Biolabs, Ipswich, UK
G7-Puffer 10×	New England Biolabs, Ipswich, UK
Glücksklee Magermilchpulver	Nestle Deutschland AG
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33258	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Immu-Mount™ Einbettmedium	Thermo Shandon, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
KLAL	FMP-Berlin, Berlin, Deutschland
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	J.T. Baker, Niederlande
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat, reinst (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrozellulose (OPTITRAN BA-S 85)	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
N-dodecyl-beta-D-maltosid	Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland
NP-40-Lösung	New England Biolabs, Ipswich, UK
Nucleospin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Paraformaldehyd, reinst	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Pepton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pfu Plus! 10× Reaktionspuffer B	Roboklon, Berlin, Deutschland
PfuPlus!-Polymerase aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	Roboklon, Berlin, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Plasmid DNA Purification NucleoBond® PC 100	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
p-Nitrotetrazoliumblausäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland

Ponceau S	Roche, Schweiz
Protein A-Sepharose	SIGMA, Diesenhofen, Deutschland
Proteinmarker, vorgefärbt (7-175 kDa)	New England Biolabs, Ipswich, UK
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Roti-Load 1 (Proteinladepuffer, reduzierend)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese™ Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford, IL, USA
TEMED	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Seromed, Berlin, Deutschland
Trypsin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Trypsininhibitor Typ I-S, aus Sojabohnen	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Trypton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem, USA

2.1.2 Technische Ausrüstung und Software

Automatisches Mikroskop	Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Laser Scanning Mikroskop	LSM 510 META, Carl Zeiss Jena, Deutschland
Photometer	Pharmacia UV-visible Spectrophotometer, USA
pH-Meter	Hanna Instr. HI9321 Microprocessor pH-Meter, USA
Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus, Fa. Millipore, Eschborn, Deutschland
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific innova™ 3240, USA
Zentrifugen	Sorvall SS34 Festwinkelrotor, (Dupont), USA
	Heraeus Biofuge 15, Deutschland
	Heraeus Biofuge <i>pico</i> , Deutschland
	Sorval RC5C Plus (Dupont), USA

	Stratagene PicoFuge, USA
Brutschrank	Typ Biocenter 2001 Tecnomara, Fernwald, Deutschland
Dampfsterilisator	Tecnomara, Fernwald, Deutschland
Durchlichtmikroskop	TELAVAL Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	IMT2-RFL Olympus, Deutschland
Pipettierhilfe	Typ acuboy Tecnomara, Fernwald, Deutschland
Mikroliterpipetten	Gilson, Frankreich
Sterilbank	Typ ANTAES 48/72 BIOHIT, Köln, Deutschland
Blotkammern	BioRad, München, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Hoefler Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammer	BioRad, München, Deutschland
Spannungsgerät	Hoefler, Freiburg, Deutschland
Elektroporationsgerät	BioRad, München, Deutschland
Zellzähler Casi [®] 1	Casy, Schäfe System, Deutschland
Sequenzierer	Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer, Perkin Elmer, USA
Fluorimeter	Odyssey [®] Infrared Imaging System, LI-COR [®] Biosciences, USA
Kühlschrank	Liebherr glass line, Liebherr, Ochsenhausen Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr comfort, Liebherr, Ochsenhausen Deutschland
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator Typ 500 EP-Z H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Clone Manager 3.0	Sci-Software
CorelDRAW 7.0	Corel Corporation
Corel Photo-Paint 7.0	Corel Corporation
Excel 2000	Microsoft
Photoshop 7.1	Adobe
Power Point 2000	Microsoft
Prism GraphPad (Version 3.0)	GraphPad Software Inc.
Word 2003	Microsoft

Zeiss LSM Image Browser 4.0	Carl Zeiss Jena GmbH
Quant1 analysis	Odyssey [®] LI-COR [®] Biosciences, USA
PROCHECK	Laskowski et al., 1993
AMBER 8.0 Force Field	Case, 2002

2.1.3 Säugerzellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
fetales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
isotonische Kochsalzlösung (Casiton)	Casy, Schäfe System, GER
LipofectAMINE [™] 2000 Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Monoklonaler Maus-anti-ERGIC53-Antikörper	Hans-Peter Hauri, Biozentrum Basel, Schweiz
Cy3 [™] -konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
Kaninchen anti-GFP-Antiserum	FMP, Berlin, Deutschland
Monoklonaler Maus-anti-GFP-Antikörper	Clontech, USA

Alle anderen Primärantikörper wurden von Stressgen Bioreagents, Victoria, BC, Canada bezogen. Die Sekundärantikörper IRDye700 anti-Maus und IRDye800 anti-Kaninchen wurden von Biomol, Hamburg, Deutschland bezogen.

2.1.5 Oligonukleotide

Tab. 2: Oligonukleotide zur Herstellung der V₂R-Rezeptor Mutanten. Dargestellt sind nur die Forward-Primer. Als Template für die Mutagenese diente der Vektor pEGFP.N1, der die V₂R-GFP-Fusion und eine Kanamycinresistenz als funktionelle Bereiche, enthält. Die Bezeichnung der resultierenden Plasmide ist angegeben. Die Herstellung der Primer erfolgte durch die Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Resultierende rekombinante Plasmide
P17R-fwd	GCA TCC CTC TCT GCG CAG CCT GCC CAG C	pV ₂ R.P17R.GFP
R32E-fwd	CCA CTG GAC ACC GAG GAC CCG CTG CTA GC	pV ₂ R.R32E.GFP
P34E-fwd	CAC CCG GGA CGA GCT GCT AGC CCG GGC	pV ₂ R.P34E.GFP
A42K-fwd	GCG GAG CTG AAG CTG CTC TCC	pV ₂ R.A42K.GFP
L44R-fwd	GGA GCT GGC GCT GCG CTC CATA GTC TTT GTG	pV ₂ R.L44R.GFP
F48A-fwd	CTC CAT AGT CGC TGT GGC TGT G	pV ₂ R.F48A.GFP
F48R-fwd	GCT CTC CAT AGT CCG TGT GGC TGT GGC C	pV ₂ R.F48R.GFP
A52I-fwd	GTG GCT GTG ATC CTG AGC AAT GGC	pV ₂ R.A52I.GFP
G69D-fwd	GCG GGG CCG GCG GGA CCA CTG GGC ACC	pV ₂ R.G69D.GFP
W71D-fwd	CGG CGG GGC CAC GAC GCA CCC ATA CAC GTC	pV ₂ R.W71D.GFP
A72W-fwd	GGC GGG GC CAC TGG TGG CCC ATA CACG TC	pV ₂ R.A72W.GFP
A84E-fwd	CAC TTG TGC CTG GAG GAC CTG GCC GTG GC	pV ₂ R.A84E.GFP
A89I-fwd	CCT GGC CGT GAT TCT GTT CCA AG	pV ₂ R.A89I.GFP
Q92P-fwd	GTG GCT CTG TTC CCA GTG CTG CCC CAG C	pV ₂ R.Q92P.GFP
G107R-fwd	CGA CCG CTT CCG TAG GCC AGA TGC CCT G	pV ₂ R.G107R.GFP
P108E-fwd	CGC TTC CGT GGG GAA GAT GCC CTG TG	pV ₂ R.P108E.GFP
A125I-fwd	GGG CAT GTA TAT CTC CTC CTA C	pV ₂ R.A125I.GFP
T134A-fwd	CCT GGC CAT GGC GCT GGA CCG CC	pV ₂ R.T134A.GFP
T134R-fwd	CCT GGC CAT GAG GCT GGA CCG CC	pV ₂ R.T134R.GFP
P144N-fwd	CCG TGCCA TCT GCC GTA ACA TGC TGG CGTA CC	pV ₂ R.P144N.GFP

