

3 Material und Methoden

3.1 Algorithmen und Programme für die Vorhersage von Signalpeptidsequenzen, Transmembrandomänen und Glykosylierungsstellen

Mit einer computergestützten Software kann die Aminosäuresequenz eines Proteins nach bestimmten, strukturellen Motiven durchgemustert werden. Die Aminosäuresequenzen der Proteine mCLCA3 und eCLCA1 wurden nach einer Signalpeptidsequenz mit Hilfe des Programms SignalP 3.0, nach potentiellen Transmembrandomänen mit Hilfe verschiedener Algorithmen (Kyte-Doolittle, SOSUI, HMMTop, TMpred, DAS, Psort II) und nach Asparagin-verknüpften Glykosylierungsstellen mit Hilfe des Programms NetNGlyc 1.0 durchsucht. Die Programme werden mit Namen, Web-Adresse und Referenz im Folgenden aufgelistet.

Name	Web-Adresse	Referenz
SignalP 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	(Bendtsen et al. 2004)
Kyte-Doolittle	http://occawlonline.pearsoned.com/bookbind/pubbooks/bc_mcampbell_genomics_1/medialib/activities/kd/kyte-doolittle.htm	(Kyte und Doolittle 1982)
SOSUI	http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui_submit.html	(Hirokawa et al. 1998)
HMMTop	http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html	(Tusnady und Simon 2001)
TMpred	http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html	(Hofman und Stoffel 1993)
DAS	http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/maindas.html	(Cserzo et al. 1997)
Psort II	http://psort.nibb.ac.jp/	(Nakai und Horton 1999)
NetNGlyc 1.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/	

Tabelle 1: Computerprogramme für die strukturelle Analyse der Proteine mCLCA3 und eCLCA1

3.2 Eingesetzte Plasmide

Für Expressionsstudien wurden Säugetierzellen mit verschiedenen Plasmiden transient transfiziert (siehe 3.5). Hierzu wurden die offenen Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF) von mCLCA3 und eCLCA1 in den Vektor pcDNA3.1 kloniert (Leverkoehne und Gruber 2002; Anton et al. 2005) oder der Vektor pcDNA3.1 alleine (Fa. Invitrogen life technologies, Carlsbad) benutzt. Für die Ko-Lokalisationsstudien wurden die Vektoren pDsRed-SI (Institut für Physiologische Chemie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Arbeitsgruppe Naim), pDsRed2-ER und GT-dsRed modifiziert nach Alfalah et al. 2006, von der Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg, verwendet. Wie in der Literaturübersicht (siehe Kapitel 2.9) erläutert, ist die posttranslationale Spaltung des Vorläuferproteins in eine amino-terminale und eine carboxy-terminale Untereinheit eine

charakteristische Eigenschaft der CLCA-Proteine. Bislang konnten nur Antikörper gegen amino-terminale Epitope sowohl bei mCLCA3 (Leverkoehne und Gruber 2002) als auch bei eCLCA1 (Anton et al. 2005) erfolgreich hergestellt werden. Zur Darstellung der carboxy-terminalen Untereinheit wurde für diese Studie deshalb das mCLCA3-Protein am carboxy-terminalen Ende mit einem fluoreszierenden Protein (engl. *yellow fluorescent protein*, YFP) markiert. Hierzu erfolgte die Klonierung des ORF von mCLCA3 in den Vektor pEYFP-N1 von Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg, so dass die YFP-Markierung in Fortführung des ORF von mCLCA3 am carboxy-terminalen Ende des gesamten mCLCA3-Proteins lokalisiert war.

3.3 Klonierung des Offenen Leserrahmens von mCLCA3 in den Vektor pEYFP-N1

Für die Klonierung des ORF von mCLCA3 in den Vektor pEYFP-N1 wurden zunächst passende Primer mit entsprechenden „Linkern“ entworfen. Die „Linker“ enthielten die Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *HindIII*, um den ORF von mCLCA3 über diese Schnittstellen in die multiple Klonierungsstelle (engl. *multiple cloning site*, MCS) des Vektors pEYFP-N1 zu klonieren.

Primer	Name	Restriktions- stelle	Sequenz
upstream	XhoIm3+	<i>XhoI</i>	<u>ATCTCGAGCT</u> ATGGAATCTTTGAAGAGT CCTG
downstream	HindIII _{m3-}	<i>HindIII</i>	<u>ATAAGCTT</u> GTGCAAACCTAGTGTCACCT GC

Tabelle 2: Primer mit den „Linkern“ (unterstrichen) für die Klonierung des ORF von mCLCA3 in den Vektor pEYFP-N1. Restriktionsstellen sind kursiv gedruckt.

Die Primer wurden von der Fa. MWG-Biotech AG in Erlangen hergestellt. Sie wurden mit 1 mM Tris-HCl pH 8,0 auf 20 µmol eingestellt. Mit Hilfe der entworfenen Primer wurde der ORF von mCLCA3 mittels PCR amplifiziert. Um die optimale Anlagerungstemperatur zu finden, wurde zuerst eine Gradienten-PCR durchgeführt. Als Amplifikationsvorlage (*template*) diente der ORF von mCLCA3 kloniert in den Vektor pcDNA3.1 (Leverkoehne und Gruber 2002). Für die PCR wurden folgende Reagenzien und Materialien benutzt:

Die Bestandteile der dNTP-Stammlösung (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) stammten von der Fa. Invitrogen life technologies, Carlsbad.

Die Stammlösung wurde auf 10 mM pro dNTP eingestellt. Der 10x Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,8; 250 mM KCl; 20 mM MgSO₄) und die PWO-DNA-Polymerase (1 U/μl) stammten von Fa. PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen.

