

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Handhabung von Bakterienstämmen

3.1.1.1 Kultivierung von Bakterienstämmen

Einer bei -80°C gelagerten Glycerin-Dauerkultur (XL1-Blue oder DH5 α in LB-Medium, 25% (v/v) Glycerin) des Bakterienstammes wurde ein Aliquot entnommen und auf einer LB-Platte (+ Tetracyclin) ausgestrichen. Die Zellen wurden ü.N. bei 37°C kultiviert. Die Platten wurden anschließend bei 4°C bis zu 4 Wochen gelagert.

3.1.1.2 Präparation transformationskompetenter Bakterien

Eine stationäre Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes in LB-Medium (+Tetracyclin bei XL1-Blue) wurde 1:60 in frisches LB-Medium überimpft und bis zu einer optischen Dichte OD_{600} von 0,5 - 0,6 (log-Phase) weiter inkubiert. Nach dem Sedimentieren (20min, 4200Upm, 4°C , Beckmann JA-10 Rotor) wurde zweimal mit sterilem entionisiertem Wasser und einmal mit 10% Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde zuletzt im vierfachen Volumen 10% Glycerin aufgenommen und in 50 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

3.1.1.3 Transformation von Bakterien

Das Einbringen von Plasmid-DNA in Bakterien erfolgte nach dem Elektroporationsverfahren. Transformationskompetente Bakterien (XL1-Blue und DH5 α) wurden nach Ausubel *et al.*, 1993 (Ausubel *et al.*, 1993) hergestellt. Zur Transformation wurden 50 μl frisch aufgetaute Bakteriensuspension mit 1 μl des Ligationsansatzes versetzt und im Gene Pulser (BIORAD, Hercules, USA) bei 2,5kV, 400 Ω und 25 μF elektroporiert. Anschließend wurden die Bakterien in pseudo-SOC aufgenommen,

nach etwa dreißigminütiger Inkubation bei 37°C auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht wiederum bei 37°C kultiviert.

3.1.2 Präparation von DNA

3.1.2.1 Präparation von Plasmid-DNA aus 2ml-Kulturen (Miniprep)

Die Anzucht des plasmidtragenden Bakterienstammes erfolgte aus einer Einzelkolonie in 2ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37°C im Schüttler. 1,5ml der Flüssigzellkultur wurde pelletiert (3000xg, RT, 3min) und in 400µl Suspensionspuffer E1 resuspendiert. Nach Zugabe von 400µl Lysispuffer E2 wurde vorsichtig durchmischt und 5min bei RT inkubiert, danach wurden 400µl Neutralisationspuffer E3 zugegeben und zentrifugiert (10min, RT, 14.000Upm) (Die Lösungen E1-E3 stammen von der Firma GENOMED, Bad Oeynhausen). 900µl des Überstandes wurden in einem neuen Eppendorf Reaktionsgefäß mit 600µl Isopropanol gemischt und 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (15min, RT, 14.000Upm) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 700µl 70%igen Ethanol gewaschen, zentrifugiert (2min, RT, 14.000Upm), das Ethanol durch Absaugen entfernt und das Pellet im Vakuumkonzentrator getrocknet. Nach einigen Minuten wurde die DNA in 30µl H₂O aufgenommen.

3.1.2.2 Präparation von Plasmid-DNA aus 50ml-Kulturen (Midiprep)

Präparationen von 100-200µg Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien erfolgten mit dem Jet Star Plasmid Purification System (GENOMED, Bad Oeynhausen) nach Angaben des Herstellers. Das durch Zentrifugation aus 50ml LB/Amp-Übernachtskultur gewonnene Bakterienpellet wird dabei mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, wie bei Birnboim (Birnboim *et al.*, 1979) beschrieben.

3.1.2.3 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäure-haltige Lösungen wurden mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH5,5) versetzt und mit dem doppelten Volumen reinen Ethanol (96%ig) vermischt. Nach ≥2h bei -20°C oder ≥20min bei -70°C wurde für 30min bei 4°C und 12.000xg

zentrifugiert, das Pellet mit 500µl 70%igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen im Vakuumkonzentrator in sterilem, entionisiertem Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

3.1.3 Enzymatische Modifikationen von DNA

3.1.3.1 Restriktionsverdau von DNA

Es wurde die gewünschte Menge an DNA (2-4µg) mit der erforderlichen Menge an Restriktionsenzym (10-20 U) 1-2h unter der nach Herstellerangaben für das Enzym optimalen Bedingungen (Puffer, Temperatur, BSA-Zusatz) inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde entweder durch Hitzeinaktivierung (75°C, 10min) oder durch Zugabe von DNA-Probenpuffer mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung gestoppt. Bei gleichzeitigen Verdau mit mehreren Enzymen wurden die dafür angepassten Enzymmengen und Reaktionsbedingungen verwendet. War ein Parallelverdau aufgrund der empfohlenen Pufferbedingungen nicht möglich, wurde sequentiell verdaut. Der erste Verdau erfolgte mit dem Enzym, das den Restriktionspuffer mit der geringeren Salzkonzentration benötigt. Dabei wurde das Volumen des Restriktionsansatzes halbiert, um beim zweiten Verdau die Salzkonzentration für das zweite Enzym anpassen zu können.

3.1.3.2 Auffüllreaktion überhängender 5'-Enden

Zur Ligation nicht-kompatibler, überhängender 5'-Enden von DNA-Fragmenten wurden diese mit T4-DNA-Polymerase behandelt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung eines Restriktionsansatzes (Kapitel 3.1.5.1) mit anschließender Isolierung von Fragmenten aus dem Gel (Kapitel 3.1.6) wurde pro µg aufzufüllender DNA 1U T4-DNA-Polymerase eingesetzt. Die DNA wurde mit dNTPs (100µM) in T4-Polymerase-Puffer 20min bei 11°C inkubiert. Darauf folgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms (10min, 75°C). Die DNA wurde gegebenenfalls gelelektrophoretisch aufgereinigt (Kapitel 3.1.5.1 und Kapitel 3.1.6) oder direkt in die Ligationsreaktion (Kapitel 3.1.3.5) eingesetzt.

3.1.3.3 Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die zu phosphorylierende DNA, ein Restriktions- oder PCR-Fragment, wurde in T4-PNK-Puffer mit der erforderlichen Menge an T4-Polynukleotidkinase (1U pro 50pMol 5'-Enden, 30 min, 37°C) inkubiert und gegebenenfalls durch Gelelektrophorese gereinigt (Kapitel 3.1.5.1 und 3.1.6) oder direkt in die Ligationsreaktion (Kapitel 3.1.3.5) eingesetzt.

