

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Als eukaryontische Zelllinie wurde in dieser Arbeit eine mit dem Adenovirus Typ 5 transformierte HEK293-Zelllinie (Human Embryonic Kidney cells) benutzt. Bezogen wurde sie von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Bezugsquelle
10 Kilodalton Protein Leiter	Gibco BRL, Deutschland
[³ H]-Arginin-Vasopressin (68,5 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, Deutschland
Alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
Ammoniumchlorid, z. A.	FLUKA Chemie, Schweiz
AquaSave™	Zinsser Analytic, Deutschland
Arginin Vasopressin	FMP, Berlin, Deutschland
Benzamidin	SIGMA, USA
Bromphenolblau, Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cacodylsäure, Natriumsalz-3-Hydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid-2-Hydrat, z. A.	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Cy3™-konjugiertes Ziege-anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
Dikaliumhydrogenphosphat-3-Hydrat, z. A.	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei, z. A.	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Dithiothreitol	New England BioLabs Inc., UK
DNase I, Rnase frei	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Essigsäure, reinst	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, z.A.	J.T. Baker, Niederlande
Ethidiumbromid	Carl Roth, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (Titrierkomplex III, zur Analyse)	Carl Roth, Deutschland
Fetales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Forskolin	SIGMA, USA
Geneticin (G418)	Calbiochem, USA
Glücksklee Magermilchpulver	Nestle Deutschland AG

Glycin, freie Base	Calbiochem, USA
FuGENE6™ Reagent	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat, z. A.	J.T. Baker, Niederlande
Kaninchen anti-GFP-Antiserum	FMP, Berlin, Deutschland
Lumi-Light Western Blotting Substrat	Roche AG, Basel, Schweiz
Monoklonaler Maus-anti-ERGIC53-Antikörper	Hans-Peter Hauri, Biozentrum Basel, Schweiz
Monoklonaler Maus-anti-GFP-Antikörper	Clontech, USA
Monoklonaler Maus-anti-KDEL (anti GRP78)- Antikörper	Stressgen Bioreagents, Victoria, BC, Canada
Natriumdodecylsulfat, reinst (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NeutrAvidin™ (immobilisiert)	Pierce, Rockford, IL, USA
Nitrozellulose (OPTITRAN BA-S 85)	Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland
Paraformaldehyd, reinst	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Penicillin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Peroxidase-konjugiertes-Ziege-anti-Kaninchen- IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
Peroxidase-konjugiertes-anti-Maus-IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
Phenylmethylsulfonylfluorid	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
p-Nitrotetrazoliumblausulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Protein A	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
QuikChange™ <i>in vitro</i> Mutagenese System	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England BioLabs Inc., UK
Rotiphorese™ Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford, IL, USA
Tris(-Hydroxymethyl)-Aminomethan	MERCK, Darmstadt, 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
UltraClean™ DNA purification Kit (Dianova)	BIO101 Inc., USA

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel waren, soweit nicht anders angegeben, zur Analyse geeignet bzw. besaßen den höchstmöglichen Reinheitsgrad. Alle monoklonalen Antikörper waren affinitätsaufgereinigt. In der Zellkultur eingesetzte Substanzen waren als zur Zellzucht geeignet ausgezeichnet. Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Gibco, Merck, Roth, Serva, Sigma, Aldrich, Fluka, Perkin Elmer und KMF Laborchemie.

2.1.3 Geräte

Laser Scanning Mikroskop	Zeiss LSM 510 META, Jena, Deutschland
Lumi-Imager F1™	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Photometer	Pharmacia UV-visible Spectrophotometer, USA
pH-Meter	Hanna Instr. HI9321 Microprocessor pH-Meter, USA
Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus, Fa. Millipore, Eschborn, Deutschland
Rotoren	Beckman TLA-100.4 Festwinkelrotor, USA
	Beckman 70.1 Ti Festwinkelrotor, USA
	Beckman JA-14 Festwinkelrotor, USA
	Sorwall SS34 Festwinkelrotor, (Dupont), USA
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific innova™ 3240, USA
Ultraschaller	B. Braun 1000L, Labsonic, USA
Waagen	Scaltel SBA52, USA
	Mettler Toledo AG245, Deutschland
Zentrifugen	Beckman Optima™ TLX Ultrazentrifuge, USA
	Beckman LE-70, USA
	Beckman TLK-100, USA
	Heraeus Biofuge 15, Deutschland
	Heraeus Biofuge <i>pico</i> , Deutschland
	Sorval RC5C Plus (Dupont), USA
	Stratagene PicoFuge, USA