Es wurden zwei getrennte Stammlösungen (Master-Mix I und II) wie folgt auf Eis in je einem Standardreaktionsgefäß zusammengegeben, als Negativkontrolle dienten die gleichen Stammlösungen ohne *template*:

Komponenten für Master-Mix I	Eingesetzte Volumina	Endkonzentration
dNTP-Stammlösung (10 mM je dNTP)	4,5 μl	je 200 μM
<i>Xho</i> Im3+ (20 μM)	9 μl	0,8 μM
<i>Hind</i> IIIIm3- (20 μM)	9 μl	0,8 μM
<i>template</i> (10 ng/μl)	2,25 μl	22,5 ng
Aqua bidest.	87,75 μl	
Endvolumen	112,5 μl	
Komponenten für Master-Mix II		
10x Reaktionspuffer	22,5 μl	1x
PWO-Polymerase (1 U/μl)	4,5 μl	0,02 U/μl
Aqua bidest.	85,5 μl	
Endvolumen	112,5 μl	

Tabelle 3: Reagenzien für die Gradienten-PCR

Die beiden Stammlösungen wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt.

Der Master-Mix I wurde auf acht dünnwandige, 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße je 12,5 μl aufgeteilt und im Thermocycler (T_{Gradient}, Fa. Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm behandelt:

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Gehe zu Nummer	Zyklus Schleife	Zeit zulage pro Zyklus
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min			
2. Zugabe des Master-Mix II	80°C	3 min			
3. Denaturierung	95°C	40 s			
4. Anlagerung	60-70°C *)	40 s			
5. Verlängerung	72°C	2 min	3.	34	8 s
6. Finale Verlängerung	72°C	10 min			
7. Wartezeit bis Probenentnahme	4°C	∞			

Tabelle 4: PWO-Gradienten-PCR-Programm. *) in acht Teilschritten

Der Master-Mix II wurde bei Zyklusschritt 2 zum Master-Mix I im gleichen Volumen von je 12,5 µl pipettiert. Die PCR-Produkte wurden nach Abschluss der PCR zur Kontrolle auf einem 1%igen Agarosegel mit dem DNA-Größenstandard Hyperladder I (Fa. Bioline, Luckenwalde) aufgetrennt. Agarose (Fa. Bioline, Luckenwalde) für ein 1%iges (Masse/Volumen) Gel wurde dazu in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit einem entsprechenden Volumen 0,5 x TBE-Puffer (siehe Kapitel 3.14) gemischt. Anschließend wurde das Gemisch in einem Mikrowellenherd bei 800 W Leistung erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach erfolgter Abkühlung auf ca. 65°C wurde die Lösung mit 2 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) versetzt, gut gemischt und in eine vorbereitete Gelkammer blasenfrei gegossen. Zu 5 µl PCR-Produkt wurden jeweils 3 µl Glycerin-Farbstoffpuffer (siehe Kapitel 3.14) pipettiert. Das Gemisch wurde in die Geltaschen überführt und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE-Puffer. Zur Dokumentation wurden die Gele unter UV-Licht bei 245 nm Wellenlänge beleuchtet und mit einem Geldokumentationssystem der Fa. Biometra, Göttingen fotografiert.

Die optimale Anlagerungstemperatur zur Herstellung des PCR-Produktes lag bei 65°C. Zur Herstellung einer ausreichenden Menge an PCR-Produkt für die Klonierung des ORF von mCLCA3 in den Vektor pEYFP-N1 wurde eine PCR durchgeführt bei der optimalen Anlagerungstemperatur von 65°C. Es wurden wie oben beschrieben (siehe Tabelle 3) zwei

getrennte Stammlösungen (Master-Mix I und Master-Mix II) von je 275 µl auf Eis pipettiert. Der Master-Mix I wurde auf zehn dünnwandige 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäße je 25 µl aufgeteilt. Die PCR wurde in dem Thermocycler bei folgendem Programm durchgeführt.

Zyklenschritt	Temperatur	Zeit	Gehe zu Nummer	Zyklusschleifen	Zeitzulage pro Zyklus
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min			
2. Zugabe des Master-Mix II	80°C	3 min			
3. Denaturierung	95°C	40 s			
4. Anlagerung	65°C	40 s			
5. Verlängerung	72°C	2 min	3.	34	8 s
6. Finale Verlängerung	72°C	10 min			
7. Wartezeit bis Probenentnahme	4°C	∞			

Tabelle 5: PWO-PCR-Programm zur Amplifikation des ORF von mCLCA3 zur Klonierung in den Vektor p-EYFP-N1

Der Master-Mix II wurde bei Zyklusschritt 2 zum Master-Mix I im gleichen Volumen von je 25 µl pipettiert.

Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines PCR-Aufreinigungskits (QIAquick PCR-Purification Kit, Fa. QIAGEN, Hilden) wie folgt aufgereinigt. Zu einem PCR-Volumen von 200 µl wurde das fünffache Volumen des Bindungspuffers PB pipettiert und kurz durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Gemisch wurde auf zwei Aufreinigungssäulen (QIAquick Spin Columns) aufgeteilt und für 1 min bei 15.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach erfolgter Bindung der DNA an die Säule wurde die Flüssigkeit nach der Zentrifugation verworfen. Auf die Säulen wurden danach je 750 µl Waschpuffer gegeben und für 1 min bei 15.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde wieder danach verworfen und die Säulen wurden wieder für 1 min bei 15.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die durch die Zentrifugation gewonnene Restflüssigkeit wurde verworfen. Die Säulen wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und auf die Säulen wurden je 50 µl Elutionspuffer

(10 mM Tris-HCl, pH 8,5) pipettiert und 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Die Konzentration der eluierten DNA wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (Fa. Biometra, Göttingen) gemessen.