3.1.3.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die zu dephosphorylierende DNA wurde mit alkalischer Phosphatase (1U pro pmol 5'-Enden) in mitgelieferten Puffer 30min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend gelelektrophoretisch gereinigt (Kapitel 3.1.5.1 und 3.1.6).

3.1.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Es wurden 40ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA in einem Gesamtvolumen von 10µl in Ligationspuffer mit 1U T4-DNA-Ligase inkubiert. Ligationen mit glatten Enden (*blunt end*) oder Ligationen bei denen zwei Fragmente eingesetzt wurden, wurden ü.N. bei 17°C ligiert, für Ligationen von Fragmenten mit überhängenden Enden (*sticky end*) betrug die Inkubationsdauer 2h bei RT.

3.1.4 RNA-Herstellung durch in vitro-Transkription

Zur Injektion von *Xenopus laevis* Oozyten wurde plasmidkodierte cDNA in komplementäre cRNA umgeschrieben. Standardmäßig befanden sich die kodierenden Sequenzen in den Expressionsvektoren pTLN und pFROG, die zunächst mit MluI oder KpnI 3'wärts der Polyadenylierungssequenz linearisiert wurden. Nach einem anschließendem Proteinase K Verdau (1h, 50°C, 20µg Enzym) wurde die linearisierte DNA mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (BOEHRINGER, Mannheim) aufgereinigt und in 50µl H₂O/DEPC aufgenommen. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft und der restliche Ansatz im Volumenkonzentrator auf ca. 10µl eingengt. Die RNA-Synthese erfolgte mit dem *mMessage Machine Kit* (AMBION, Austin, Texas) unter Verwendung der

SP6- oder T7-Polymerase gemäß Anleitung. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, die Integrität der RNA mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.1.5 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

3.1.5.1 Gelelektrophorese von DNA

Die DNA/RNA-Elektrophoresen erfolgten in Flachbettgelapparaturen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer versetzt und in 0,6-2,2%igen Agarosengelen mit 1µg/l Ethidiumbromid in TAE-Puffer bei 5-15 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator bei 312nm durch einen UV-(Rot)-Filter photographiert. Zur Größenbestimmung diente die 1kB-Leiter von GIBCO BRL.

3.1.5.2 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese von RNA

Zur Kontrolle von *in vitro* transkribierter cRNA wurde diese mit 1/3 Vol. RNA-Auftragspuffer aus dem *mMessage Machine Kit* versetzt und in 1%igen Agarosegelen aufgetrennt, wie für DNA beschrieben. Aufgrund von variablen Sekundärstrukturen ergaben sich eine oder mehrere leicht diffuse Banden, wobei die RNA als nicht degradiert angesehen wurde, wenn die Banden sowohl zu größeren, als auch zu kleineren Fragmentlängen gleichermaßen verwischt waren.

3.1.6 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agaroseblöckchen nach Elektrophorese erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* von (QIAGEN, Hilden) oder dem *High Pure PCR Product Purification Kit*, (BOEHRINGER, Mannheim), jeweils nach den Angaben der Hersteller. Das Funktionsprinzip bei beiden ist die spezifische Bindung der DNA an eine Matrix aus Hydroxylapatit oder Quarz.

3.1.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Extinktionsmessung

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden photometrisch im UV-Absorptionsbereich von 230-350nm in einer Quarzküvette mit dem Photometer *GeneQuant* (PHARMACIA) bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration wurden folgende Relationen herangezogen (Schichtdicke der Lösung 1cm; die Extinktion bei 350nm wurde als Nullwert gesetzt);

■ Doppelstrang-DNA	$c = (E_{260\text{nm}} - E_{350\text{nm}}) \times 50\mu\text{g/ml}$
■ Einzelstrang-RNA	$c = (E_{260\text{nm}} - E_{350\text{nm}}) \times 40\mu\text{g/ml}$
■ Einzelstrang-DNA	$c = (E_{260\text{nm}} - E_{350\text{nm}}) \times 33\mu\text{g/ml}$
■ Oligonukleotide	$c = (E_{260\text{nm}} - E_{350\text{nm}}) \times 33\mu\text{g/ml}$

bzw. es wurde der gemäß der Basensequenz
erechnete Absorptionskoeffizient verwendet.

Zur Ermittlung der Reinheit wurde der Quotient aus $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ gebildet. Dieser Wert sollte größer als 1,8 was einem Nukleinsäuregehalt von mehr als 30% entspricht. Zur Quantifizierung kleiner Mengen wurde ein Aliquot mit einer DNA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentration auf ein Agarosegel aufgetragen und die Bandenintensität verglichen.

3.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.8.1 Standard PCR

Für alle PCR-Anwendungen außer der Einzelkolonie (s.u.) wurde die thermostabile Pfu-DNA-Polymerase (STRATAGENE, Heidelberg) aus *Pyrococcus furiosus* verwendet. Diese zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate dank einer 3' Exonukleaseaktivität bei niedriger Prozessivität aus („Proofreading“). Die Länge der Primer betrug in der Regel 24 Nukleotide, wenn nicht durch niedrige Schmelztemperatur der Zielsequenz eine größere Länge erforderlich war. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,5ml Eppendorfgefäßen im Trio-Thermoblock (BIOMETRA, Göttingen) mit beheiztem Deckel inkubiert oder in Reaktionsgefäßen, die benötigt

wurden, um die PCR-Reaktionen im Thermocycler (PERKIN ELMER APPLIED BIOSYSTEMS) zu inkubieren.

Alle PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Standardansatz mit 50µl Reaktionsvolumen angesetzt:

5µl 10x Pfu-Polymerasepuffer, STRATAGENE
 1µl Pfu-Polymerase, STRATAGENE
 2µl dNTP-Mix (2,5mM je Nukleotid), GIBCO BRL
 5µl Primer A (10µM)
 5µl Primer B (10µM)
 100ng Matrizen-DNA
 Ad 50µl H₂O

Das Temperaturprogramm verlief wie folgt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Schleife
1 Denaturierung	94°C	5min	
2 Denaturierung	94°C	1min	
3 Primerbindung	55°C	45sec	
4 Extension	72°C	60sec pro 1kB	24x zu Schritt 2
5 Extension	72°C	5min	
6 Aufbewahrung	4°C	beliebig	

Nach Ablauf der Reaktion wurden die Ansätze mit 1/10 Vol. DNA-Auftragspuffer versetzt und die Produkte über ein Agarosegel gereinigt (Kapitel 3.1.5.1).