A147R-fwd	CGT CCC ATG CTG AGG TAC CGG CAT GGA ATG G	pV ₂ R.A147R.GFP
W156D-fwd	GGA AGT GGG GCT CAC GAC AAC CGG CCG GTG	pV ₂ R.W156D.GFP
A163E-fwd	CCG GTG CTA GTG GAG TGG GCC TTC TCG CTC C	pV ₂ R.P34E.GFP
S171R-fwd	CCT TCT CGC TCC TTC TCA GAC TGC CCC AGC TC	pV ₂ R.A42K.GFP
F196K-fwd	GCT GGG CCT GCA AAG CGG AGC CCT GG	pV ₂ R.L44R.GFP
E198A-fwd	CCT GCT TTG CGG CGC CCT GGG GCC G	pV ₂ R.F48A.GFP
R202A-fwd	GCC CTG GGG CGC TCG CAC CTA TGT C	pV ₂ R.F48R.GFP
V213R-fwd	GGA TTG CCC TGA TGA GGT TCG TGG CAC C	pV ₂ R.A52I.GFP
P217E-fwd	GGT GTT CGT GGC AGA GAC CCT GGG TAT CGC	pV ₂ R.G69D.GFP
I221E-fwd	CCT ACC CTG GGT GAG GCC GCC TGC CAG	pV ₂ R.W71D.GFP
A223I-fwd	GGG TAT CGC CAT CTG CCA GGT G	pV ₂ R.A72W.GFP
A223K-fwd	GGG TAT CGC CAA ATG CCA GGT G	pV ₂ R.A84E.GFP
I232N-fwd	GCT CAT C TTC CGG GAG AAT CAT GCC AGT CT GG	pV ₂ R.A89I.GFP
P238E-fwd	CCA GTC TGG TCG AAG GGC CAT CAG AGA GGC C	pV ₂ R.Q92P.GFP
G239E-fwd	CCA GT CTG GTC CCA GGA CCA TCA GAG AGG	pV ₂ R.G107R.GFP
G250E-fwd	GGG GGCGC CGC AGG GAA CGC CGG ACA GGC	pV ₂ R.P108E.GFP
S263W-fwd	GGG AGCC CAC GTG TGG GCA GCT GTG GGC	pV ₂ R.A125I.GFP
T273R-fwd	GAC TGT GAG GAT GAG GCT AGT GAT TGT GGT CG	pV ₂ R.T134A.GFP
V277R-fwd	GGA TGA CGC TAG TGA TTA GGG TCG TCT ATG TGC	pV ₂ R.T134R.GFP
A300R-fwd	GGG ACC CGG AGC GAC CTC TGG AAG GGG	pV ₂ R.A300R.GFP
P301D-fwd	GGA CCC GGA GGC AGA TCT GGA AGG GGC	pV ₂ R.P301D.GFP
E303R-fwd	GGA GGC ACC TCT GAG AGG GGC GCC C	pV ₂ R.E303R.GFP

A314W-fwd	CTC ATG TTG CTG TGG AGC CTC AAC AGC TGC	pV ₂ R.A314W.GFP
S318I-fwd	GCC TCA ACA TCT GCA CCA ACC	pV ₂ R.S318I.GFP
S318L-fwd	GCC TCA ACC TCT GCA CCA ACC	pV ₂ R.S318L.GFP
I324E-fwd	CCA ACC CCT GGG AGT ATG CAT CTT TCA GC	pV ₂ R.I324E.GFP

2.1.6 Zelllinien

Tab. 3: Stabile HEK293 Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Zelllinien wurden von der Zellkultur des FMP zur Verfügung gestellt.

Rekombinante Plasmide	Vektor	Funktionelle Bereiche	Herkunft
V ₂ R.GFP	pEGFP.N1	V ₂ R, kan ^R	Schülein et al., 1998
V ₂ R.Y205C.GFP	pEGFP.N1	V ₂ R, kan ^R	Zühlke, 2003
V ₂ R.L62P.GFP	pEGFP.N1	V ₂ R, kan ^R	Krause et al., 2000
mV ₂ R.GFP	pEGFP.N1	V ₂ R, kan ^R	Katja
V ₂ R.R337 X.GFP	pEGFP.N1	V ₂ R, kan ^R	Oueslati, 2005
V ₂ R.L336T.GFP	pEGFP.N1	V ₂ R, kan ^R	In dieser Arbeit beschrieben

Tab. 4: Eukaryotische Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Merkmale	Herkunft/Referenz
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen, mit Adenovirus Typ 5 transformiert	DSMZ, BRD

2.2 Methoden

2.2.1 Modellierung und Herstellung von artifiziellen Vasopressin-V₂-Rezeptor Mutanten

Das Strukturmodell des V₂R wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Strukturelle Bioinformatik (G. Krause, FMP Berlin) erstellt. Bisher liegt vom V₂R keine Kristallstruktur vor. Die Kristallstrukturen des bovinen Rhodopsins und des β -adrenergen Rezeptors waren die einzigen bisher bekannten Kristallstrukturen aus der Familie GPCR und dienten als strukturelle Vorlagen.