Die Klonierung des gewonnenen PCR-Produkts in den Vektor pEYFP-N1 erfolgte über die Restriktionsstellen *XhoI* und *HindIII* in der MCS des Vektors. Dazu wurden sowohl der Vektor pEYFP-N1 als auch das amplifizierte PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *HindIII* (Fa. FermentasLifeSciences, St. Leon-Rot) geschnitten. 700 ng PCR-Produkt und 50 µg Vektor wurden mit je 1 U Enzym pro 1 µg DNA und dem 10x Puffer B (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml Bovines Serum Albumin; Fa. FermentasLifeSciences, St. Leon-Rot) in einer 1x Endkonzentration bei 37°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurde die geschnittene DNA mittels des PCR-Aufreinigungskits wie oben beschrieben aufgereinigt. Die Konzentration der eluierten DNA wurde mit Hilfe des Spektrophotometers gemessen.

Das mit den Restriktionsenzymen geschnittene und aufgereinigte PCR-Produkt (Insert) wurde in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor mit Hilfe einer DNA-Ligase ligiert. Die einzusetzende Menge an Insert wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Vektormenge} \times \text{Insertgröße} \times 3}{\text{Vektorgröße}} = \text{Insertmenge}$$

$$\frac{100 \text{ ng} \times 2,7 \text{ kb} \times 3}{4,7 \text{ kb}} = 172 \text{ ng}$$

Für die Ligationsreaktion wurden die T4-DNA-Ligase und der 5x Ligase Puffer (250 mM Tris-HCl, pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % Polyethylenglycol 8000) von Fa. Invitrogen Life Technologies, Carlsbad eingesetzt.

Es wurden drei Ligationsreaktionen pipettiert: Vektor mit Insert und Ligase (VIL), Vektor und Ligase (VL) und Vektor alleine (V). Die letzten beiden dienten als Negativkontrollen für das anschließende Bakterienwachstum.

Komponenten	VIL	VL	V	Endkonzentration
5x Ligationspuffer	4 μ l	4 μ l	4 μ l	1x
Vektor (100 ng/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l	100 ng
Insert	12 μ l	-	-	172 ng
T4 DNA Ligase (1 U/ μ l)	2 μ l	2 μ l	-	0,1 U/ μ l
Aqua bidest.	1 μ l	13 μ l	15 μ l	
Endvolumen	20 μ l	20 μ l	20 μ l	

Tabelle 6: Ligationsreaktion für die Klonierung des ORF von mCLCA3 in den Vektor pEYFP-N1. VIL = Vektor Insert Ligase; VL = Vektor Ligase; V = Vektor.

Die Ligationsreaktion wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ligationsansätze für die Transformation von Bakterienzellen benutzt.

Für die Transformation wurden 100 μ l *XL2-Blue Ultracompetent Cells* und β -Mercaptoethanol (beides Fa. Stratagene, Amsterdam) auf Eis aufgetaut. Zu 100 μ l Zellen wurden 2 μ l β -Mercaptoethanol hinzugefügt und 10 min auf Eis inkubiert. Alle 2 min wurden die Zellen vorsichtig gemischt.

Die Zellen wurden auf 50 μ l und zweimal 25 μ l aufgeteilt. Zu 50 μ l Zellen wurden 2,5 μ l Ligationsansatz VIL, zu je 25 μ l Zellen wurden je 1,75 μ l Ligationsansatz VL bzw. V pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 s bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Zellen sofort für 2 min auf Eis gestellt. Es wurden 500 μ l bzw. 250 μ l steriles Luria-Bertani (LB)-Medium (1 % Tryptone Peptone, Fa. BD, Le Pont de Clair, Frankreich; 0,5% Yeast-Extract, Fa. Sigma-Aldrich, München; 1 % NaCl) ohne Antibiotikum auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 1 h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator bei 250 rpm inkubiert und anschließend auf Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin ausplattiert. Die Agarplatten wurden zuvor wie folgt hergestellt. LB-Medium wurde dazu mit 1,5% (Masse/Volumen) Agar (Fa. Sigma-Aldrich, München) versetzt. Nach erfolgter Autoklavierung wurde dem auf ca. 55°C abgekühltem, aber noch flüssigem LB-Agar-Medium Kanamycin (50 μ g/ml; Fa. Sigma-Aldrich, München) als Selektionsantibiotikum zugesetzt. Danach wurden je ca. 10 ml in Standardpetrischalen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gegossen. Nachdem der Agar geliert war, wurden die Platten für die Bakterienbeimpfung genutzt. Die Inkubation der ausplattierten Bakterien erfolgte für 17 h bei 37°C.

Um positive Bakterienkolonien zu finden, die das gewünschte Plasmid (ORF mCLCA3 in pEYFP-N1-Vektor) tragen, wurden die Bakterienkolonien aus dem Ligationsansatz VIL wie folgt durchgemustert. Einzelne Bakterienkolonien wurden dazu mit je einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 100 μ l Aqua bidest. vorsichtig suspendiert. 1 μ l der Suspension wurde als *template* zu folgender PCR gegeben, der Rest bei +4°C gelagert. Die thermophile *Thermus aquaticus* (Taq)- DNA Polymerase und der 10x PCR-Puffer MgCl₂-frei (100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 500 mM KCl, 0,1 % TritonTM X-100) sowie das MgCl₂ (25 mM) waren von Fa. Promega, Mannheim.