3.1.8.2 PCR aus Einzelkolonien

Zur Selektion positiver Klone wurden einzelne Bakterienkolonien mit sterilen Zahnstochern von einer LB/Amp-Platte abgenommen und in 20µl H₂O bidest. suspendiert. Eine Hälfte der Bakteriensuspension wurde als Matrize in die PCR (Kapitel 3.1.8.1) eingesetzt, mit der anderen im Falle eines positiven Nachweises des gewünschten DNA-Fragments eine Flüssigkultur angeimpft.

Bei dieser PCR wurden je 2U DyNAzymeTM II DNA-Polymerase (FINNZYMES OY, Espoo, Finnland) pro Ansatz eingesetzt. Dieses Enzym ist kostengünstig, weil es

keine 3'-Exonukleaseaktivität („Proofreading“) besitzt. Die Zyklenzahl betrug 25, auf eine Verlängerung der letzten Extensionsphase wurde verzichtet.

3.1.8.3 Einführung von Punktmutanten durch zweifach rekombinante PCR

Der Austausch einzelner Aminosäuren in Proteinen wurde auf cDNA-Ebene durch entsprechende Veränderung der kodierenden Basentriplets erreicht. Hierfür wurde das Verfahren der rekombinanten PCR gewählt (Higuchi, 1990), das gegenüber anderen verbreiteten Methoden den Vorteil besitzt, daß nur relativ kurze Sequenzabschnitte durch PCR amplifiziert werden müssen. Die anschließend notwendige Kontrolle dieser Abschnitte durch Sequenzierung ist dadurch weniger aufwendig. Abbildung 7 verdeutlicht das Prinzip: In zwei getrennten Standard-PCR Ansätzen wurden der Sequenzabschnitt ober- bzw. unterhalb der Mutagenesestelle amplifiziert (Abb.3.1.A).

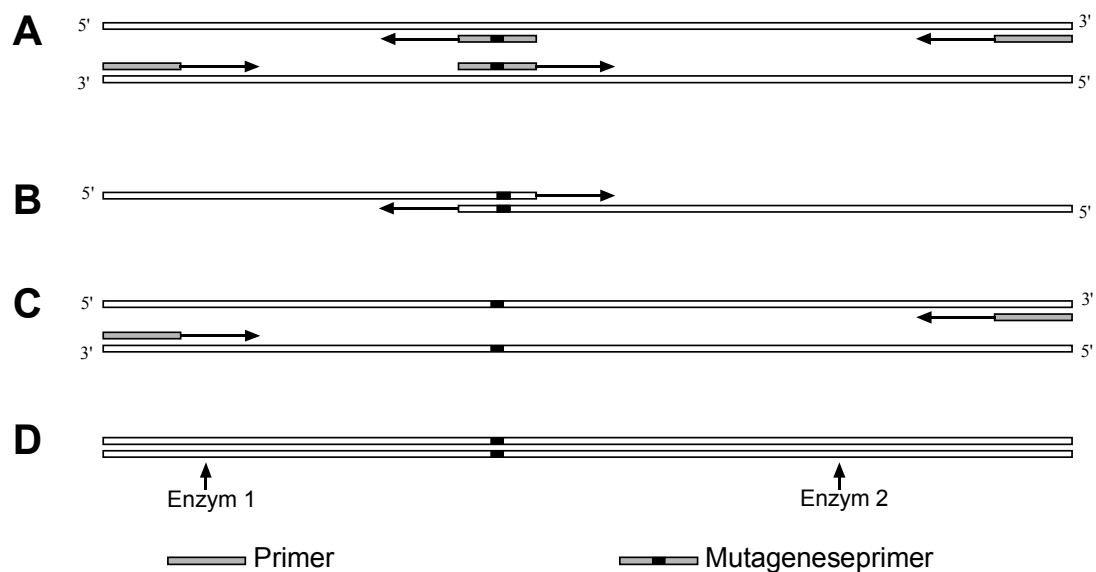


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Herstellung einer Punktmutante durch zweifach rekombinante PCR. (A) In zwei separaten Reaktionen werden überlappende Sequenzabschnitte mit jeweils einem genspezifischen und einem Mutageneseprimer amplifiziert. (B,C) In einer dritten PCR Reaktion binden die beiden Fragmente im überlappenden Bereich (B) und werden verlängert. So entstandene, rekombinierte Fragmente werden in derselben Reaktion durch spezifische Primer aus (A) vermehrt (C). (D) Nach der PCR wird das Fragment mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten, um es in ein Plasmid zu legieren.

Hierbei enthielt der eine Vorwärts- und der eine Rückwärtsprimer die Mutation als Basenfehlpaarung, wobei beiderseits der Mutation 12-18 „paarende“ Nukleotide für eine gute Primerbindung sorgen sollen. Gleichzeitig überlappten die Primersequenzen der Mutageneseprimer. Die entstandenen Reaktionsprodukte der 1. Standard-PCR wurden wie unter 3.1.5.1 und 3.1.6 beschrieben, isoliert. In einer neuen Reaktion wurden jeweils etwa 1/10 der Produkte aus der ersten Amplifikation zusammen mit den am weitesten 5` bzw. 3` greifenden Primern amplifiziert. Dabei wurden die Matrizenstränge infolge des Überlappens zunächst verlängert, wobei die Mutation auch im entstehenden Produkt auftrat (Abb.3.1.B). Anschließend wurden diese Stränge exponentiell amplifiziert, da sie die Zielsequenz beider Primer beinhalteten (Abb.3.1.C), wohingegen nicht rekombinierte Fragmente - mit nur einer Primerbindungsstelle - sich nur linear vermehren konnten. Nach Reinigung der Produkte im Agarosegel wurden diese, ebenso wie die Plasmide mit der Ausgangssequenz, mit denselben Restriktionsenzymen (Abb.3.1.D) geschnitten und wiederum mittels Agarosegel isoliert. Anschließend wurde das mutierte Fragment an die korrespondierende Position in der cDNA legiert. Der modulartige Austausch von Sequenzabschnitten setzt das Vorhandensein geeigneter singulärer Enzymschnittstellen voraus und macht es erforderlich die terminalen PCR-Primer jenseits dieser Restriktionsstellen zu plazieren. Nach Ligation, Transformation von Bakterien und Gewinnung der Plasmid-DNA wurden sämtliche durch PCR generierten Abschnitte durch Sequenzierung überprüft. Dies galt generell auch für alle weiter unten beschriebenen Konstrukte.