2.1.3.1 Geräte in der Zellkultur

Brutschrank, Typ Biocenter 2001	Tecnomara, Fernwald, Deutschland
Dampfsterilisator	Tecnomara, Fernwald, Deutschland
Durchsichtmikroskop TELAVAL	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop IMT2-RFL	Olympus, Deutschland
Pipettierhilfe, Typ acuboy	Tecnomara, Fernwald, Deutschland
Sterilbank, Typ ANTAES 48/72	BIOHIT, Köln, Deutschland

2.1.3.2 Geräte für Elektrophoresen und Transfertechniken

Blotkammern	Pharmacia Freiburg, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Hoefer Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammer	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Horizontale Elektrophorese-Apparatur	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spannungsgerät	Hoefer, Freiburg, Deutschland
Mikroliterspritze Typ 710	Hamilton, Reno, USA

In dieser Arbeit wurde für die Experimente Wasser verwendet, dass mit dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem® von organischen und ionischen Bestandteilen befreit wurde und eine Leitfähigkeit von höchstens 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bei Raumtemperatur besaß.

2.1.4 Desoxyribonukleinsäuren

Vektoren

Vektor	Resistenz	Replikon	Promotor	Herkunft
pEGFP-N1	Kanamyzin / Neomycin	ColE1, SV40, M13	CMV immediate early promoter	Clontech
pECFP-N1	Kanamyzin / Neomycin	ColE1, SV40, M13	CMV immediate early promoter	Clontech

Rekombinante Plasmide

Rekombinantes Plasmid* ¹	Vektor	Funktioneller Bereich	Herkunft
pV2R.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	Schülein <i>et al.</i> , 1998
pL62P.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	Krause <i>et al.</i> , 2000
pΔL62-R64.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	Krause <i>et al.</i> , 2000
pH80R.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	in dieser Arbeit beschrieben
pS167L.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	in dieser Arbeit beschrieben
pT204N.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	Schönenberger, unpubliziert
pY205C.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	Zühlke, 2003
pV206D.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	Schönenberger, unpubliziert
pV226E.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	in dieser Arbeit beschrieben
pInsQ292.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	in dieser Arbeit beschrieben
pR337X.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kan ^R	in dieser Arbeit beschrieben
pL62P.CFP	pECFP-N1	V2R-CFP-Fusion, Kan ^R	in dieser Arbeit beschrieben
pY205C.CFP	pECFP-N1	V2R-CFP-Fusion, Kan ^R	in dieser Arbeit beschrieben

*¹ Die Zahlen in der Plasmidbezeichnung entsprechen den ausgetauschten Aminosäuren.

2.2 Methoden

Sofern keine Literatur angegeben ist, wurden die Methoden dem Handbuch von Sambrook und Russell (2001) entnommen oder sind an diese angelehnt.

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Spezifische DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Plasmidkonstruktion

Für die Generierung der Plasmide pL62P.CFP und pY205C.CFP wurden die entsprechenden cDNAs aus den Plasmiden pL62P.GFP und pY205C.GFP und ebenso der Klonierungsvektor pECFP-N1 mit den Restriktionsendonukleasen BamH I und Sac I verdaut. Für den Verdau wurden die vom Hersteller geforderten Bedingungen eingehalten und die mit den Restriktionsendonukleasen gelieferten Puffer verwendet. Zu der gelösten DNA wurde die erforderliche Menge Restriktionsendonuklease, der entsprechende 10x Reaktionspuffer und H₂O pipettiert (Endvolumen 20 µl). Eine Einheit Restriktionsendonuklease spaltete dabei in einer Stunde 1 µg DNA in einem Endvolumen von 20 µl bei 37 °C. Der Reaktionsansatz wurde für mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert; die Spaltung wurde durch Zugabe von 1/5 Volumen Stopppuffer (Bromphenolblau 0,2% (w/v), EDTA (pH 8,0) 1 mM in Glycerin 50% (w/v)) abgebrochen und das Gemisch auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen.

Die Generierung der Plasmide pH80R.GFP, pS167L.GFP, pV226E.GFP, pInsQ292.GFP und pR337X.GFP wurde durch gerichtete Mutagenesen unter Einsatz des QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis-Kits durchgeführt. Dabei diente das Plasmid pV2R.GFP als Matritze.

2.2.1.2 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Es wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1% (w/v) gewählt. Hierfür wurden 2 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer suspendiert, durch Aufkochen in Lösung gebracht, auf ca. 50 °C abgekühlt und in eine horizontale Kammer gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit TAE-Puffer (Tris-Base 4,85 g/l, Essigsäure 0,114% (v/v), EDTA 3,72 g/l, pH 7,8) überschichtet und die mit Stopppuffer (Bromphenolblau 0,2% (w/v), EDTA (pH 8,0) 1 mM in Glycerin 50% (w/v)) versetzten DNA-Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 80-120 V vom Minus- zum Pluspol. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gefärbt. Die Detektion

der DNA-Banden erfolgte unter dem Transilluminator im UV-Licht bei 260 nm. Die entsprechenden DNA-Banden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des „Ultra Clean DNA Purification Kit™“ der Firma Dianova aus dem Agarosegel isoliert und aufgereinigt.