Komponenten	Eingesetzte Volumina	Endkonzentration
10x PCR- Puffer MgCl ₂ -frei	2,5 μ l	1x
MgCl ₂ (25 mM)	1,6 μ l	1,6 mM
dNTP-Stammlösung (10 mM je dNTP)	0,5 μ l	je 200 μ M
<i>Xho</i> Im3+ (20 μ M)	1,25 μ l	1 μ M
<i>Hind</i> IIIIm3- (20 μ M)	1,25 μ l	1 μ M
Aqua bidest.	15,9 μ l	

Tabelle 7: Reagenzien für die PCR zum Durchmustern von transformierten Bakterienkolonien

Die 24 μ l Reaktion wurde mit Paraffinöl überschichtet und im Thermocycler (T_{Gradient}, Fa. Biometra, Göttingen) nach folgendem Programm behandelt:

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Gehe zu Nummer	Zyklus Schleifen	Zeitzulage pro Zyklus
1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min			
2. Zugabe des Polymerase-Mix	80°C	3 min			
3. Denaturierung	94,5°C	40 s			
4. Anlagerung	65°C	40 s			
5. Verlängerung	72°C	2 min	3.	34	8 s
6. Finale Verlängerung	72°C	10 min			
7. Wartezeit bis Probenentnahme	4°C	∞			

Tabelle 8: Taq-PCR-Programm zum Durchmustern von transformierten Bakterienkolonien

Bei Zyklusschritt 2 wurde 1 µl eines Taq-Polymerase-Mix hinzupipettiert. Der Polymerase-Mix wurde wie folgt hergestellt:

Komponenten	Eingesetzte Volumina	Endkonzentration im Polymerase-Mix	Endkonzentration in der PCR
10 x PCR-Puffer	2 µl	1 x	1 x
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1,8 µl	0,45 U/µl	0,018 U/µl
Aqua bidest.	ad 20 µl		

Tabelle 9: Taq-Polymerase-Mix

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel wie oben beschrieben analysiert. Positive Bakterienkolonien wurden in 50 ml LB-Medium mit dem Selektionsantibiotikum Kanamycin über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler vermehrt.

Ein Aliquot mit final 10% Glycerinzusatz wurde bei -80°C tiefgefroren. Die restlichen Bakterienzellen wurden bei 6.000 x g für 20 min bei +4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde das Plasmid mit Hilfe eines Plasmidisolierkits (QIA-Filter™ Plasmid Midi-Kit) von Fa. QIAGEN, Hilden, aus den Bakterienzellen isoliert.

Das Pellet wurde in 4 ml Resuspensionspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Anschließend wurden 4 ml Lysispuffer (200 mM NaOH; 1 % SDS) hinzugegeben, durch fünf-maliges Schwenken gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 4 ml Neutralisationspuffer (3 M KAc, pH 5,5) hinzugegeben, fünf mal geschwenkt und anschließend in ein Säulenfiltersystem (QIAfilter Midi Cartridge) gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wurde auf eine zuvor mit 4 ml Equilibrierungspuffer (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol; 0,15% Triton™ X-100) equilibrierte Aufreinigungssäule (QIAGEN-tip 100) filtriert. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml Waschpuffer (1 M NaCl; 50 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol) gewaschen. Anschließend wurde die gebundene DNA mit 5 ml Elutionspuffer (1,25 mM NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8,5; 15% Isopropanol) von der Säule gewaschen. Zu der eluierten DNA wurden 3,5 ml Isopropanol gegeben und bei 15.000 x g für 30 min bei +4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen und bei 15.000 x g für 10 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in 300 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 gelöst und anschließend wurde die Konzentration mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen. Die DNA wurde durch die Fa. SEQLAB, Göttingen, sequenziert, und anschließend mit der mCLCA3-DNA-Sequenz (GenBank™ accession number AB 016592) verglichen, um Lesefehler auszuschließen.

Das hergestellte Plasmid, das dem ORF von mCLCA3 in dem Vektor pEYFP-N1 entspricht, wurde ebenfalls für die transiente Transfektion von Säugetierzellen benutzt (siehe 3.5). Das von diesen Zellen produzierte Protein wird im folgenden mCLCA3-YFP-Fusionsprotein genannt.

3.4 Säugetierzellen und Zellkulturbedingungen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden zwei fibroblastenähnliche, unpolare Nierenzelllinien benutzt. Die von der Affenart *Cercopithecus aethiops* stammenden COS-1 Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hassan Y. Naim (Institut für Physiologische Chemie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) bereitgestellt. Die menschliche Zelllinie HEK293 stammte aus dem Institut für Lebensmitteltoxikologie und Chemische Analytik der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Dr. Dr. Alfonso Lampen). Die Zellen wurden bei +37°C in Anwesenheit von 5% CO₂ in einem

Zellkulturbrutschrank in 10-cm Zellkulturschalen (Fa. Greiner, Hamburg) kultiviert. Für die Kultivierung der COS-1 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose (1 g/l) von Fa. PAA, Pasching in Österreich, benutzt. Das Medium (500 ml) wurde mit 5 ml 200 mM L-Glutamin von Fa. PAA, Pasching (Endkonzentration: 2 mM), mit 50 ml fetalem Kälberserum (FKS) von Fa. Sigma-Aldrich, München (Endkonzentration: 10 %) und mit 5 ml des Antibiotikums Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 1x) von Fa. PAA, Pasching versetzt, um ein entsprechendes Zellkulturmedium zu erhalten. Für die Kultivierung der HEK293 Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (4,5 g/l) von Fa. PAA, Pasching benutzt, das mit den gleichen Bestandteilen wie oben beschrieben versetzt wurde, um ein Zellkulturmedium zu erhalten. Die Zellen wurden vor einem Mediumwechsel zweimal mit steriler Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, siehe Kapitel **3.14**) gewaschen.