3.1.8.4 Erzeugung von Proteinfusionen und chimären Proteinen durch rekombinante PCR

Das Aneinanderfügen zweier beliebiger cDNA-Sequenzen wurde ebenfalls durch rekombinante PCR erreicht. Analog zu Kapitel 3.1.8.3 wurden in beiden Sequenzen jeweils die Bereiche amplifiziert, die die Fusionsstelle später flankieren sollten. Es wurden an der Fusionstelle über 18-24 Nukleotide überlappende Primer eingesetzt und das Standard PCR-Protokoll gemäß Kapitel 3.1.8.1 verwendet.

3.1.9 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen von DNA wurden nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Hierbei wird die DNA ausgehend von einem Primer durch eine DNA-Polymerase repliziert. Durch Verwendung von 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphaten (ddNTP) im Gemisch mit 2'dNTP kommt es an statistisch verteilten Positionen in der Sequenz zum Kettenabbruch, da die zur Verlängerung notwendige 3'-OH-Gruppe fehlt. Die Abbruchprodukte können in einem hochauflösenden denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel analysiert werden. Als Sequenzprimer wurden diverse Plasmid- und cDNA-spezifische Primer mit einer Länge von mindestens 18 Nukleotiden verwendet, darunter auch Mutageneseprimer. Die Sequenzierungen wurden von der Servicegruppe des ZMNH (Dr. W. Kullmann) durchgeführt. Hierbei wurde das Thermozyklus-Verfahren unter Einsatz von thermostabiler DNA-Polymerase Amplitaq™ und Fluoreszenzfarbstoff-markierten Terminatoren angewandt. Ausgewertet wurden die Proben auf einem ABI PRISM™ Modell 377 (alles PERKIN ELMER APPLIED BIOSYSTEMS).

3.1.10 Northern-Blot Analyse

3.1.10.1 Herstellung von DEPC-behandelten Wasser

RNA ist besonders anfällig gegenüber Degradation. Deswegen wurden alle verwendeten Lösungen mit deionisiertem Wasser angesetzt, das zuvor mit DEPC (SIGMA) behandelt wurde.

Dazu wurde 1ml DEPC zu einem Liter H₂O gegeben. Nachdem die Lösung geschüttelt wurde, wurde sie ü.N. bei 37°C inkubiert. Das verbliebene DEPC wurde durch Autoklavieren entfernt. Alle benötigten Gegenstände wurden entweder mit 0,1M NaOH behandelt oder bei 200°C ausgebacken.

3.1.10.2 Extraktion von RNA aus Geweben und Zellkulturzellen

Zur Extraktion von RNA aus Geweben und Zellkulturzellen wurde das TRIZOL® Reagenz (GIBCO BRL) gemäß Herstellerangaben verwendet.

Um die Messenger-RNA von ribosomaler und Transfer-RNA zu trennen, wurden Dynabeads® Oligo(dT)25 (DYNAL) nach Herstellerangaben verwendet. Dabei macht

man sich zu Nutze, daß die 3'-Poly-Adeninsequenz der mRNA komplementäre Basenpaarungen zu Oligo-dT-Nukleotiden (25mere) ausbildet, die an paramagnetische Polystyrolkugeln ($\varnothing=2,8\mu\text{m}$) gekoppelt sind, wodurch eine Abtrennung von den anderen Ribonukleinsäurespezies möglich ist.

3.1.10.3 Denaturierende Agarosegelelektrophorese und Kapillarblotten von RNA

Zur Kontrolle von RNA-Präparationen oder zum Blotten der RNA auf Nylonmembran wurden 5-20 μg Gesamt-RNA oder PolyA⁺-RNA in 11 μl H₂O/DEPC mit 5 μl 10x MOPS-Puffer, 9 μl 12,3M Formaldehyd, 25 μl Formamid versetzt und 15min bei 55°C erhitzt, anschließend wurde auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 10 μl RNA-Auftragspuffer wurde die RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt.

Herstellung des Gels: 1g Agarose wurden in 72ml H₂O/DEPC durch Kochen gelöst und auf 60°C im Wasserbad abgekühlt. Anschließend wurden 10ml 10x MOPS-Puffer und 18ml 12,3M Formaldehyd zugesetzt und dann das Gel gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x MOPS-Puffer bei 5V/cm über 3h. Anschließend wurde das Gel in 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid, 0,5M NH₄Acetat gefärbt und in 0,5M NH₄Acetat entfärbt. Wenn das Gel zum Kapillarblotten weiter verwendet werden sollte, wurde nur der Teil des Geles, der den RNA-Größenstandard enthielt, ge- und entfärbt.

Der andere Teil des Geles, der die aufgetrennten RNA-Proben enthielt, wurde 1-2min in H₂O inkubiert und für 20min in 20x SSC Puffer äquilibriert. Der Kapillarblot erfolgte ü.N. mit 20x SSC Puffer als Transferpuffer auf eine Nylonmembran. Die Nylonmembran wurde in 2x SSC Puffer gewaschen, getrocknet und die RNA durch UV-Licht auf der Membran immobilisiert.

3.1.10.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden nach der Feinberg-Vogelstein-Technik (*Random-primed Oligolabelling*) unter Verwendung von α -(³²P)-dCTP radioaktiv markiert. Hierzu wurde das *Rediprime Kit* (AMERSHAM) nach Herstellerangaben eingesetzt. Über eine *Sephadex G50-Säule* (BOEHRINGER) wurden die nicht eingebauten Nukleotide abgetrennt.

3.1.10.5 Hybridisierung von DNA-Sonden

Zum Nachweis spezifischer RNA-Moleküle wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Die Membran wurde zunächst zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen 30min bei 68°C in der Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Nach Zugabe der denaturierten Sonde wurde bei 68°C über Nacht inkubiert. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch mehrfaches Waschen mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur und anschließendes Waschen mit Waschlösung 2 bei 50°C entfernt. Die Membranen wurden 2h bis 5 Tage auf Röntgenfilmen oder Phosphoimager-Platten (FUJI Imaging Plate) gelegt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Membranpräparation von *Xenopus laevis* Oozyten

Gemäß Kapitel 3.3.2.2 injizierte Oozyten wurden nach 2-3 Tagen Inkubation bei 17°C dreimal in Barths Lösung gewaschen. Dann wurden sie in Oozytenlysispuffer (10µl/Oozyte) durch Auf- und Abpipettieren mit einer 200µl Pipette homogenisiert. Anschließend wurden Dotter und Zelltrümmer durch mehrmaliges Zentrifugieren (3-fünffmal 3min bei 800xg) abgetrennt. Der Überstand wurde in einer TL-1000-Zentrifuge im TLA-100.2-Rotor (BECKMANN) für 30min bei 4°C und 50.000 Upm (100.000xg) zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Membranpellets in 1x SDS-Probenpuffer (ohne Bromphenolblau) solubilisiert und eine bestimmte Proteinmenge (Kapitel 3.2.3) oder das entsprechende Volumenäquivalent einer Oozyte auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.2.2 Herstellung von Homogenaten aus Zellkulturzellen

Zellen einer konfluent gewachsenen 6 oder 10cm Zellkulturschale wurden dreimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und sedimentiert (Kapitel 3.3.1.2). Das Pellet wurde in 100-500µl 1x SDS-Probenpuffer (ohne Bromphenolblau) aufgenommen. Freigesetzte, hochmolekulare DNA wurde durch Ultraschallbehandlung (DR. HIELSCHER UP200S, 10x 1s mit 30% Amplitude) geschert. Die Proteinkonzentration des Homogenats wurde bestimmt und die Probe auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.2.3 Proteinbestimmung

Die Konzentration an Gesamtprotein einer Lösung wurde mit dem *BCA Protein Assay Kit* (PIERCE) bestimmt. Als Standard wurde eine Lösung von BSA im jeweils verwendeten Puffer eingesetzt.