Das 3D Strukturmodell der Transmembranhelizes des Vasopressin-V₂-Rezeptors wurde auf Basis der 3D Struktur des Rhodopsins berechnet. Für die Modellierung der intra- und extrazellulären Domänen wurden Peptidsequenzen ausgewählt und mit bereits bekannten Sequenzstrukturen in der Proteindatenbank (PDB) verglichen. Vorhandene Strukturen wurden mit dem Modell der Transmembranhelizes zusammengefügt und das entstandene Gesamtzeptormodell in einer Kraftfeldanalyse durch molekulare Dynamikstudien auf seine Stabilität hin überprüft.

Anhand dieses V₂R-Modells wurden ebenfalls in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Strukturelle Bioinformatik (G. Krause, FMP) insgesamt 46 Punktmutationen in den extrazellulären, intrazellulären bzw. α -helikalen Bereichen des Rezeptors errechnet, die zu einem maximalen Faltungs- und damit zu einem Transportdefekt führen sollten. Dabei wurden für den extrazellulären Bereich 10 Mutationen (P17R, R32E, G107R, P108E, F196K, E198A, R202A, A300R, P301D, E303R), für den α -helikalen Bereich 31 Mutationen (P34E, A42K, L44R, F48A, F48R, A52I, A72W, A84E, A89I, Q92P, A125I, T134A, T134R, W156D, A163E, S171R, V213R, P217E, I221E, A223I, A223K, I232N, P328E, G239E, S263W, T273R, V277R, A314W, S318I, S318L, I324E) und für den intrazellulären Bereich 5 Mutationen (G69D, W71D, P144N, A147R, G250E) errechnet. Die genaue Lage ist im Topologiemodell gekennzeichnet (s. Abb. 2.1).

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Mutagenese und Primerherstellung

Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese wurden *in vitro* gezielt Mutationen in die DNA eingefügt, die zu Aminosäureaustauschen oder –deletionen führen. Hierfür benötigt man eine Ausgangs-DNA (Mutterstrang-DNA), eine thermostabile DNA-Polymerase mit Korrekturaktivität, Nukleotide (dNTPs) und Oligonukleotide (Primer). Die Primer mit der entsprechenden Mutation wurden in hohem Überschuss zugegeben und wiesen ein ausgewogenes GC/AT-Verhältnis auf. Als Polymerase für einen Standard-Mutagenese-Ansatz wurde die „PfuPlus!“-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* eingesetzt. Eine Unit entspricht der Enzymmenge, die bei 68-75°C in 30 min 10 nmol dNTPs in ein Oligonukleotid einbaut.

Um die Mutationen einzuführen, wurden Strang- und Gegenstrangprimer gewählt, die die Mutation in der Mitte tragen (Gesamtlänge von 27 bis 32 Basen) (s. Tab. 2). Mit diesen Primern wurde eine PCR durchgeführt und das gesamte Plasmid amplifiziert (s. Tab. 5 und 6). Als Mutterstrang-DNA für die Mutationen dieser Arbeit diente das Plasmid pV₂R.GFP. Danach wurde der nicht mutierte DNA-Mutterstrang mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, so dass nur die mutierten Plasmide übrig blieben. Anschließend wurde das Gemisch in elektrokompente *E. coli* (Stamm DH5 α) transformiert. Die DNA wurde isoliert und zur Kontrolle sequenziert.

Tab. 5: Standard-Mutagenese-Ansatz für eine Plasmidgröße von 5,3 bis 6,9 kb.

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Mutterstrang-DNA		50 ng/ μ l	1 μ l
Strangprimer	10 mM	0,5 mM	1 μ l
Gegenstrangprimer	10 mM	0,5 mM	1 μ l
dNTPs	10 mM	0,5 mM	1 μ l
PfuPlus! Puffer B	10 x	1x	2 μ l
			ad 20 μ l H ₂ O
PfuPlus!	2,5 U/ μ l	2 U	0,75 μ l

Tab. 6: Standard-Mutagenese-Programm:

Initiale Denaturierung	94°C	2min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C	15 s	
Primerbindung	58°C	30 s	
Elongation	72°C	1min/1kb PCR Produktlänge	
Finale Elongation	72°C	7 min	
Kühlung	4°C	∞	

Jeder Mutageneseansatz wurde nach der Reaktion mit 1µl *DpnI* für 1 h bei 37°C verdaut.

2.2.2.2 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*) Stamm DH5α

Reagenzien: LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,5)

GYT-Medium (10 % Glycerin, 0,125 % Hefeextrakt, 0,25 % Trypton)

Der Stamm DH5α wurde in 5 ml LB-Medium bei 37 °C in einem sterilen Kulturröhrchen über Nacht angezogen. Von dieser Vorkultur wurden 200 µl in 60 ml LB-Medium in einem 300 ml Erlenmeyerkolben wieder über Nacht schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Zweimal 25 ml dieser Kultur wurden in je einem 2 L- Erlenmeyerkolben mit je 475 ml LB-Medium bei 37 °C geschüttelt bis eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0.35 bis 0.4 erreicht war. Die Kolben wurden anschließend 25 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen auf vier vorgekühlte 500 ml Zentrifugenbecher verteilt und bei 1000×g und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in je 250 ml kaltem Aqua_{3d} vorsichtig resuspendiert und wieder bei 1000×g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert. Je 2 Pellets wurden in 250 ml kaltem 10 % Glycerin resuspendiert, vereint und bei 1000×g und 4 °C 15 min abzentrifugiert. Danach wurden die Pellets in je 10 ml kaltem 10 % Glycerin aufgenommen, in sterile Falconröhrchen überführt und bei 1000×g, 4 °C, 30 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 1 bis 2 ml steriles GYT-Medium vereint und die OD₆₀₀ bestimmt (990 µl GYT und 10 µl Zellen). Die OD₆₀₀ sollte dabei zwischen 0,6 und 0,8 liegen. Zum Schluss wurden die Zellen in sterile PCR-Tubes aliquotiert (40 µl pro PCR-Tube), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

2.2.2.3 Transformation des Mutagenese-Ansatzes in elektrokompetente *E. coli* Stamm DH5 α und Retransformation von Plasmid-DNA

Reagenzien: LB-Medium (10 g/l Pepton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,5)
SOC-Medium (2 % Pepton 140, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose, pH 7,5)
LB-Festmedium (10 g/l Pepton, 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,5, 15 g/l Agar)

Zur Transformation wurden elektrokompetente *E. coli* Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Für einen Mutageneseansatz wurden 4 μ l des PCR-Ansatzes und für die Retransformation 1 μ l gereinigte Plasmid-DNA zu 40 μ l elektrokompetenten Zellen gegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann in eine Elektroporationsküvette (Durchmesser 1 mm) überführt und bei 1200 V elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurden die Proben in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß bei 37 °C für 1 h unter schütteln (600 rpm) inkubiert. Für eine Retransformation von Plasmid-DNA wurden 20 μ l der Zellsuspension ausplattiert. Nach Transformation des Mutageneseansatzes wurden die Zellen ebenfalls bei 37 °C für 1 h unter schütteln (600 rpm) inkubiert und vollständig auf LB-Festmedium mit Kanamycin (100 μ l/ml) als Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C angezogen.