2.2.1.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligationen wurde ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1/2 bis 1/3 gewählt. Die zu ligierende DNA wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einer entsprechenden Menge 10x Ligationspuffer (MgCl₂ 100 mM, DTT 100 mM, dATP 10 mM, BSA 25 µg/ml in Tris-HCl 500 mM, pH 7,5) sowie 1 µl (1 Einheit) T4 DNA-Ligase versetzt und mit H₂O auf das gewünschte Endvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 12-16 Stunden bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurde das neu klonierte Konstrukt in *E. Coli* des Stammes DH10β nach Vorschrift aus Sambrook und Russell, 2001 transformiert. Zur Verifizierung der DNA-Sequenz wurde die DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode nach Tabor und Richardson (1987) durchgeführt.

2.2.2 Säugerzellkultur

HEK 293-Zellen wurden in DMEM-Zellkulturmedium („Dulbecco’s Modified Eagle Medium“) mit 1 g/l Glukose, 2 g/l NaHCO₃, 10 % (v/v) FKS („fetales Kalbsserum“), 1 IE/ml Penicillin und 1 µg/ml Streptomycin in Zellkulturschalen in einem H₂O-gesättigten 5 % CO₂ / 95 %-Luftgemisch bei 37 °C kultiviert. Die Zelllinien wurden bei Konfluenz je nach Bedarf im Verhältnis 1:5-1:15 gesplittet. Zweimal in der Woche wurde das Medium gewechselt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen vor der Aussaat in einem geeigneten Volumen Zellkulturmedium suspendiert und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Aus Tabelle 2.1 ist zu entnehmen, wieviele Zellen in die entsprechenden Schalen ausgesät wurden.

Zum Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen in DMEM-Zellkulturmedium aufgenommen, welches 10 % (v/v) DMSO enthielt. Beim Auftauen wurden die Zellen sofort mit 2 ml Wachstumsmedium mit 20% FKS versetzt und bei 200 x g 5 Minuten lang abzentrifugiert, in Wachstumsmedium inklusive Antibiotika resuspendiert und in Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.2.1 Transiente Transfektion von HEK 293-Zellen

HEK 293-Zellen exprimieren konstitutiv das humane Adenovirus Typ 5 DNA-Gen. Die transiente Transfektion der Zellen mit Plasmiden erfolgte mit Hilfe von kationischen Lipiden (FuGENE6™). Diese binden an die negativ geladene DNA und können als Liposomen-Nukleinsäure-Komplex mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren. Da die transfizierte DNA aber auch in den Zellkern gelangen muss, ist es von Vorteil, dass unmittelbar nach der Transfektion die Schalen nicht zu dicht bewachsen sind, um eine hohe Mitoserate zu gewährleisten. Daher wurden Zellen generell am Folgetag der Aussaat transfiziert. Es wurden folgende Zellzahlen, DNA-Mengen und Volumina des Transfektionsreagenz für die jeweilige Schalengröße eingesetzt:

Tabelle 2.1: Zellaussaat und Transfektionsvolumina

Schale (mm Ø)	Medien-Volumen (ml)	Einheit	Zellzahl (Aussaat)	DNA-Masse (µg)	Volumen FuGENE6™ (µl)
15	1	24er Platte	50.000	0,25	1
35	2	Schale	200.000	1	3
60	5	Schale	800.000	2.5	7
100	10	Schale	3.500.000	6.25	20

Bei der Transfektion wurde Zellkulturmedium (ca. 5% des Gesamtvolumens in der Schale) vorgelegt und anschließend die erforderliche Menge FuGENE6™ zugesetzt. Nach kurzem Mischen wurde dann das entsprechende Volumen DNA-Lösung zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur 15 bis 30 Minuten lang inkubiert und erst dann zu den Zellen in Kultur gegeben. Die transiente Expression der hier untersuchten Proteine war nach ca. 18 bis maximal 60 Stunden am höchsten. Daher wurden alle weiteren Experimente 1 oder 2 Tage nach der Transfektion durchgeführt.