3.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) gemäß ihrer Molmasse aufgetrennt. Hierzu wurden die Proteinlösungen mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5-10min auf 55°C erwärmt (wegen der Neigung hydrophober Membranproteine beim Kochen zu aggregieren, wurden Proteine, die Transmembrandomänen enthielten, nicht auf 95°C erhitzt). Anschließend erfolgte die Elektrophorese je nach Proteingröße auf 5-12,5%igen Gelen in Minigelkammern (HOEFER SCIENTIFIC) bei 30mV pro Gel. Als Molekulargewichtsmarker dienten gefärbte Proteinstandards (z.B., „Benchmark“ von GIBCO BRL). Gele für Western-Blot Analysen wurden, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben, weiterbehandelt.

3.2.5 Western-Blot Analyse

Nach der Elektrophorese wurden die Gele kurz in Transferpuffer äquilibriert und dann unter Transferpuffer blasenfrei auf eine Nitrozellulosemembran (Protran 0,45µM Porengröße, SCHLEICHER & SCHUELL) gelegt. Beiderseits wurden zwei Lagen Filterpapier (SCHLEICHER & SCHUELL) hinzugefügt. Der Transfer wurde in einer Tankblot-Kammer (HOEFER SCIENTIFIC) mit Transferpuffer bei 80Volt (ca. 5V/cm) über 2h oder bei 15V über 15h jeweils bei 4°C durchgeführt.

Für die Immundetektion von transferiertem Protein wurde die Membran danach zunächst 30min bei 37°C in Western-Blockpuffer eingelegt, um die direkte Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde mit dem jeweiligen Antiserum in Blocklösung bei Raumtemperatur für 2h inkubiert. Die Membran wurde schließlich dreimal mit Western-Waschpuffer gewaschen, erneut in Blockpuffer inkubiert (30min, 37°C) und für 1h mit Meerrettichperoxidasegekoppelten Protein A (1:4000 Verdünnung) in Western-Blockpuffer inkubiert.

Diese Membran wurde durch viermaliges Waschen mit Western-Waschpuffer und zweimaliges Eintauchen in entionisiertem Wasser auf die Chemilumineszenz-Detektion vorbereitet. Diese Detektion erfolgte mit dem *RenaissanceTMKit* (DU PONT) nach den Angaben des Herstellers durch 1min Immersion in der Reaktionslösung, die Luminol als Substrat für die Meerettichperoxidase enthielt. Danach wurde die abgetropfte Membran in Haushaltsfolie eingeschlagen auf einen Röntgenfilm gelegt (10s bis 5h). Die Entwicklung wurde in dem automatischen Röntgenfilmentwickler Curix 60 (AGFA) vorgenommen.

3.2.6 Immunpräzipitation von Proteinen

Das Zellysat (Kapitel 3.3.1.8) wurde zunächst (20min, 4°C, 14.000Upm) zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde zu dem Zellextrakt 5µl Antikörper gegeben und 2h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden 200µl Protein-A Sepharose (PHARMACIA) zugegeben und eine weitere Stunde im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Diesen Inkubationen schloß sich eine Zentrifugation an (30sec, 4°C, 14.000Upm), nach der der Überstand abgenommen wurde und die Protein-A Sepharose mit Schwyzer-Waschpuffer fünfmal gewaschen wurde (500µl, 30sec, 4°C, 14.000Upm). Diesen Waschsritten folgten zwei weitere mit PBS und einer mit 0,1x PBS (500µl, 30sec, 4°C, 14.000Upm). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand sehr sorgfältig abgenommen, 400µl Elutionspuffer zu dem Präzipitat gegeben und bei 37°C im Eppendorfschüttler ½-1h inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (30sec, RT, 14.000Upm) wurde der Überstand abgenommen und im Volumenkonzentrator ü.N. lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 1/10 des Elutionsvolumens (40µl) in Immunpräzipitationslaufpuffer (10% Glycerin; Bromphenolblau; 5% β-Mercaptoethanol) aufgenommen und 5-10min bei 55°C inkubiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Gewebezellkultur

3.3.1.1 Kultivierung von Zellkulturzellen

Die Zellen wurden in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37°C gehalten (HERAEUS-Inkubator). Medien und Lösungen wurden vor Benutzung auf 37°C erwärmt.

Es wurden folgende Medien verwendet:

COS-7: DMEM + 10% FBS + 100U/ml Penicillin + 100 µg/ml
 Streptomycin

CHO K1: HAM F12 + 10% FBS + 100U/ml Penicillin + 100 µg/ml
 Streptomycin

Medien für stabil transfizierte Zellen enthielten zusätzlich 1mg/ml Geneticin (GIBCO BRL) bzw. 0,5 mg/ml Hygromycin B (BOEHRINGER, Mannheim).

3.3.1.2 Trypsinieren von Zellkulturzellen

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen für ca. 5min mit Trypsin/EDTA (GIBCO BRL) bei 37°C inkubiert (mikroskopische Kontrolle). Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigen Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen mit der Pipette vereinzelt und in der gewünschten Verdünnung ausgesät.

3.3.1.3 Einfrieren von Zellkulturzellen

Die Zellen wurden trypsinisiert, in Medium aufgenommen und die Suspension in der HERAEUS Labofuge sedimentiert (3min, 200xg). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1ml Einfriermedium aufgenommen und in Einfriereröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst in einer Styroporbox bei -80°C ü.N. eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.1.4 Revitalisierung von Zellkulturzellen

Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde entnommen, in 5ml vorgewärmtes Medium überführt und in der Labofuge sedimentiert (3min, 200xg). Das Medium wurde abgesaugt, das Zellpellet in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt.