Zum Lösen der Zellkontakte wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit circa 2 ml 1x Trypsin/EDTA (Fa. PAA, Pasching) für circa 7 min (COS-1 Zellen) oder für circa 2 min (HEK293 Zellen) bei +37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1 ml FKS-haltigem Zellkulturmedium beendet. Die Zellen wurden dann bei +4°C für 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in ihrem entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert und in neuen Zellkulturschalen ausgesät.

3.5 Transiente Transfektion von Säugetierzellen

Um die mCLCA3-, mCLCA3-YFP- oder eCLCA1-beladenen Plasmide (siehe **3.2**) in den Zellkern von COS-1 Zellen einzubringen, damit die Zellen das entsprechende Protein produzieren und prozessieren können, wurde die transiente Transfektion mittels modifizierter DEAE-Dextran Methode (Naim et al. 1991; Pagano und Vaheri 1965) gewählt. In Kultur gehaltene COS-1 Zellen wurden 24 h vor der geplanten Transfektion von der Zellkulturschale wie oben beschrieben gelöst und so vereinzelt, dass sie am folgenden Tag circa 40% konfluent waren. Zu je 750 µl Transfektionsmedium (DMEM ohne FKS) wurden 5 µg der Plasmid-DNA bzw. 10 µl DEAE-Dextran (Fa. Sigma, München) gegeben. Die Gebrauchslösung des DEAE-Dextran hatte eine Konzentration von 50 mg DEAE-Dextran/ml Aqua bidest. Die Gemische wurden bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium mit der DNA in das Medium mit DEAE-Dextran überführt und für die Bildung des DEAE-Dextran-DNA-Komplexes 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der

Komplex auf die Zellen pipettiert und für eineinhalb Stunden auf den Zellen belassen. Die Zellen wurden alle 15 min vorsichtig geschwenkt.

Danach wurde der DEAE-DNA-Komplex von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Chloroquin (Fa. Sigma, München) wurde für die Nachbehandlung der transfizierten Zellen zur Verhinderung der Degradation der transfizierten DNA durch pH-Erhöhung in den endosomalen und lysosomalen Kompartimenten im Kulturmedium (10 µl auf 10 ml, also 1:1.000) zugegeben. Die Gebrauchslösung hatte eine Konzentration von 50 mg Chloroquin/ml Aqua bidest. Nach drei Stunden wurden das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und 10 ml neues Zellkulturmedium zugegeben. 48 h nach der Transfektion wurden die entsprechenden Versuche mit den transfizierten Zellen durchgeführt.

Die Transfektion der HEK293 Zellen wurde mit der LipofectamineTM2000 Methode nach dem Protokoll von Invitrogen durchgeführt. 24 h vor der geplanten Transfektion wurden die HEK293 Zellen von der Zellkulturschale wie oben beschrieben mittels Trypsin/EDTA abgelöst und so vereinzelt, dass sie am folgenden Tag auf einer 60-mm Zellkulturschale (Fa. Greiner, Hamburg) circa 90% konfluent waren. Zu je 500 µl Transfektionsmedium (DMEM ohne Antibiotikum und FKS) wurden 10 µg Plasmid-DNA bzw. 20 µl LipofectamineTM2000 (Fa. Invitrogen, Carlsbad) gegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Plasmid-haltige Gemisch in das LipofectamineTM2000-haltige Gemisch überführt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die zu transfizierenden Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit 4 ml Antibiotikum-freiem Zellkulturmedium versetzt. Der Komplex wurde vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach 24 h wurde das Medium gegen Zellkulturmedium mit Antibiotikum ausgetauscht. 48 h nach der Transfektion wurden die entsprechenden Versuche mit den transfizierten Zellen durchgeführt.

3.6 Radioaktive Markierung von Proteinen

Die radioaktive Markierung der Proteine erfolgte mit ³⁵S-Methionin nach einer modifizierten Methode (Naim et al. 1991; Torian und Kenny 1986). 48 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 2 h mit 5 ml Methionin-freiem Minimum Essential (ME)-Medium (MEM with Earle's Salts versetzt mit Antibiotikum Penicillin/Streptomycin, Endkonzentration: 1x, und L-Glutamin, Endkonzentration: 2 mM, alles Fa. PAA, Pasching) inkubiert. Danach wurde das Methionin-freie Medium durch 5 ml frisches ME-Medium mit 3700 kBq (100 µCi) ³⁵S-Methionin für die

Zellmarkierung (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) ersetzt. Bei der kontinuierlichen Markierung wurde das radioaktiv markierte Medium für sechs Stunden auf den Zellen belassen. Bei *pulse chase*-Versuchen wurden die Zellen für 20 min markiert. Danach wurde das radioaktive Medium gegen 5 ml nicht-radioaktives Zellkulturmedium ausgetauscht und dies wurde für entsprechende Zeitintervalle auf den Zellen gelassen.