2.2.2.2 Stabile Transfektion von HEK 293-Zellen

Für das Generieren von HEK293-Zellklonen, welche die von den jeweiligen cDNAs kodierten Proteine stabil exprimieren, wurden die Zellen in einer Zahl von 200.000 pro 60er Schale ausgesät. Am zweiten Tag wurde dann wie bei der transienten Transfektion transfiziert. Am 4. oder 5. Tag erst wurden die Zellen weiter aufgeteilt und im entsprechenden

Selektionsmedium inkubiert, um sicherzustellen, dass sie sich etwa 2 bis 3x geteilt haben. Dabei wurde im Falle der hier verwandten Plasmide als Selektionsantibiotikum Geneticin (G418) in einer Endkonzentration von 400 µg/ml im herkömmlichen Zellkulturmedium verwendet. Bei dieser Aufteilung der Zellen wurde für jede Transfektion eine Verdünnungsreihe in den Schritten 1:10 über mindestens 8 sequentielle Verdünnungsschritte hergestellt, um die Zellen zu vereinzeln und somit individuelle Zellklone zu isolieren und identifizieren zu können. Die Wirksamkeit des Selektionsmediums ist hierbei abhängig von der Zelldichte. In der Folgezeit wurde das Medium alle 3-4 Tage mindestens 3 x gewechselt. Zellhaufen, die auf Einzelzellen zurückgingen und somit einen Klon darstellten, ließen sich im Fluoreszenzmikroskop erkennen. Diese wurden mit autoklavierten Wattestäbchen abgelöst, nachdem sie für einige Minuten mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02% w/v in PBS) inkubiert wurden. Um die stabile Expression des Fusionsproteins zu bestätigen, wurden die Zellklone in den folgenden Tagen am Fluoreszenzmikroskop betrachtet bzw. eine Membranpräparation (siehe 2.2.3.1) mit anschließendem Westernblot (siehe 2.2.6) durchgeführt. Dadurch konnten von transienten Transfektionen abweichende Transporteigenschaften oder Instabilität der exprimierten Proteine durch vorzeitige Proteolyse ausgeschlossen werden.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Präparation von nativen Membranen aus Säugerzellen

Für die Fraktionierung eukaryontischer HEK 293-Zellen wurden pro untersuchtem überexprimierten Rezeptor jeweils 2 konfluent bewachsene Kulturschalen (60 mm Durchmesser) verwendet. Die Zellen wurden 3 x mit eiskaltem PBS (80 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 Na₂HPO₄ x 2H₂O g/l, 0,2 g/l KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, mit 750 µl PBSI (0,8% (v/v) Proteaseinhibitorengemisch (100 mM Benzamidin, 2 µg/ml Trypsininhibitor, 1 µg/ml Aprotinin), 500 µM PMSF in PBS) abgeschabt und mit dem Ultraschallgerät (2 x 10 Sekunden) lysiert. Die Trennung von membrangebundenen und löslichen Proteinen erfolgte durch Ultrazentrifugation (60.000 g, 4 °C, 1 Stunde). Die löslichen Proteine wurden mit dem Überstand verworfen. Das Membranpellet wurde in 300 µl PBSI resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (60.000 g, 4 °C, 1 Stunde) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 300 µl PBSI resuspendiert. An diese Präparation schloss sich eine limitierte Proteolyse mit Trypsin an (siehe 2.2.6.1).

2.2.4 Mikroskopische Methoden

Für die Mikroskopie wurden in dieser Arbeit HEK 293-Zellen verwendet, die auf Deckgläsern in Zellkulturschalen (35 mm Durchmesser) ausgesät wurden. Bei transienten Transfektionen wurde die mikroskopische Analyse je nach Zelldichte nach 1 bis 2 Tagen durchgeführt. Die Deckgläser wurden 2 x mit PBS (80 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,2 g/l KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen, in eine selbst gebaute Kammer eingespannt und mit 1 ml PBS bedeckt. Die entsprechenden Fluorophore (siehe Tabelle 2.2) wurden dann von verschiedenen Lasern angeregt und die Fluoreszenzsignale abwechselnd gescannt. In dieser Arbeit wurden nur „x/y-Scans“ aufgenommen, d.h. die abgebildete Ebene befand sich parallel zum Deckglas.

Tabelle 2.2: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorophore

Fluorophor	Anregungswellenlänge (λ_{exc}) [nm]	Emissionswellenlänge (λ_{em}) [nm]	Laser
GFP	488	505-530	Argon
CFP	810	430-498	Chameleon™
Cy3™	543	560-615	Helium-Neon
Trypanblau	543	560	Helium-Neon
Fluos	488	500-550	Argon

2.2.4.1 Trypanblaufärbung

Der Farbstoff Trypanblau färbt durch kovalente Kopplung des Farbstoffs an Proteine selektiv die Plasmamembran von Zellen, sofern sie intakt sind. Bei Perforationen der Zelloberfläche werden auch intrazelluläre Proteine detektiert. Daher eignet sich diese Methode sowohl zur Überprüfung der Plasmamembranintegrität als auch zur Markierung der Zelloberfläche.