3.3.1.5 Transiente Transfektion von Zellkulturzellen

Eukaryontische Zellen wurden mit Hilfe von *Lipofectamine* (GIBCO BRL) transfiziert, hierzu lagen die zu transfizierenden cDNA Konstrukte in den Expressionsvektoren pCI-neo, pCDNA3 oder pFROG vor (Kapitel 2.5).

Für die Transfektion wurden parallel Mischungen aus 200µl (300µl) Opti-MEM-Medium (GIBCO BRL) mit 1µg (1,5µg) cDNA und 200µl (300µl) Opti-MEM-Medium mit 10µl (15µl) *Lipofectamine*-Reagenz angesetzt. Die Lösungen wurden vorsichtig miteinander vermischt und 30min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde eine zu 50-80% konfluente 6cm (10cm) Zellkulturschale mit 2ml (3ml) Opti-MEM-Medium gespült und dann mit 1ml (2,5ml) Opti-MEM-Medium bedeckt. Die *Lipofectamine*-Mischung wurde hinzugegeben, die Zellen dann 4-5h oder ü.N. unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz gegen komplettes Medium ausgetauscht und die Zellen wurden zur maximalen Proteinexpression weitere 2 Tage inkubiert.

3.3.1.6 Stabile Transfektion und Selektion der stabil transfizierten Zellklone

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zellen wurde entweder ein cDNA Konstrukt in dem Vektor pCI-neo verwendet, oder eine Kotransfektion zwischen dem zu transfizierenden Plasmid und dem Selektionsplasmid PGK-Hyg (Kapitel 2.5) durchgeführt. Der Vektor pCI-neo enthält das Neomycin-Phosphotransferase-Gen, der Vektor PGK-Hyg das Hygromycin B-Phosphotransferase-Gen. Beide Gene können als Selektionsmarker für Säugetierzellen verwendet werden und erlauben somit die Selektion stabil transfizierter Zellen mit dem Antibiotikum Neomycin (Geneticin) bzw. Hygromycin B. Zellen wurden wie unter Kapitel 3.3.1.5 beschrieben transfiziert, mit der Änderung, daß eine ca. 1% konfluente 10cm Schale

verwendet wurde. Zwei Tage nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Hierzu wurde dem Medium am ersten Tag der Selektion 200µg/ml Geneticin (GIBCO BRL) bzw. 50µg/ml Hygromycin B (BOEHRINGER) zugesetzt, bis schrittweise wachsend eine Konzentration von 1 bzw. 0,5mg/ml erreicht war. Nach ca. zwei Wochen waren resistente Zellkolonien sichtbar, die mit Hilfe einer 200µl Medium umfassenden Pipettenspitze vorsichtig aufgenommen und in eine 24-Napf-Gewebekulturschale überführt wurden. Etwa vier Wochen nach der Transfektion (eventuell nach weiteren Passageschritten) konnten die ersten Einzelklone auf die Expression der transfizierten cDNA getestet werden. Die Expressionskontrolle erfolgte standardmäßig mittels *Western-Blot* Analyse (Kapitel 3.2.4 und 3.2.5) und indirekter Immunfluoreszenz (Kapitel 3.3.1.7).

3.3.1.7 Indirekte Immunfluoreszenz an Zellkulturzellen

Zellen wurden auf Aminoalkylsilan beschichtete Objektträger oder auf Deckgläschen ($\varnothing=12\text{mm}$) ausgesät. Nach 12-48h (je nach Zelllinie und/ oder transfizierter cDNA) wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 15min mit 4% Paraformaldehyd in PBS bei RT fixiert, einmal auf Eis mit eiskaltem Methanol (gelagert bei -20°C) und dreimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu permeabilisieren und zur Verringerung der Hintergrundfärbung wurden sie für 30min bei RT mit Blocklösung inkubiert. Danach wurde die Inkubation mit den Primärantikörpern (verdünnt in PBS) über Nacht bei 4°C oder für 2h bei RT durchgeführt. Nach dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (verdünnt in PBS) für 2h bei RT im Dunkeln inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch erneutes Waschen (dreimal mit PBS) entfernt und die Präparate dann mit erwärmter (50°C) Glycerol-Gelatine (SIGMA) eingedeckelt. Doppelmarkierungen erfolgten durch simultane indirekte Immunfluoreszenz. Da die Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies stammen, konnten durch geeignete Kombinationen und entsprechende Wahl der Sekundärantikörper diese zugleich dargestellt werden.

3.3.1.8 Metabolische Markierung von Zellkulturzellen mit ^{35}S -Methionin

Die metabolische Markierung von Zellkulturzellen erfolgte in Zellkulturschalen ($\varnothing=10\text{cm}$), die subkonfluent (ca. 80%) mit Zellen (COS-7 oder CHO K1) bewachsen

waren. Nachdem das Medium von den Zellen abgesaugt worden war, wurden die Zellen zweimal mit 3ml PBS gewaschen und 30-60min mit Methionin-freiem Medium ausgehungert. Das Medium wurde abgesaugt und durch Medium (3ml) ersetzt, welches 100 μ Ci/ml 35 S-Methionin (NEN DUPONT) enthielt. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen im Inkubator (HERAEUS) 30-60min inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit Vollmedium überschichtet und für verschiedene Zeiten unter Standardbedingungen im Inkubator (HERAEUS) inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen auf Eis zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde auf jede 10cm Zellkulturschale 800 μ l Immunpräzipitations-Lysispuffer gegeben und für 20min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber (NUNC) abgeschabt, in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und weitere 30min auf Eis inkubiert. Das Zellysate wurde zur Immunpräzipitation weiter verwendet (Kapitel 3.2.6).

3.3.2 Kultivierung von *Xenopus laevis* Oozyten

3.3.2.1 Präparation von *Xenopus laevis* Oozyten

Weibliche Krallenfrösche der Spezies *Xenopus laevis* wurden durch Einlegen für 15min in 0,17%ige Tricainlösung (SIGMA) anästhesiert und Teile des Ovars operativ entnommen, das während der weiteren Versorgung des Frosches in Ca²⁺-freier OR2-Lösung gelagert wurde. Zur Entfernung der folliculären Zellen wurden die Oozyten mit Collagenase A (3mg/ml, SIGMA) in Ca²⁺-freier OR2-Lösung inkubiert (Horizontalschüttler Stufe 1, 17°C, 2-3h). Nach mehrmaligen Waschen in Ca²⁺-freier OR2-Lösung wurden die Oozyten in Barths Lösung überführt, selektioniert (Stadium V, \varnothing 0,6-1mm und Stadium VI, \varnothing 1-1,2mm) und mehrere Stunden (oder ü.N.) bis zur Injektion der cRNA inkubiert.