3.7 Gewinnung des Proteins aus Zellkulturüberstand und Zellysat

3.7.1 Zellyse und Gewinnung des Proteins mittels Immunpräzipitation

Der Zellkulturüberstand wurde von den Zellen abgenommen und für 5 min bei 1.000 x g zentrifugiert, um abgelöste Zellen aus dem Medium zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und 20 µl Protein-A-Sepharose-Kügelchen (50% [Masse/Volumen] in PBS; Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden pro Milliliter Überstand zugegeben und über Nacht bei +4°C auf einem Schüttler geschwenkt (*preclearing*). Die Zellyse und die Immunpräzipitation (IP) wurden nach folgender Methode durchgeführt (Naim et al. 1991): Zu den Zellen wurden 20 µl Protease-Inhibitor-Mix (1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF; 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Aprotinin; 5 µg/ml Antipain; 5 µg/ml Leupeptin; 100 µg/ml Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor; Fa. Sigma, München) und 1 ml Standardlysispuffer (25 mM Tris-HCL, pH 8,0; 50 mM NaCL; 0,5% Desoxycholsäure Natriumsalz, DOC; 0,5% Triton-X-100) gegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und über 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die lysierten Zellen bei 10.000 x g und +4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl Protein-A-Sepharose über Nacht bei +4°C auf einem Schüttler geschwenkt.

Die Protein-A-Sepharose wurde am nächsten Tag bei 6.500 x g und +4 °C für 20 s abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Immunpräzipitation wurden der anti-mCLCA3 spezifische Antikörper α -p3b (Leverkoehne und Gruber 2002), der die Aminosäuresequenz 253 bis 267 des mCLCA3-Proteins erkennt, oder der anti-YFP-Antikörper („BD Living Colors™ full-length A.v. polyclonal antibody“, Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg) für den Nachweis des YFP-markierten Konstruktes eingesetzt. Die jeweiligen Antikörper wurden in den in Tabelle 10 angegebenen Mengen zugegeben und für 2 h bei +4°C auf einem Schüttler inkubiert, danach wurde Protein-A-Sepharose (siehe Tabelle 10) für 2 h hinzugegeben.

Präzipitiertes Protein	Antikörper	Antikörper-Menge	Verdünnung	Protein-A-Sepharose
mCLCA3	α -p3b	10 μ l/ml	1:100	20 μ l/ml
mCLCA3-YFP	anti-YFP	1 μ l/ml	1:1000	20 μ l/ml

Tabelle 10: Antikörper- und Protein-A-Sepharose-Verdünnungen für die Immunpräzipitation

Der Protein-Antikörper-Protein-A-Sepharose-Komplex wurde bei 6.500 x g und bei +4°C für 20 s abzentrifugiert. Der Komplex wurde zuerst zweimal mit 1 ml Waschpuffer I (0,5 Triton-X-100; 0,005% DOC in PBS) und danach zweimal mit Waschpuffer II (500 mM NaCl; 0,5% Triton-X-100; 10 mM EDTA; 125 mM Tris-HCL, pH 8,0) gewaschen. Zwischen den Waschvorgängen wurde der Komplex bei 6.500 x g und +4°C für 20 s abzentrifugiert.

3.7.2 Gewinnung des Proteins mittels Ethanolpräzipitation aus dem Zellkulturüberstand

Da der aufgereinigte Antikörper α -eCa1 (Anton et al. 2005) gegen das Protein eCLCA1 nicht zuverlässig in der Immunpräzipitation funktionierte, wurde das Protein eCLCA1 aus dem Überstand (Medium ohne FKS) der transfizierten Zellen mittels Ethanolpräzipitation gewonnen. Der Zellkulturüberstand wurde bei 1.000 x g für 5 min bei +4°C zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit zwei Volumen eiskaltem, 100 % Ethanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gemisch für 20 min bei 15.000 x g und +4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das gewonnene Pellet bei +37°C für 10 min getrocknet. Die Zellen wurden wie oben (siehe Kapitel 3.7.1) beschrieben in 500 μ l Zellysepuffer lysiert.

3.8 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli 1970). Für die radioaktive Analyse der Proteine wurde das ProteanTM II-xi Cell-System von Fa. Biorad, München, und für die Analyse der Proteine mittels Westernblottechnik das Mini-ProteanTM II Elektrophorese-System ebenfalls

von Fa. Biorad, München benutzt. Dazu sind für die 10%-igen Gele in einem Becherglas die Komponenten für ein Trenngel wie nach Tabelle 11 pipettiert worden. Die 10%-ige Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung wurde als letzte Komponente hinzugegeben.

Komponenten	Für Protean™ II-xi Cell-System	Für Mini-Protean™ II Elektrophorese-System	Endkonzentration
Aqua bidest. (ml)	12,3	2,0	
30 % Acrylamid (ml)	10,0	1,6	10%
1,5 M Tris, pH 8,8 (ml)	7,7	1,3	390 mM
10% SDS (µl)	300	50	0,1 %
TEMED (µl)	23	4	0,08 %
10%-ige APS-Lösung (µl)	300	50	0,1 %
Endvolumen (ml)	30	5	

Tabelle 11: Zusammensetzung des Trenngels zur Auftrennung nach dem Molekulargewicht

Die Flüssigkeit wurde zwischen die Glasplatten des vorbereiteten Systems gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Stunde wurde das Isopropanol mittels dreimaligem Spülen mit Aqua bidest. abgewaschen und das Trenngel wurde mit einem Sammelgel überschichtet.

Das Sammelgel wurde zuvor in einem Becherglas aus folgenden Komponenten (Tabelle 12) hergestellt.

Komponenten	Für Protean™ II-xi Cell-System	Für Mini-Protean™ II Elektrophorese-System	Endkonzentration
Aqua bidest. (ml)	6,8	1,4	
30 % Acrylamid (ml)	1,7	0,33	5,1 %
1,0 M Tris pH 6,8 (ml)	1,25	0,25	125 mM
10% SDS (µl)	100	20	0,1 %
TEMED (µl)	10	2	0,1 %
10%-ige APS-Lösung (µl)	100	20	0,1 %
Endvolumen (ml)	10	2	

Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels

Ein Kamm des jeweiligen Systems wurde zur Bildung von Probenaschen in das noch flüssige Sammelgel blasenfrei geschoben. Nach erfolgter Aushärtung (circa 1 h) wurden die Kämmen entfernt und die Gele in die vorbereiteten Laufkammern gesteckt. Das jeweilige System wurde mit 1x Elektrophoresepuffer (25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (Masse/Volumen) SDS) gefüllt.