2.2.2.4 DNA – Aufreinigung

Die Plasmidreinigung aus *E. coli* Stamm DH5 α im Mini- und Midi-Format erfolgte mit dem *Nucleospin*[®] *Plasmid QuickPure* für Mini-Präparationen und dem *Plasmid DNA Purification NucleoBond*[®] *PC 100* für Midi-Präparationen.

Die *E. coli* Zellen einer „Übernachtskultur“ (für Mini-Präparation 5 ml LB, für Midi-Präparation 100 ml LB) wurden abzentrifugiert (Mini-Präparation 11000 \times g, 30 s; Midi-Präparation 5500 \times g, 5 min) und das Medium verworfen.

Für eine Mini-Präparation wurde das Bakterienpellet in 250 μ l „Buffer A1“ resuspendiert, 250 μ l „Buffer A2“ dazugegeben, gut geschüttelt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300 μ l „Buffer A3“ wurde die Probe wieder geschüttelt, anschließend

zentrifugiert (11000×g, 5 min) und der Überstand abgenommen. Mit diesem Überstand wurde eine Säule (*Nucleospin[®] Plasmid QuickPure columns*) durch Zentrifugation (11000×g, 1 min) beladen. Anschließend wurde die Säule mit 450 µl „Buffer AQ“ gewaschen (11000×g, 3 min). Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl „Buffer AE“. Dabei wurde die Säule erst 1 min in 50 µl „Buffer AE“ inkubiert und dann zentrifugiert (11000×g, 1min).

Für eine Midi-Präparation wurde das Bakterienpellet in 4 ml „Buffer S1“ mit 100 µg/ml RNase A resuspendiert, 4 ml „Buffer S2“ zugegeben, geschüttelt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml vorgekühltem „Buffer S3“ wurde die Probe wieder gut geschüttelt, 5 min auf Eis inkubiert, anschließend zentrifugiert (12000×g, 30 min bei 4 °C) und der Überstand abgenommen. Dieser Überstand wurde auf eine nach Herstellerangaben equilibrierte Säule (*NucleoBond[®] A X 100 columns*) geladen und die Säule mit 10 ml „Buffer N3“ gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 5 ml „Buffer N5“. Das Eluat wurde mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und zentrifugiert (5500×g, 45 min bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 150 µl H₂O aufgenommen.

2.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgte photometrisch im GeneQuant II-Photometer durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Als Leerwert wurde eine 1 ml Quarzglasküvette mit Lösungsmittel H₂O_{3d} verwendet. Ein Aliquot der Probe wurde 1:40 mit H₂O_{3d} verdünnt, die OD₂₆₀ bestimmt und die Nukleotidkonzentration in der Probe errechnet.

Die Nukleotidkonzentration errechnet sich aus der OD bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor (V) und einem spezifischen Multiplikationsfaktor für DNA (F):

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F; \quad \text{dabei ist } F_{\text{ssDNA}} = 33 \\ F_{\text{dsDNA}} = 50$$

Zusätzlich wurde die OD bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis OD_{260 nm}/OD_{280 nm} lässt eine Aussage über die Verunreinigung bzw. Proteinkontamination in der Lösung zu. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,5 – 2,0 auf.

2.2.2.6 Analytischer Restriktionsverdau

Reagenzien: DNA-Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 40 % w/v Saccharose)

Um zu überprüfen, ob die kodierende DNA im Plasmid vorhanden war, wurde das wildtypische Plasmid und jedes mutierte Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Bg*III verdaut. Die Analyse erfolgte nach einem Standard-Restriktionsverdau.

Standard-Restriktionsverdau:

2 µl 10× *Reaction Buffer 2*
20 U *Bam*HI
10 U *Bg*III
1 µl DNA
2 µl 10×BSA
13 µl H₂O

Der Ansatz wurde bei 37 °C und 600 rpm inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit DNA-Probenpuffer gestoppt, die verdauten DNA-Produkte in der Agarose-Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.2.7 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Reagenzien: TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0)

DNA-Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 40 % w/v Saccharose)

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration von 1 % verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in 1×TAE-Puffer durch Erhitzen vollständig gelöst, anschließend bis auf 50 °C abgekühlt und mit Ethidiumbromid (20 mM) versetzt. Diese Lösung wurde luftblasenfrei in eine Gelkammer gegossen und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel in eine mit 1×TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur überführt und der Kamm entfernt. Die Ansätze aus dem Restriktionsverdau wurden mit DNA-Probenpuffer im Verhältnis 1:5 versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Die

Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 1 V/cm² Gel. Als Größenmarker wurde eine 1 Kb DNA Ladder (Gibco) verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Banden der Nukleinsäuren bei UV-Licht (Wellenlänge: 254 nm) mit einer Videokamera dokumentiert.

2.2.2.8 DNA-Sequenzierung

Reagenzien: 5×Sequenzierpuffer (400 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, pH 9)

Fällungsmix (1.45 ml H₂O_{3d}; 300 µl 3M NaAc, 6.25 ml 100 % Ethanol, pH 4,6)

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode. Dabei wird durch die Anwesenheit von Dideoxynukleotiden in der Sequenzierreaktion eine Kettenverlängerung verhindert. So entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in einem DNA-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Sequenz beginnt mit dem kürzesten Fragment und endet mit dem längsten. Für die Standard-Sequenzier-Reaktion wurde der *BigDye[®] Terminator des V.1.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet (s. Tab. 7 und 8).