3.3.2.2 Mikroinjektion von cRNA

Injektionspipetten wurden aus Glaskapillaren (DRUMMOND) mit einem Horizontal-Pipettenziehgerät (SUTTER) hergestellt. Diese wurden mit Silikonöl DC 200 (SIGMA) gefüllt und in eine Nanoliterpipette (DRUMMOND) eingespannt. Von der

hergestellten cRNA-Lösung (Kapitel 3.1.4) wurde 1-3µl aufgenommen und jeweils 50nl (etwa 10ng Gesamt-RNA) pro Oozyte injiziert. Nach der Injektion wurden die Oozyten zwei bis drei Tage bei 17°C in Barth's Lösung gehalten.

3.3.3 Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression von extrazellulär mit einem HA-Epitop markierten Ionenkanälen wurden für jedes zu untersuchende Konstrukt 5-12 Oozyten eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Oozyten, die Ionenkanäle exprimierten, welche nicht mit einem HA-Epitop markiert waren. Die Oozyten wurden zunächst in Blocklösung (ND 96 mit 1% BSA) eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert. Währenddessen wurde die *SuperSignalTM ELISA Femto* Lösung (PIERCE) nach Herstellerangaben angesetzt (50µl pro Oozyte, 1:1 Reagenz A: Reagenz B). Die Oozyten wurden in die Lösung (ND 96 mit 1% BSA) transferiert, die den Antikörper (Verdünnung 1:200) gegen das HA-Epitop enthielt (3F10, BOEHRINGER, Mannheim) und 1h bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Oozyten 3x mit Waschlösung für insgesamt 30min bei 4°C gewaschen und für 1h in die Lösung mit dem Zweitantikörper (Ziege-Anti Ratte (F(ab)2), JACKSON) überführt (Verdünnung 1:500 in ND 96 mit 1% BSA; 4°C). Dieser Inkubation folgten mindestens sechs Waschschrte, die insgesamt wenigstens 40min dauerten und alle bei 4°C durchgeführt wurden. Die letzten drei Waschschrte erfolgten mit ND96 ohne BSA, da dieses sorgfältig entfernt werden muß, um das Hintergrundsignal zu minimieren. Jede Oozyte wurde dann in 50µl ELISA-Lösung transferiert und die relativen Lichteinheiten in einem Luminometer des Typs TD-20/20 (TURNER, Sunnyvale, USA) gemessen.

3.4 Elektrophysiologische Methoden

3.4.1 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme

Der Stromfluß durch die Kanäle in der Oozytenmembran in Abhängigkeit vom Membranpotential kann durch das Verfahren der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen werden. Diese Technik geht auf Arbeiten von Cole und Curtis (Cole, 1979) zurück und wurde in der vorliegenden Arbeit modifiziert nach Stühmer

(Stühmer *et al.*, 1992) durchgeführt. Wie in Abb.3.2 schematisch gezeigt, werden zwei fein ausgezogene Meßelectroden aus Glas in die Oozyte eingestochen.

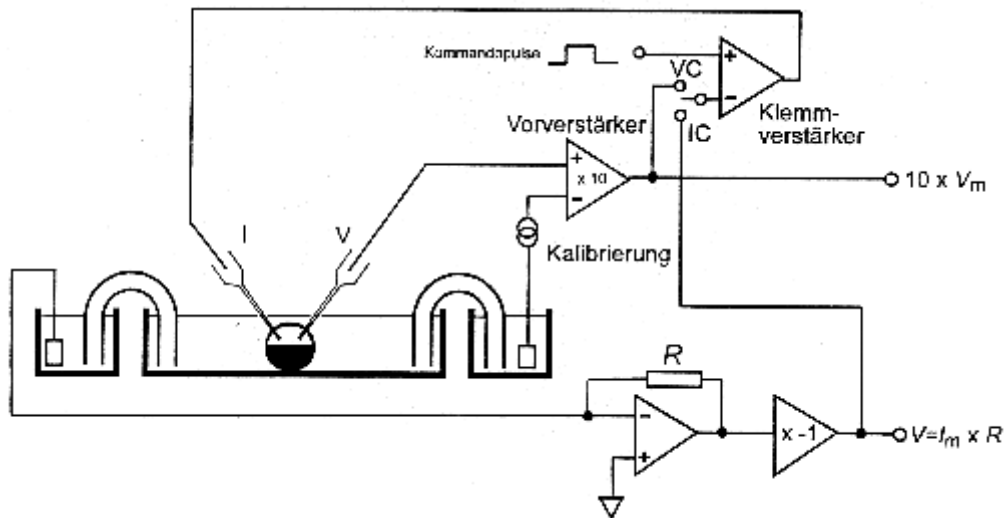


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung eines Zwei-Elektroden-Spannungsklemmsystems (modifiziert nach Aidley and Stanfield (Aidley *et al.*, 1996)). Die Strom- (I) und die Spannungselektrode (V) sind in eine *Xenopus* Oozyte eingestochen, die sich in der Meßlösung befindet. Gemessen wird das Membranpotential V_m der Zelle, und der Stromfluß I_m , der zur Aufrechterhaltung von V_m nötig ist, wenn beim Anlegen von Kommandopulsen eine Änderung der Membranleitfähigkeit, z.B. durch Öffnen von Ionenkanälen, auftritt. Der induzierte Strom I_m ist daher der Gesamtstrom durch alle zu einem bestimmten Zeitpunkt geöffneten Ionenkanäle zuzüglich dem Betrag anderer elektrogener Transportprozesse.

Mit der Spannungselektrode mißt man die aktuelle Potentialdifferenz zwischen dem Oozyteninnerem und der Badlösung, letztere hat definitionsgemäß ein Potential von null Volt. Über die Stromelektrode kann Ladung in die Oozyte injiziert werden, so daß der Oozyte ein vom Ruhezustand abweichendes Membranpotential aufgezwungen werden kann. Ein Rückkopplungsverstärker vergleicht ständig das „Ist-Potential“ (V) mit dem vom Experimentator vorgegebenen „Soll-Potential“ (Kommandopuls) und korrigiert entsprechend über die Stromelektrode (I). Zu einem gegebenen Zeitpunkt entspricht der gemessene Strom dann dem Gesamtfluß an geladenen Teilchen durch alle Ionenkanäle und etwaige andere elektrogene Transportprozesse oder Lecks in der Oozytenmembran. Bei starker Expression eines bestimmten Kanalproteins und Wahl geeigneter Versuchsbedingungen ist der Strom durch den zu untersuchenden Ionenkanal dominiert. Eine Computersteuerung läßt es zu, bestimmte Abfolgen von „Soll-Potentialen“ einzustellen, was im folgenden als