Die Proben wurden mit 3x Lämmli-Puffer (150 mM Tris-HCl, pH 6,8; 30% Glycerin; 6% SDS; 0,02% Bromphenolblau; 150 mM DTT) versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben in die Taschen gegeben und der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Als Protein-Molekulargewichtsstandard wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fa. FermentasLifeSciences, St. Leon-Rot) für Gele, die für die Westernblotanalyse bestimmt waren, und Roti™-Mark STANDARD (Fa. Roth, Karlsruhe) für Gele, die für die Analyse der radioaktiv markierten Proteine bestimmt waren, eingesetzt.

3.9 Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten, radioaktiv markierten Proteine

Die Gele, die für die Analyse der radioaktiv markierten Proteine bestimmt waren, wurden in einer Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue; 25% Isopropanol; 10% Essigsäure) über

20 min inkubiert, anschließend wurden sie bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden in einer Entfärberlösung (25% Isopropanol; 10% Essigsäure) geschwenkt. Die Proteingele wurden mit Hilfe einer Vakuum betriebenen Trocknungsanlage getrocknet und die radioaktiv markierten Proteine durch Auflegen des Gels auf einen Phosphorschirm detektiert. Der Fotoschirm wurde mit Hilfe eines Phosphoimagers (Fa. Biorad, München) ausgewertet.

3.10 Westernblotanalyse

Zur Aufbereitung der für die Westernblotanalyse bestimmten Gele (siehe Kapitel 3.8) wurden die Proteine auf dem Gel mit Hilfe des Mini Trans-Blot™ Elektrophorese Transfersystem (Fa. Biorad, München) vom Gel auf eine Zellulose Nitrat Membran (Protran™ BA 85 0,45 µm, Fa. Schleicher&Schuell, Dassel) bei 90 Volt für 2 h in einem Transferpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % Methanol) transferiert. Danach erfolgte die Inkubation der Membran für 90 min bei Raumtemperatur im Blockierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20; 5% Trockenmilchpulver). Anschließend wurde ein spezifischer Erstantikörper für die Detektion des Proteins in den Blockierungspuffer über Nacht bei +4°C gegeben (siehe Tabelle 13). Für die Westernblotanalyse des amino-terminalen Teiles des mCLCA3-Proteins oder des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins wurde der anti-mCLCA3 spezifische Antikörper α -p3b (Leverkoehne und Gruber 2002), der die Aminosäuresequenz 253 bis 267 erkennt, oder der anti-mCLCA3 Antikörper α -p3a (Leverkoehne und Gruber 2002), der das mCLCA3 Epitop 83-97 erkennt, genutzt. Für die Westernblotanalyse des carboxy-terminalen Teiles des mCLCA3-YFP-Fusionsproteins wurden der anti-YFP-Antikörper „BD Living Colors™ full-length A.v. polyclonal antibody“ (Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg) oder der anti-YFP-Antikörper (JL-8) „BD Living Colors™ A.v. Monoclonal antibody“ (Fa. BD Biosciences Clontech, Heidelberg) eingesetzt. Für die Westernblotanalyse des eCLCA1-Proteins wurde der anti-eCLCA1 spezifische Antikörper α -eCa1, der die Aminosäuresequenz 81-95 erkennt (Anton et al. 2005), verwendet.

Erstantikörper	Protein	Epitop	Verdünnung	Zweitantikörper	Verdünnung
α -p3b	mCLCA3	amino-terminal	1:750	anti-rabbit IgG	1:2.000
α -p3a	mCLCA3	amino-terminal	1:100	anti-rabbit IgG	1:2.000
anti-YFP	mCLCA3-YFP	carboxy-terminal	1:1.000	anti-rabbit IgG	1:2.000
anti-YFP (JL-8)	mCLCA-YFP	carboxy-terminal	1:1.000	anti-Maus IgG	1:200
α -eCa1	eCLCA1	amino-terminal	1:1.000	anti-rabbit IgG	1:2.000

Tabelle 13: Antikörperverdünnungen, die zur Westernblotanalyse eingesetzt wurden

Die Membran wurde dreimal in Tween-haltiger Tris-gepufferter Salzlösung (TTBS, 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20) für je 10 min gewaschen. Anschließend wurde sie für 1 h mit dem Zweitantikörper in TTBS inkubiert. Als Zweitantikörper für die Westernblotanalyse wurde zur Erkennung der Antikörper α -p3b, α -p3a, anti-YFP, α -eCa1, die in Kaninchen hergestellt wurden, der Antikörper anti-rabbit IgG (anti-rabbit horse horseradish peroxidase-linked IgG antibody, Fa. Cell Signaling, Beverly, MA) und zur Erkennung des Erstantikörpers anti-YFP (JL-8) der Antikörper anti-Maus IgG (H +L, Fa. Biologo, Kronshagen) eingesetzt, und zwar in den in Tabelle 13 angegebenen Konzentrationen. Die Membran wurde wieder dreimal in TTBS für je 10 min gewaschen. Die Membran, deren Inkubation mit dem anti-Maus Zweitantikörper erfolgte, wurde zusätzlich mit dem VectastainTM ABC Kit von Fa. Biologo, Kronshagen behandelt. Dabei wurden die Substanz A des Kits bzw. die Substanz B des Kits (1:25) in Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Substanzen ineinander überführt, wieder für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um sie danach für weitere 30 min auf die Membran bei Raumtemperatur zu geben. Die Membran wurde anschließend dreimal mit TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit der *enhanced chemiluminescence* Reagenz (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und einem Kodak X-Omat Film (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in der Dunkelkammer oder mit Hilfe des ChemiDOC XRS Geldokumentationssystems von Fa. Biorad, München.