Vor den LSM-Aufnahmen wurden 50 μ l Trypanblau (0,05 % (w/v)) zu den in PBS gepufferten, vorher auf Deckgläsern ausgesäten Zellen pipettiert. Die Trypanblaufluoreszenz wurde nach 3 (Markierung der Zellmembran) bzw. 15 Minuten (Plasmamembranintegritätstest) Inkubationszeit analysiert.

2.2.4.2 Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten

Für die Bestimmung des Verhältnisses zwischen GFP-Fluoreszenzen an der Plasmamembran und dem Intrazellulärraum von HEK 293-Zellen wurden entsprechend Abschnitt 1.1 zunächst

die Plasmamembranen mit Trypanblau angefärbt. Es wurde dann ein repräsentatives Areal an der Zelloberfläche und im Intrazellulärraum markiert. Die Fluoreszenzintensitäten der eingegrenzten Areale wurden mittels der Software der Firma Carl Zeiss Jena (LSM 510 META Image Examiner, Version 3.2™) errechnet und ein Quotient aus plasmamembranständiger und intrazellulärer Fluoreszenzintensität gebildet. Pro Experiment wurden mindestens 25 identisch vorbehandelte Zellen jedes Ansatzes analysiert. Die Ergebnisse wurden in Balkendiagrammen dargestellt (arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung), wobei die erhaltenen Werte vorher auf Normalverteilung geprüft wurden.

2.2.5 Organisch-chemische Methoden

2.2.5.1 Peptidsynthese und Carboxyfluoreszin-Markierung

Die Herstellung der Peptide erfolgte in der AG Beyermann (FMP, Berlin) nach dem Prinzip der Festphasen-Synthese am automatischen Peptidsynthesizer ABI 433A. Es wurde mit Fmoc (N-(9-Fluorenyl)-Methoxycarbonyl)-Chemie und mit TBTU als Kupplungsreagenz nach einem optimierten Standardprotokoll (Beyermann *et al.*, 1996) gearbeitet. Carboxyfluoreszin (Fluos) wurde dabei am Peptidharz unter Verwendung eines Fluos-NHS-Esters (2 Äquivalente in DMF über Nacht) N-terminal nach der letzten Fmoc-Abspaltung eingeführt. Nach der letzten Abspaltung der Schutzgruppe mit einem Trifluoressigsäure / Wasser-Gemisch im Verhältnis 9:1 (v/v) wurden die Peptide über eine präparative HPLC bis zu einer Reinheit der Endprodukte von mindestens 95% von anderen Nebenprodukten getrennt. Die Sequenz bzw. Identität der Peptide wurde mit Hilfe der Massenspektrometrie überprüft.

2.2.5.2 Peptidbehandlung der Zellen

Zur Herstellung der jeweils 1 mM Stammlösungen wurden die Peptide in Wasser gelöst. Für die Peptidbehandlung von Zellen wurden diese Stammlösungen 6 bzw. 12 Stunden vor dem Aufarbeiten der Zellen direkt dem Kulturmedium in den Schalen zugesetzt. Die Lagerung der ungelösten Peptide und ihrer Stammlösungen erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.5.3 Behandlung der Zellen mit Bafilomyzin A1

Für die Herstellung der 200 μM Stammlösung wurde die Substanz direkt in Wasser gelöst. Die Behandlung der Zellen erfolgte 4 Stunden vor den mikroskopischen Aufnahmen bzw. Aufarbeitung der Zellen für die Immunfluoreszenz durch Zusatz der Stammlösung zum

Zellkulturmedium. Die Endkonzentration betrug stets 1 μM . Die Lagerung der Substanz und ihrer Lösung erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.6 Proteinchemische Methoden

2.2.6.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts präparierter Zellen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des Proteinassays nach Bradford (1976). Hierzu wurde jeweils eine geeignete Verdünnung der Proteinlösung entweder aus einer Membranpräparation (siehe 2.2.3.1) oder aus einem Zelllysate (siehe 2.2.6.3 oder 2.2.7.3) mit Proben bekannter Ovalbumin-Konzentrationen (0-12 μg) versetzt und für mindestens 10 Minuten bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Abkühlen und Zugabe von 1 ml einer 1:5 Verdünnung des Farbstoffkonzentrats „CBB“ (Coomassie brilliant blue) wurde die Absorption bei 595 nm photometrisch vermessen. Die Quantifizierung erfolgte durch Erstellen einer Eichkurve.