Tab. 7: Standard-Sequenzier-Reaktion

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen
Template-DNA		100 ng/µl	1 µl
Sequenzierprimer	10 µM	1 µM	1 µl
<i>BigDye[®] Terminator V.1.1 Cycle Sequencing Kit</i>			0,5 µl
Sequenzierpuffer	5×	1×	1,75 µl
			ad 10 µl H ₂ O

Tab. 8: Sequenzierprogramm

Denaturierung	96°C	10 s	} 25 Zyklen
Hybridisierung	50°C	5 s	
Elongation	60°C	4 min	

Nach der Sequenzierung wurde die DNA mit 42 µl Fällungsmix versetzt, 20 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000×g für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die präzipitierte DNA mit 125 µl 70 % Ethanol gewaschen und bei 13000×g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die elektrophoretische Auftrennung und Detektion erfolgte in dem Applied Biosystems 3100-Avant Genetic Analyzer.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Säugerzellkultur

Reagenzien: Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS)

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4)

HEK293 Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1 g/l Glukose, 2 g/l NaHCO₃ und 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FKS) in Zellkulturschalen in einem wassergesättigten 5 % CO₂ / 95 % Luftgemisch bei 37 °C kultiviert. Um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, wurde dem Medium zusätzlich 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Für eine kontinuierliche Kultur wurden die Zellen alle 3 – 4 Tage 1:6 gesplittet und in frisches Zellkulturmedium überführt.

Zur Versuchsdurchführung wurden definierte Zellzahlen verwendet. Um diese einzustellen, wurde das Medium entfernt und die adherenten Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen, in Trypsin/EDTA geschwenkt und die Zellen für 3 – 5 min bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden wieder in Zellkulturmedium suspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot 1:400 in isotonischer Kochsalzlösung (Casiton) verdünnt und mit dem Zellzähler Casi[®] 1 gezählt. Je nach Experiment wurde die gewünschte Zellzahl in DMEM + 10 % FKS in Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellzahlen und die Volumina zur Transfektion in den verschiedenen Zellkulturschalen sind in Tabelle 9 angegeben.

2.2.3.2 Transiente Transfektion von HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden mit LipofectamineTM2000 transient transfiziert. LipofectamineTM2000 besteht aus kationischen Liposomen, die einen Komplex mit der negativ geladenen DNA bilden und so deren Aufnahme in die Zellen erleichtern.

Die Transfektion erfolgte 24 h nach Zellaussaat. Benötigte Volumina und DNA-Mengen für die unterschiedlichen Schalengrößen sind in Tabelle 9 angegeben. LipofectamineTM2000 wurde 10 min mit DMEM bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die zu transfizierende DNA zugegeben, das Gemisch für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich zu den Zellen gegeben und verteilt.

Tab. 9: Volumina und Zellzahl zur Aussaat und Transfektion von HEK293 Zellen in unterschiedlichen Kulturschalen.

Schalendurchmesser	Zellzahl	DNA	DMEM	Lipofectamine TM 2000
100 mm	4 000 000	6 µg	300 µl	12 µl
35 mm	200 000	0,8 µg	100 µl	1,6 µl
12 mm	100 000	0,2 µg	20 µl	0,4 µl

2.2.4 Mikroskopie lebender und fixierter HEK293 Zellen

2.2.4.1 Immunfluoreszenz

Reagenzien: Fixierlösung (100 mM Cacodylat, 100 mM Saccharose, 1 % Paraformaldehyd, pH 7,5)

Permeabilisierungslösung (0,1 % Triton X-100)

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4)

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnten intrazelluläre Proteine und Kompartimente in fixierten HEK293 Zellen lokalisiert werden. Hierzu wurden die Proteine mit Hilfe eines primären Antikörpers markiert und über einen fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper detektiert.

Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenz wurden HEK293 Zellen auf beschichtete Deckgläser (12 mm Durchmesser) in einer Zellkulturplatte mit 24 Kavitäten ausgesät und transient mit der entsprechenden V₂R-cDNA transfiziert (s. Tab. 8).

Nach 24 Stunden wurde jedes Deckglas 3× mit PBS bei 37 °C gewaschen und in Fixierlösung bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Der Fixierlösung wurde abgesaugt und die Zellen wieder 3× mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in Permeabilisierungslösung für 3 min auf Eis inkubiert und wieder 3× mit PBS (4 °C) gewaschen.

Zur Detektion des ER-Golgi-Intermediärkompartiments (ERGIC) wurden die Zellen vor der Fixierung mit Bafilomycin A1 (10 µg/200 µl in DMEM+10 % FKS) behandelt und für 4 h bei 37 °C inkubiert.

Die Detektion des ERGIC erfolgte mit Hilfe des Antikörpers ERGIC-53. Dafür wurden die Deckgläser aus der Zellkulturplatte in eine geschlossene feuchte Kammer überführt und mit dem 1. Antikörper Anti-ERGIC-53 (Maus) 1:1000 in PBS bei 37 °C für 45 min inkubiert. Die Deckgläser wurden 3× mit eiskaltem PBS gewaschen, erneut in die Kammer überführt und mit dem 2. Antikörper (Cy3 anti-Maus 1:300 in PBS) weitere 45 min bei 37 °C inkubiert.

Danach wurden die Deckgläser 2 x in eiskaltem PBS und einmal in Aqua_{3d} gewaschen und mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger mit einem kleinen Tropfen *IMMU-MOUNT* gegeben. Die Objektträger wurden über Nacht im Kühlschrank getrocknet.

Der wildtypische V₂R und die Rezeptormutanten wurden über ihre GFP-Fluoreszenz detektiert. GFP und Cy3-Fluoreszenzen wurden bei Raumtemperatur am LSM510-META Laser Scanning Mikroskop analysiert (Objektiv: 100 x/1.3 Öl; Optischer Schnitt: <1 µm; Multitrack Mode; GFP, λ_{exc}: 488 nm, Argon Laser, BP Filter: 505-550 nm; Cy3, λ_{exc}: 543 nm, HeNe Laser, LP Filter: 560 nm). Alle Bilder wurden in Photoshop 6.0 importiert und der Kontrast entsprechend den Originalen eingestellt.

2.2.4.2 Mikroskopie lebender HEK293 Zellen

Reagenzien: Trypanblau (0,5 % in H₂O_{3d})

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4)

Zur Lokalisation von GFP-fusionierten V₂R in stabil und transient transfizierten HEK293 Zellen wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (30 mm Durchmesser) in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät (s. Tab. 8). Die transiente Transfektion erfolgte 24 h nach Zellaussaat mit LipofectamineTM2000 (s. Tab. 8). Stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden nach Aussaat auf die beschichteten Deckgläser für 48 h kultiviert. 24 h nach Transfektion der transienten Linien und 48 h nach Aussaat der stabilen Linien wurden die Deckgläser in eine Küvette umgesetzt, mit PBS überschichtet und am LSM analysiert. Zur Färbung der Zellmembran von lebenden Zellen wurde Trypanblau zugegeben. GFP und Trypanblaufluoreszenz wurden bei Raumtemperatur am LSM510-META Laser Scanning Mikroskop aufgezeichnet (Objektiv: 100 x/1.3 Öl; Optischer Schnitt: <1 µm; Multitrack Mode; GFP, λ_{exc}: 488 nm, Argon Laser, BP Filter: 505-550 nm; Trypanblau, λ_{exc}: 543 nm, HeNe Laser, LP Filter: 560 nm). Die Bilder wurden in Photoshop 6.0 importiert und der Kontrast entsprechend den Originalen eingestellt.