Pulsprotokoll bezeichnet wird (Vergleiche dazu Pulsprotokolle im Ergebnisteil (Kapitel 4.1.3 und 4.2.1)).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Elektroden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit Filament (Typ GC-150TF, $\varnothing = 1\text{mm}$, CLARK ELEKTROMEDICAL INSTRUMENTS) mit einem Vertikal-Elektrodenziehgerät (LIST MEDICAL INSTRUMENTS) hergestellt und mit 3M KCl gefüllt, in den ein mit FeCl_3 chlorierter Silberdraht tauchte. Der Pipettenwiderstand betrug 0,3-1M Ω . Die Badlösung wurde über 3M KCl-gefüllte Agarbrücken mit den Badelektroden in 1M NaCl verbunden. Die Ströme wurden über einen Verstärker Turbotec 10C (NPI-INSTRUMENTS) und einen Signalwandler (SCIENTIFIC SOLUTION oder AXON INSTRUMENTS) an einen IBM-kompatiblen Pentium-PC geleitet. Die Pulsprotokolle wurden mit der Software pCLAMP5.5 (AXON INSTRUMENTS) gesteuert. Die Meßelektroden wurden unter optischer Kontrolle durch ein Binokularmikroskop (ZEISS) mittels Mikromanipulatoren (MÄRZHÄUSER) bewegt. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Charakterisierung von Mutanten wurde an mindestens drei unabhängigen Oozyten- und cRNA-Präparationen durchgeführt. Bei nichtfunktionellen Konstrukten wurde die Expression des Proteins mittels Western-Blot Analyse (Kapitel 3.2.4 und 3.2.5) überprüft.

3.4.2 Einzelkanalaufnahmen an *Xenopus* Oozyten mittels der Patch-clamp Methode

Für *Patch-clamp* Experimente an Oozyten wurden devitellinisierte Oozyten benutzt. Die Vitellinmembran wurde direkt vor dem Experiment manuell nach kurzer Inkubation in hypertonem Medium entfernt (Methfessel *et al.*, 1986). Da die *Patch-clamp* Experimente in Kooperation mit Michael Pusch (Genua) durchgeführt wurden, soll an dieser Stelle lediglich auf die Publikation hingewiesen werden, in der die Methode beschrieben ist (Methfessel *et al.*, 1986; Schwake *et al.*, 2000).

3.4.3 Nicht-stationäre Rauschanalyse

Die nicht-stationäre Rauschanalyse wurde ebenfalls von Michael Pusch (Genua) durchgeführt. Diese Methode zur Abschätzung von Einzelkanalleitfähigkeiten und der Offenwahrscheinlichkeit wurde ausführlich von Heinemann und Conti

beschrieben (Heinemann *et al.*, 1992). An dieser Stelle soll die Methode nur kurz skizziert werden, soweit es zum Verständnis der vorgestellten Daten erforderlich ist. Das Prinzip der nicht-stationären Rauschanalyse stellt sich wie folgt dar: Für N Ionenkanäle, die alle gleich und unabhängig voneinander sind, und nur ein Leitfähigkeitsniveau besitzen, gilt folgende fundamentale Relation:

$$I = N \cdot i \cdot p \quad (1)$$

(I: mittlerer makroskopischer Strom, N: Anzahl der Kanäle, i: Einzelkanalstrom und p: Offenwahrscheinlichkeit). Wenn nun ein Spannungssprung von +60mV auf –100mV vorgenommen wird, ändert sich sofort die Amplitude des Einzelkanalstroms (i) auf den Wert bei –100mV. Die Offenwahrscheinlichkeit (p) ändert sich in der Regel relativ langsam, vom initialen Wert (bei +60mV) auf den Endwert (bei –100mV). Im Fall von Kaliumkanälen ist die Offenwahrscheinlichkeit bei –100mV null und bei +60mV maximal (p_{\max}), da bei dieser Spannung die Kanäle maximal aktiviert sind. Für den zeitabhängigen Strom bei –100mV gilt:

$$I(t) = N \cdot i \cdot p(t) \quad (2)$$

d.h. nur p hängt von der Zeit ab.

Zu jedem Zeitpunkt während der Deaktivierung gilt folgende Formel:

$$\sigma^2 = N \cdot i^2 \cdot p \cdot (1-p) \quad (3)$$

(σ^2 : Varianz, bzw. „Kanalrauschen“; $p = 0$, bedeutet alle Kanäle sind geschlossen und $p = 1$ alle Kanäle sind offen. Die maximale Rauschamplitude wird bei $p = 0,5$ erhalten, da die Parabel (Formel 3) dort ihr Maximum hat). Die Varianz kann durch wiederholte gleichartige Pulse von +60 auf –100mV aus dem Strom errechnet werden, der zum Zeitpunkt t gemessen wird (I(t)). Die Genauigkeit der Berechnung der Varianz kann durch die Anzahl der durchgeführten gleichartigen Spannungsprotokolle erhöht werden. Die Varianz um den Mittelwert des Stroms (I(t)) entspricht der Varianz (σ^2). Aus Gleichungen (2) und (3) folgt:

$$\sigma^2 = i \cdot I \cdot (1-p) \quad (4)$$

und mit Gleichung (2): $\sigma^2 = i \cdot I - I^2 / N \quad (5).$

Wird nun die Varianz (σ^2) gegen den mittleren Strom (I) aufgetragen (Kapitel 4.1.1) ergibt sich eine parabelförmige Kurve, die durch 0 geht. Diese Daten (Kapitel 4.1.1) werden als letzter Schritt an die Gleichung (5) angepaßt, wobei N sich aus der Krümmung der Parabel ergibt und i aus der Anfangssteigung. Die maximale Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle kann mit Gleichung (1) errechnet werden.

3.4.4 Bestimmung von Halbwertszeiten mittels Brefeldin A

Zur Bestimmung von Halbwertszeiten von Ionenkanälen wurden Oozyten, die die zu untersuchenden Kanäle exprimierten, nach Kapitel 3.4.1 mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme gemessen. Die Oozyten wurden dann in eine Barths Lösung überführt, die 10µg/ml Brefeldin A (SIGMA) enthielt. Nach 2, 4, 6, 8 und 22h wurden jeweils einige Oozyten entnommen und der verbliebene Strom gemessen.

3.5 Computergestützte Sequenzanalysen

Computergestützte Analysen von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit Hilfe des Lasergene-Programmpakets (DNASTAR) durchgeführt. Datenbankrecherchen erfolgten am Medline-, BLASTN- und BLASTP-Server des NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov).