2.2.6.2 Limitierte Proteolyse von Rezeptoren mit Trypsin

Für dieses Experiment wurden die präparierten Membranen zu 6 gleichen Teilen aufgeteilt (50 μg Gesamtmembranproteingehalt pro Aliquot). Der Verdau wurde für 30 min bei 4°C mit aufsteigenden Trypsinkonzentrationen (0; 15; 37,5; 75; 112,5; 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in EDTA-Lösung (0,02% (m/V) in PBS) durchgeführt. Anschließend wurden die Ansätze in 4x Laemmli-Puffer aufgenommen und vor dem Einfrieren oder der SDS-PAGE (siehe 2.2.6.3) 15 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.6.3 Biotinylierungsexperiment zum Nachweis der Anwesenheit von Rezeptoren an der Zelloberfläche

Eine mit HEK 293-Zellklonen konfluent bewachsene Zellkulturschale (60 mm Durchmesser) wurde 3 x mit je 3 ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschliessend wurde jeder Schale 1,5 ml der EZ-Link® Sulfo-NHS-Biotinlösung (0,5 mg/ml in PBS) zugesetzt und für 30 min bei 4°C langsam geschwenkt. Die Reaktion wurde durch Austausch der Biotinlösung durch 1 ml Ammoniumchloridlösung (50 mM in PBS) und 10 min langem Schütteln abgestoppt. Die Schalen wurden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Puffer A (150 mM NaCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ pH 8, 0,1 % Triton X-100 (v/v), 0,1 % SDS (w/v), 500 μM PMSF und 0,8% (v/v) Proteaseinhibitorengemisch (Zusammensetzung siehe 2.2.3.1) in 50 mM Tris-HCL, pH 8,0) eine Stunde lang bei 4°C schüttelnd inkubiert. Der Überstand mit den nun

suspendierten und lysierten Zellen wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 10 µl für die Gesamtproteingehaltsbestimmung (siehe 2.2.6.1) abgezweigt. Der Überstand wurde durch Zentrifugieren (20 min, 47.000 x g, 4°C) von Zelltrümmern gereinigt, mit 100 µl NeutrAvidin™-Sepharosesuspension versetzt und für 2 Stunden bei 4°C im Rotator inkubiert. Die nun entstandenen Neutravidin-Biotin-Proteinkomplexe wurden für 3 Minuten bei 16.500 x g abzentrifugiert und 1 x mit Waschpuffer 1 (500 mM NaCl, 1 mM Na₂-EDTA pH 8, 0,5 % Triton X-100 (v/v), 0,1 % SDS (w/v) in 50 mM Tris-HCL, pH 8,0) und 3 x mit Waschpuffer 2 (1 mM Na₂-EDTA pH 8, 0,5 % Triton X-100 (v/v), 0,1 % SDS (w/v) in 50 mM Tris-HCL, pH 7,4) gewaschen. Die Komplexe wurden in 50 µl Lämmli gelöst und für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Eventuell noch vorhandene suspendierte Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 16.500 x g für 5 Minuten abgetrennt und die isolierten Proteine im Überstand elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.6.4 Proteintrennung durch Gelelektrophorese

Die aufbereiteten Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Für die entsprechenden Gele wurden dabei folgende Lösungen verwendet:

Sammelgel: 5 % (w/v) Acrylamid
 0,033-0,099 % (w/v) Bisacrylamid
 0,1 % (w/v) SDS
 60 mM Tris/HCl, pH 6,8
 0,05 % (w/v) APS
 0,1 % (v/v) TEMED

Trenngel: 12-16 % (w/v) Acrylamid
 0,075-0,1 % (w/v) Bisacrylamid
 0,1 % (w/v) SDS
 385 mM Tris/HCl, pH 8,8
 0,05 % (w/v) APS
 0,035 % (v/v) TEMED

Die einzelnen Komponenten des Trenngels wurden gemischt und sofort in die Kammer gegossen. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde das Sammelgel angesetzt, über das Trenngel gegossen und anschließend ein Kamm eingesetzt (10 Probenaschen). Die mit Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben (hier die mit Trypsin verdauten Membranfraktionen oder Proben aus den Immunpräzipitationen bzw. Biotinylierungen) wurden bei Raumtemperatur kurz abzentrifugiert und mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen

pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „High Molecular Weight“-Größenstandard (100 kDa Protein Ladder) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei konstanter Stromstärke (30 mA). Der Laufpuffer enthielt 10 g/l SDS, 144 g/l Glycin und 30 g/l Tris.