2.2.4.3 Hochdurchsatz-Durchmusterung und automatische Mikroskopie: Entwicklung eines Testsystems zur Analyse des Einflusses kleiner Moleküle auf den intrazellulären Transport des V₂R

Reagenzien: Trypanblau (0,05 % in H₂O_{3d})

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4)

Hoechst 33258-Lösung (16 mM Hoechst 33258 in H₂O)

Das Testsystem wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Cellular Imaging (B. Wiesner, FMP Berlin) entwickelt. Stabil transfizierte HEK293 Zellen wurden in 384-Kavitäten Zellkulturplatten (6000 Zellen pro Kavität) in Zellkulturmedium (DMEM + 10 % FKS)

ausgesät. Für Experimente mit pharmakologischen Chaperonen wurden die Zellen nach 32 h mit dem Antagonisten SR121463 (1 μ M) versetzt und 16 h inkubiert.

Zur Auswertung wurden die Zellkerne mit Hoechst 33258 gefärbt (1:400 in PBS) und nochmals 30 min inkubiert. Die Zellen wurden 3 \times mit PBS gewaschen und die Plasmamembranen mit Trypanblau gefärbt (1:10).

Die Analyse der V₂R-Kolokalisation erfolgte mit Hilfe eines automatischen Mikroskops (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena) mit Fluoreszenzlampen in drei verschiedenen Kanälen. Im 1. Kanal wurde die Hoechst 33258 Fluoreszenz detektiert (λ_{exc} : BP Filter: 325-360 nm, λ_{em} : BP Filter: 505-550 nm). Basierend auf dieser Färbung wurde eine Maske für die Zellkerne definiert und damit auch die Zellzahl bestimmt. Im 2. Kanal wurde in diesem Bereich die Trypanblaufärbung detektiert (λ_{exc} : BP Filter: 540-560 nm, λ_{em} : BP Filter: 580-630 nm) und eine Membranmaske definiert. Im 3. Kanal wurde nach den GFP-Fluoreszenzen der Rezeptoren gesucht (λ_{exc} : BP Filter: 450-500 nm, λ_{em} : BP Filter: 510-570 nm). Hierfür wurden zum einen die Intensitäten in der Membranmaske bestimmt ($I_{Membran}$). Weiterhin wurden die intrazellulären Intensitäten bestimmt. Dieses Areal ergab sich aus der Differenz der Zellkernmaske und der Membranmaske ($I_{Zytosol}$). Zur Quantifizierung der GFP-Intensitäten wurde die Ratio (Ratio= $I_{Membran} / I_{Zytosol}$) errechnet und graphisch dargestellt.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Immunpräzipitation und Co-Immunpräzipitation

Reagenzien: Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) SDS, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 1,4 μ g/ml Aprotinin, 3,2 μ g/ml Trypsin-Inhibitor, pH 8)

CoIP-Lysepuffer (0,3% N-dodecyl-beta-D-maltosid, 25 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 1,4 μ g/ml Aprotinin, 3,2 μ g/ml Trypsin-Inhibitor, pH 8)

PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4)

Puffer A (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8)

Waschpuffer I (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8)

Waschpuffer II (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8)

Puffer C (25 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 1,4 µg/ml Aprotinin, 3,2 µg/ml Trypsin-Inhibitor, pH 8)

Puffer D (25 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Benzamidin, 1,4 µg/ml Aprotinin, 3,2 µg/ml Trypsin-Inhibitor, pH 8)

SDS-Probenpuffer (4 x Rotiload reduzierend)

Bei der Immunpräzipitation (IP) wird ein Antikörper an eine Matrix kovalent gebunden und Protein-Antigene aus einer Lösung präzipitiert. Antigene werden mit Hilfe von SDS wieder in Lösung gebracht und mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Eine Co-Immunpräzipitation (CoIP) basiert auf dem gleichen Prinzip. Hier werden aber spezifisch Substanzen detektiert, die mit dem präzipitierten Protein interagieren.

Für die IP bzw. CoIP wurden HEK293 Zellen in 100 mm Zellkulturschalen in Zellkulturmedium (DMEM + 10 % FKS) ausgesät und 24 h nach der Aussaat transient transfiziert (s. Tab. 9). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert. Für eine IP wurden die Zellen 1 h mit 1 ml Lysepuffer/Schale bei 180 rpm und 4 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert, um die Zelltrümmer aus dem Lysat zu entfernen (12 000×g, 4 °C, 30 min). Für eine CoIP wurde anstatt des Lysepuffers CoIP-Lysepuffer verwendet.

a) Vorbereitung der Protein A-Sepharose

Für die Präzipitation wurde Protein A-Sepharose (10 mg pro 100 mm Zellkulturschale) verwendet. Die Protein A-Sepharose wurde zuerst in PBS für 15 min bei 4 °C gequollen. Danach wurde die Sepharose abzentrifugiert (700×g, 4 °C, 5 min). Anschließend wurde die Sepharose 2× in PBS gewaschen und in Puffer A aufgenommen. Die Protein A-Sepharose wurde über Nacht mit 2 µl GFP02 (polyklonaler Antikörper, Thielen A. et al., 2005) beladen.

Für eine CoIP wurde die Sepharose noch zusätzlich mit 2 % BSA und 1 μ M KLAL (amphipathisches, synthetisches Peptid) geblockt.

Danach wurde die Sepharose pelletiert, der Überstand verworfen und das Zelllysate zugegeben. Für eine IP wurden Zelllysate und Sepharose mindestens 3 h, für eine CoIP über Nacht bei 4 °C rotiert. Anschließend wurde die Sepharose bei 4 °C gewaschen. Für eine IP wurde die Sepharose 2× in Waschpuffer I und 1× in Waschpuffer II gewaschen, danach in 100 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95 °C für 5 min gekocht. Für eine CoIP wurde die Sepharose 2× in Puffer C, 2 x in Puffer D und 1× in 12,5 mM Tris-HCl pH 6,8 gewaschen, in 60 μ l SDS-Probenpuffer aufgenommen und ebenfalls bei 95 °C für 5 min gekocht.