2.2.6.5 Transfer und Immobilisierung elektrophoretisch getrennter Proteine auf Membranen

Durch SDS-PAGE (siehe 2.2.6.4) aufgetrennte Proteine wurden nach der von Towbin *et al.*, (1979) beschriebenen Methode elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran oder PVDF-Membranen (Polyvinylidendifluorid) übertragen. Hierfür wurde die Membran und das Gel zwischen mehrere mit Blotpuffer (0,02 % (m/v) SDS, 20 mM Tris, 150 mM Glyzin, 20 % (v/v) Methanol) getränkte Whatman-3MM-Filterpapiere gelegt und so zwischen zwei Graphitelektroden angeordnet, daß sich die Membran auf der Anodenseite vor dem Gel befand. Der Transfer erfolgte für 1,5 Stunden bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² und 4°C, wobei die Proteine vom Gel zur Membran wanderten und dort zurückgehalten wurden. Anschließend wurden die Proteine auf der Nitrozellulose mit Ponceau S-Lösung (0,2 % (m/v) in 3 % Trichloressigsäure (m/v)) angefärbt.

2.2.7 Immunologische Methoden

2.2.7.1 Immunfluoreszenz

Für dieses Experiment wurden transient oder stabil transfizierte HEK 293-Zellen auf einem Deckglas von 12 mm Durchmesser verwendet (max. 50 % Konfluenz). Das Deckglas mit den Zellen wurde 3 x mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (130 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄; 5,5 mM Glukose und 10 mM HEPES; pH 7,4) bei 37°C gewaschen, für 30 Minuten in IF-Fixierpuffer (2,5 % (v/v) Paraformaldehyd; 100 mM Natriumcacodylat; 100 mM Sucrose; pH 7,5) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS für jeweils 5 Minuten wurden die Deckgläser nun 45 Minuten lang (37 °C) mit dem monoklonalen Maus-anti-ERGIC53-Antikörper (1:1000 in PBS) in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit eiskaltem PBS (3 x 5 min) wurde mit dem anti-Maus cy3TM-gekoppelten Zweitantikörper (1:350 in PBS) in der Feuchtkammer 45 Minuten lang (37°C) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Deckgläser

mit einem Tropfen Mountingmedium (Shandon ImmuMount®) versehen und mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger geklebt. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mikroskopisch untersucht.

2.2.7.2 Western-Blot

Freie Proteinbindungsstellen wurden auf der Nitrozellulose-Membran 30 Minuten lang mit 5 % (m/v) Magermilchpulver in TBST-Puffer (0,01 % (v/v) Triton X-100 in TBS (6,05 g/l Tris-Base, 8,76 g/l NaCl, 0,1 g/l NaN₃; pH 7,2)) abgesättigt. Der Primärantikörper wurde zugegeben (Maus-anti-GFP-Antikörper 1:2000 bzw. polyklonales Kaninchen-anti-BiP-Antiserum 1:1000 bzw. monoklonaler Maus-anti-KDEL(GRP78)-Antikörper 1:1000) und die Membran für 1 Stunde in Magermilchpulver (5 %) in TBST inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x für jeweils 10 min mit TBST gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde zugegeben (Anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-Immunglobuline gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (HRP) 1:2500 bzw. 1:5000 in Magermilchpulver/TBST) und für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und mit einem 1:1-Gemisch aus Reagenz 1 (100 mM Tris-HCl, pH 8,5; 0,044% (v/v) Luminol; 0,0066% (v/v) *p*-Cumarinsäure) und Reagenz 2 (18 µl 30% (v/v) H₂O₂ in 100 ml Tris/HCl, pH 8,5) benetzt. Nach Ablauf der Chemolumineszenz-Reaktion wurden die Banden mit Hilfe des Lumi-Imager F1® detektiert.

Im Falle der Detektion von Rezeptoren bzw. ihren Fragmenten aus der limitierten Proteolyse mit Trypsin (siehe 2.2.6.2) wurde ein Konjugat aus Anti-Kaninchen-IgG und alkalischer Phosphatase als Zweitantikörper in der Verdünnung 1:2000 eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen der Membranen wurden die Proteinbanden mit einem Gemisch aus BCIP (0,56 mM), NBT (0,48 mM) und 60 mM Magnesiumchlorid in 10 mM Tris/HCl, pH 9,5 eingesetzt. Die immunreaktiven Proteinbanden wurden nach 5-15 Minuten sichtbar.