2.2.5.2 Verdau mit Endoglykosidasen

Reagenzien: PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4)

Denaturierungspuffer (5 % SDS, 10 % β -Mercaptoethanol)

G5-Puffer (500 mM Natriumcitrat, pH 5,5)

G7-Puffer (500 mM Na_3PO_4 , pH 7.5)

NP-40-Lösung (10 % NP-40 in H_2O)

SDS-Probenpuffer (4 x Rotiload reduzierend, Roth)

Zur Bestimmung der Glykosylierungsmuster des wildtypischen V_2R und der Rezeptormutanten werden diese mit Endoglykosidasen verdaut. Das Glykosylierungsmuster gibt Aufschluss über die Lokalisation des Proteins innerhalb des sekretorischen Weges. Die mannosereiche Form der Proteine ist ausschließlich im ER zu finden. Ab dem medialen Golgi-Apparat findet man die komplex glykosylierte Form.

Endoglykosidasen entfernen Oligosaccharide an bestimmten Spaltstellen. Endoglykosidase H (*EndoH*) spaltet die endständige Chitobiose-Einheit in N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten, so dass nur ein Monosaccharidrest am Protein verbleibt. Peptid: N-Glykosidase F (*PNGaseF*) spaltet zwischen Asparagin und dem endständigen N-Acetylglukosamin (GlcNAc). Dabei verwandelt *PNGaseF* Asparagin in Asparaginsäure. Komplexe

Glykosylierungen sind EndoH resistent und mannosereiche Glykosylierungen *EndoH*-sensitiv. PNGase F spaltet beide Glykosylierungen.

Für den Glykosidaseverdau wurden HEK293 Zellen in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät, nach 24 h transfiziert (s. Tab. 9) und eine Immunpräzipitation durchgeführt (s. 2.5.1). Für den Verdau wurde die Sepharose mit den gekoppelten Proteinen in PBS aufgenommen und mit Denaturierungspuffer 8 min bei 95 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Probe mit NEB-Glykosidasepuffern und den Endoglykosidasen versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die genaue Zusammensetzung der Ansätze ist in Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Endoglykosidaseverdau von Immunpräzipitaten aus einer 100 mm Zellkulturschale

	Verdau mit <i>PNGaseF</i>	Verdau mit <i>EndoH</i>	Arbeitsschritt
PBS	55 µl	60 µl	
Denaturierungs- puffer	5,5 µl	6 µl	8 min 95°C, danach auf Eis stellen
NP-40-Lösung	6 µl		
G7-Puffer	6 µl		
G5-Puffer		6,6 µl	
Enzym	1 µl	1 µl	1 h bei 37°C

Nach dem Verdau wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und über einen monoklonalen GFP-Antikörper detektiert.

2.2.5.3 Oberflächen – Biotinylierung

Mit Hilfe von Biotinylierungsexperimenten können Proteine in der Plasmamembran detektiert werden. Zunächst werden alle Oberflächenproteine mit Hilfe von Sulfo-NHS-Biotin an freien Aminogruppen markiert. Die Rezeptoren werden mit Hilfe der GFP-Markierung immunpräzipitiert und der Oberflächenanteil auf einem Immunoblot über ihre Biotinmarkierung detektiert.

Für die Biotinylierungsexperimente wurden 4 Mio HEK293 Zellen in 100 mm Zellkulturschalen in DMEM + 10 % FKS ausgesät und bei 37 °C für 24 h kultiviert. Danach wurden die Zellen, wie in Tabelle 8 angegeben, transfiziert. 24h nach der Transfektion erfolgte die Biotinylierungsreaktion (alle Schritte bei 4 °C). Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen 3× mit PBS gewaschen. In jede Schale wurde 1 ml Biotinlösung (0,5 mg Biotin/ml PBS) gegeben und für 30 min bei 50 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Biotinlösung wurde entfernt und die Zellen 3× mit PBS gewaschen. Danach wurde in jede Schale 1 ml Lysispuffer gegeben und 1 h bei 180 rpm geschüttelt. Die Lysate wurden 20 min bei 20000×g und 4 °C zentrifugiert und mit dem Überstand eine Immunpräzipitation durchgeführt. Die Detektion des V₂R erfolgte mit Hilfe eines Immunoblots (s. 2.6)

2.2.6 Trennung und Detektion von Proteinen mittels SDS-PAGE und Westernblot

2.2.6.1 Trennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Reagenzien: Trenngelpuffer (Tris-HCl 750 mM, pH 8,8)

Sammelgelpuffer (Tris-HCl 625 mM, pH 6,8)

Trenngel (3 ml Acrylamid-Bisacrylamidlösung (30 % / 0,8 %), 5,625 ml Trenngelpuffer, 56,5 µl 20 % SDS und 2,5 ml H₂O_{3d}, 5,65 µl TEMED und 79 µl 430 mM APS)

Sammelgel (835 µl Acrylamid-Bisacrylamidlösung (30 % / 0,8 %), 625 µl Sammelgelpuffer, 25 µl 20 % SDS und 3,5 ml H₂O_{3d}, 5 µl TEMED und 25 µl 430 mM APS)

SDS-Probenpuffer (4 x Rotiload reduzierend)

Das Trennprinzip der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) basiert auf der Bewegung von Proteinen im elektrischen Feld. Zur Probenvorbereitung werden die Proteine mit SDS (Natriumdodecylsulfat), einem anionischen Detergenz, erhitzt. Pro zwei Aminosäurereste bindet ein SDS-Anion an die Proteine, und es entsteht ein negativer Komplex, dessen Ladung der Masse des jeweiligen Proteins proportional ist. Die Ladungen der einzelnen Aminosäurereste können dann vernachlässigt werden. Durch das Erhitzen werden die nicht-kovalenten Bindungen der Proteine gespalten und durch β-Mercaptoethanol deren Disulfidbrücken gespalten. Die SDS-beladenen Proteine wandern durch ein Gel mit

definierter Porengröße und lassen sich so nach ihrer apparenten molaren Masse auftrennen. Das trennende Gel entsteht durch eine radikalische Polymerisation aus Acrylamid und dem Quervernetzungsreagenz N, N'-Methylenbisacrylamid. Durch das Verhältnis von Acrylamid und Bis-Acrylamid kann die Porengröße variiert werden.

Für die SDS-PAGE wurden die an Sepharose immobilisierten Rezeptoren mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden in die Taschen eines 8 %igen Polyacrylamidgels (8 cm×10 cm×1 mm) gefüllt. Die Auftrennung erfolgte konstant bei 0,25 mA/cm². Als Proteinstandard wurde ein vorgefärbter Proteinmarker (7-175 kDa) verwendet.

2.2.6.2 Western Blot

Reagenzien: Blotpuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 150 mM Glycin, 0,015 % w/v SDS)
Ponceau – Rot (H₂O_{3d} mit 0,1 % Ponceau – Rot und 5 % Trichloressigsäure)
TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2)

Die Technik des Western-Blottens beruht auf der Übertragung der mittels SDS-PAGE nach ihrer molekularen Masse getrennten Proteine auf eine Träger-Membran. Der Transfer erfolgte im elektrischen Feld. Die so immobilisierten Proteine können anschließend durch eine Immunfärbung detektiert werden.

Für den Blot wurde als Träger eine Nylonmembran verwendet, die auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten wurde. Das Blotten erfolgte im Tankblotsystem. Der Aufbau des Blotsandwichs ist in Abb. 2.1 angegeben. Der Transfer erfolgte im elektrischen Feld bei 1,7 mA/cm² für 1,5 h bei 4 °C in Blotpuffer, dem 20 % Methanol zugesetzt wurde, um die Proteinbindungsstellen der Nitrozellulose-Membran zu aktivieren.

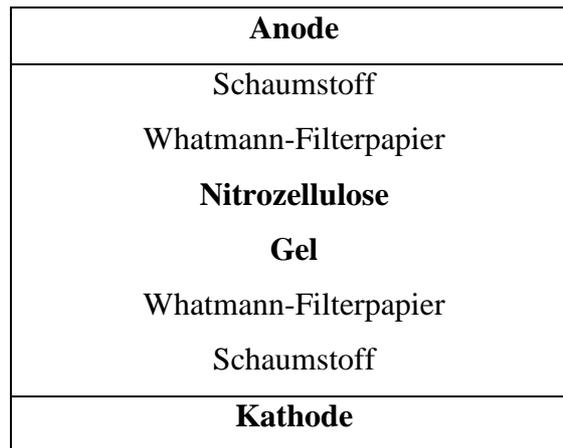


Abb. 2.2: Aufbau eines Sandwich-Blots für den Tankblot.

Zur Überprüfung des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-Rot gefärbt und anschließend durch Inkubation in TBS wieder entfärbt.

2.2.6.3 Nachweis von Proteinen durch Immunfärbung

Reagenzien: TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2)

Blockpuffer (TBST + 2 % BSA)

TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,2)

Vor der Antikörperreaktion wurden die verbleibenden freien Proteinbindungsstellen durch einstündiges Blocken der Membran in TBS mit 4 % Milchpulver abgesättigt. Die geblockte Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4 °C) mit dem 1. Antikörper im Blockpuffer inkubiert (die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 11 angegeben). Danach folgten drei Waschschrte in TBST für je 5 min, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde der Blot für 25 min mit dem Fluoreszenzmarkierten 2. Antikörper (IRDye800 anti-Maus, IRDye800 anti-Kaninchen) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten in TBST und einem Waschschrte in TBS wurden die markierten Proteinbanden mit Hilfe eines Fluorimeters (*Odyssey[®] Infrared Imaging System*, LI-COR[®] Biosciences) detektiert. Die eingesetzten primären Antikörper gegen GFP, Biotin bzw. gegen die Chaperone wurden käuflich erworben.

Tab. 11: Verdünnungen, der in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper. Alle Antikörper wurden in Blockpuffer eingesetzt.

1. Antikörper	Verdünnung in Blockpuffer	2. Antikörper	Verdünnung in Blockpuffer
Anti-GFP monoklonal	1:4000	IRDye700 anti-Maus	1:10 000
Anti-Biotin polyklonal	1:5000	IRDye800 anti-Kaninchen	1:10 000
Anti-Hsp70	1:1000	IRDye700 anti-Maus	1:10 000
Anti-Hsp 90	1:1000	IRDye700 anti-Maus	1:10 000
Anti-Calnexin	1:1000	IRDye800 anti-Kaninchen	1:10 000
Anti-Calreticulin	1:1000	IRDye800 anti-Kaninchen	1:10 000
Anti-Hsc 70	1:1000	IRDye800 anti-Kaninchen	1:10 000
Anti-Grp 78	1:1000	IRDye800 anti-Kaninchen	1:10 000
Anti-Grp 94	1:1000	IRDye800 anti-Kaninchen	1:10 000
Anti-KDEL	1:1000	IRDye700 anti-Maus	1:10 000
Anti-Derlin1	1:1000	IRDye800 anti-Kaninchen	1:10 000

2.2.6.4 Quantifizierung der Proteinbanden

Die Intensitäten der im Immunoblot detektierten Proteinbanden wurden mit Hilfe des Analyseprogramms *Quantl analysis* von *Odyssey[®] LI-COR[®]* densitometrisch bestimmt. Dabei wurden die Proteinbanden markiert und die Intensität über die absolute Farbdichte abgeleitet.

Für die Ermittlung der Oberflächenexpressionen der Rezeptormutanten wurde die Intensität der Proteinbande des wildtypischen Rezeptors als Bezugswert definiert und mit den Intensitäten der Proteinbanden der Rezeptormutanten in ein prozentuales Verhältnis gesetzt. Die Intensitäten wurden auf die jeweiligen GFP-Gesamtintensitäten normiert. Zusätzlich wurde der Membranhintergrund gemessen und von allen Banden abgezogen.

$$I_{\text{Mutante}} = 100 \% * (I_{\text{Mutante}} / I_{\text{GFP}}) / (I_{\text{WT}} / I_{\text{GFP}})$$

Dabei gilt:

I_{Mutante} : Farbdichte der biotinylierten Proteinbanden nach Biotindetektion, abzüglich Membranhintergrund

I_{GFP} : Farbdichte der Proteinbanden nach GFP-Detektion (abzüglich Membranhintergrund)

I_{WT} : Farbdichte der biotinylierten Proteinbanden nach Biotindetektion für den wildtypischen Rezeptor (abzüglich Membranhintergrund)

Für die Ermittlung der Ratio der unterschiedlichen Glykosylierungsstadien der V_2R wurde der Quotient aus der Intensität der komplexen Proteinbande und der Intensität der mannosereichen Proteinbande ermittelt.

$$\text{Ratio} = I_{\text{komplex}} / I_{\text{mannosereich}}$$

Dabei gilt:

I_{komplex} : Farbdichte der komplex glykosylierten Proteinbanden (abzüglich Membranhintergrund)

$I_{\text{mannosereich}}$: Farbdichte der mannosereich glykosylierten Proteinbanden (abzüglich Membranhintergrund)