2.2.7.3 Immun- und Koimmunpräzipitationsuntersuchungen

Immunpräzipitationen wurden durchgeführt, um aus einem Zelllysat Rezeptoren mittels eines über Protein A an Sepharose gebundenen Antikörpers anzureichern. Diese Rezeptoren und/oder assoziierte Proteine (Koimmunpräzipitation) wurden dann mittels Western-Blot nachgewiesen. Am Versuchstag wurden Zellkulturschalen (zu ca. 80 % konfluent; 100 mm Durchmesser) zunächst 3 x mit PBS (Zusammensetzung siehe oben) gewaschen und anschließend mit jeweils 1,2 ml Puffer B [0,3 % (m/v) N-Dodecyl-β-D-Maltosid, 25 mM

Tris-HCl, 10 mM Kalziumchlorid, 0,5 mM PMSF, 0,5 mM Aprotinin, 0,5 mM Benzamidin, 0,5 mM DABCO, 0,8 % (v/v) Proteaseinhibitorengemisch (Zusammensetzung siehe Membranpräparation), pH 8,0] eine Stunde lang bei 4°C lysiert. Parallel wurde die entsprechende Menge an Protein A-Sepharose (ca. 10 mg pro 100er Schale) für 30 Minuten in Puffer B vorgequollen und dann die entsprechende Menge an polyklonalen Kaninchen-anti-GFP-Antiseren (ca. 4 µl pro 100er Schale) ermittelt. Das Zelllysate wurde anschließend für 30 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der hier entstehende klare Überstand wurde zur Immunpräzipitation über Nacht (mindestens jedoch 3 Stunden lang) mit dem Gemisch aus Protein A-Sepharose und Antikörper bei 4 °C im Rotator inkubiert. Die Präzipitate wurden jeweils bei 4°C für 10 Sekunden wie folgt gewaschen:

- 2 x Puffer B
- 2 x Puffer C (Puffer B mit nur 0,1 % statt 0,5 % (m/V) N-Dodecyl-β-D-Maltosid)
- 2 x Puffer D (Puffer C mit 2 mM EDTA statt Kalziumchlorid).

Zwischen den Waschschritten wurden die Immunpräzipitate für 30 Sekunden bei 500 g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Waschpuffer mit einer Hamilton-Pipette komplett entnommen, und die gebundenen Proteine mit 50 µl 1 x Lämmli-Puffer für 10 min bei Raumtemperatur und 5 min bei 95 °C eluiert. Nach Zentrifugation (2 min; 10.000 g) wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und im Western-Blot detektiert.

2.2.8 Pharmakologische Methoden

2.2.8.1 Spezifische Bindung des radioaktiv markierten Agonisten [³H]AVP an die Zelloberfläche

Für dieses Experiment wurden stabil transfizierte HEK 293-Zellklone in 24-well-Zellkulturplatten (15 mm Durchmesser) verwendet. Es wurde nur eine Konzentration des Agonisten [³H]AVP aus dem Sättigungsbereich eingesetzt (50 nM AVP = 25 x K_D-Wert; Krause *et al.*, (2000)).

Die Zellen wurden bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Am Versuchstag wurden sie zweimal mit eiskaltem Waschpuffer DPBS (0,133 g/l CaCl₂ x 2H₂O, 0,1 g/l MgCl₂ x 6H₂O, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH₂PO₄, 8 g/l NaCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄, ad 1 l H₂O, pH 7,4) gewaschen.

Parallel wurden die Zellen von jeweils 2 wells zur Gesamtproteingehaltsbestimmung (siehe 2.2.6.1) abgezweigt.

Die totale Bindung wurde durch Zugabe von 450 μ l des [3 H]AVP enthaltenden DPBS-Puffers (Aktivität 68,5 Ci/mmol) in jedes well bestimmt. Zur Verdrängung des radioaktiv markierten Agonisten, d.h. zur Messung der unspezifischen Bindung wurden 450 μ l AVP-haltigen DPBS-Puffers in der Konzentration 1 μ M in die hierfür vorgesehenen Wells gegeben. Es wurden für alle Werte Dreifachbestimmungen vorgenommen. Nachdem die Zellen für 2 Stunden bei 4°C mit den entsprechenden Puffern inkubiert wurden, wurden sie 3 x mit je 2 ml DPBS gewaschen und anschließend mit jeweils 500 μ l einer auf 40–50 °C vorgewärmten 0,1 N Natronlauge lysiert. Die Lysate wurden dann in die einzelnen Szintillationsgefäße überführt und mit jeweils 4 ml der Szintillationsflüssigkeit (Aquasafe 300 Plus®) vermischt. Die Aktivitäten wurden in einem β -Counter gemessen. Die spezifische Bindung ist die Differenz aus unspezifischer und totaler Bindung.

2.2.9 Statistische Auswertungen

Die Datenauswertung erfolgte bei quantitativen Untersuchungen unter Verwendung der Programme Microsoft Excel™, GraphPad Prism™ (Version 3.00) und der Zeiss LSM Software™ (Version 3.2). Zur Beschreibung der Daten wurden bei normalverteilten Werten arithmetische Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) berechnet und in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Unterschiede wurden dann als signifikant bewertet, wenn nach Student's t-Test $p < 0,05$ war. Alle dargestellten Abbildungen repräsentieren jeweils die Ergebnisse mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführter Experimente.