3.11 Bestimmung der Glykosylierungsmuster

Mit Hilfe der Enzyme Endo H und PNGase F wurde das Glykosylierungsmuster der Proteine bestimmt (Naim et al. 1987; Maley et al. 1989). Endo H spaltet Asparagin-glykosylierte, Mannose reiche Formen, während PNGase F sowohl Mannose reiche als auch komplex Asparagin-glyko-sylierte Zuckerketten von Glykoproteinen spaltet. Die Mannose reiche Glykosylierung findet innerhalb des ER statt. Beim Weitertransport des Proteins in den Golgi-Apparat wird die Mannose-reiche Glykosylierung in eine komplexe umgewandelt.

Das aus dem Zellysats bzw. dem Überstand gewonnene Protein (siehe Kapitel 3.7) wurde mit Denaturierungspuffer (10 x; 5% SDS, 0,4 M DTT, Fa. New England Biolabs, Frankfurt) wie in Tabelle 14 aufgeführt behandelt. Die Proben wurden dann 10 min bei 95°C inkubiert.

Komponenten	Volumina	Endkonzentration	Komponenten	Volumina	Endkonzentration
Proteinpellet aus IP oder der Ethanol-fällung aus dem Überstand	0 µl		Protein in Zellysispuffer	54 µl	
Denaturierungspuffer (10 x)	6 µl	1x	Denaturierungspuffer (10 x)	6 µl	1x
Aqua bidest.	54 µl		Aqua bidest.	0 µl	
Endvolumen	60 µl		Endvolumen	60 µl	

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Denaturierung des Proteins für die Deglykosylierung mit Endo H und PNGase F

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das denaturierte Protein mit den Enzymen Endo H (siehe Tabelle 15) oder PNGase F (siehe Tabelle 16) behandelt. Der 10x G5-Puffer enthielt 0,5 M Natriumcitrat, pH 5,5 und der 10x G7-Puffer enthielt 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,5. Die Enzyme und die Puffer stammten von Fa. New England Biolabs, Frankfurt.

Komponenten	Eingesetzte Volumina	Endkonzentration
Aliquot aus Denaturierungsansatz	21,5 μ l	
G5-Puffer (10x)	2,5 μ l	1x
Endo H (500 U/ μ l)	1 μ l	20 U/ μ l
Endvolumen	25 μ l	

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die Endo H Behandlung

Komponenten	Eingesetzte Volumen	Endkonzentration
Aliquot aus Denaturierungsansatz	19 μ l	
G7-Puffer (10x)	2,5 μ l	1x
NP-40 (10 %)	2,5 μ l	1 %
PNGase F (500 U/ μ l)	1 μ l	20 U/ μ l
Endvolumen	25 μ l	

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die PNGase F Behandlung

Die Inkubation erfolgte für 1-3 h bei 37°C. Danach wurden die Proben mit 8 μ l 3x Lämmli-puffer versetzt, für 10 min bei 95°C inkubiert und der elektrophoretischen Auftrennung zugeführt (siehe Kapitel 3.8).

3.12 Immunfluoreszenz

COS-1 Zellen wurden für die Transfektion mit mCLCA3 auf einer Zellkulturschale mit runden Deckgläschen (12 mm im Durchmesser, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) ausgesät. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden viermal mit PBS gewaschen. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden in eine 6-Loch Zellkulturschale (Fa. Greiner, Hamburg) überführt und anschließend mit Fixiermedium für 4 h bei Raumtemperatur fixiert. Das Fixiermedium bestand aus 4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS, welches auf 60°C erhitzt und anschließend sterilfiltriert wurde. Es folgte die zweimalige Reinigung mit PBS. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 10 min in einem Quench Puffer (50 mM NH₄Cl in PBS) inkubiert. Danach wurden die Zellen 30 min bei Raumtemperatur im

Blockierungspuffer (1% Bovines Serum Albumin, 0,5% Saponin in PBS) inkubiert. Die Zellen wurden mit dem anti-mCLCA3 Antikörper α - p3b (1:250) 45 min bei Raumtemperatur im Blockierungspuffer inkubiert. Danach wurden die Zellen viermal für je fünf min mit Blockierungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Zweitantikörper Anti-rabbit IgG-AlexaFluor 488 (Fa. Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad) im Blockierungspuffer (1:1.000) für 45 min. Nach viermaligem Waschen für fünf min im Blockierungspuffer und dreimaligem Waschen für fünf min in PBS wurden die auf den Deckgläschen fixierten Zellen auf einem Objektträger (Fa. Langenbrinck, Emmendingen) mit 15 μ l Mowiol-Lösung geklebt. Die Mowiol-Lösung ist, gemäß den Angaben des Herstellers, mit dem MowiolTM 4-88 Reagenz (Fa. Calbiochem, Darmstadt) erstellt worden. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie analysiert.

3.13 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie¹

Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit dem Leica TCS SPII Mikroskop unter Verwendung einer 63-fachen Plasmachromatlinse (Fa. Leica-Microsystems, Bensheim). Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops wurden sowohl lebende Zellen (Hirschberg et al. 1998) als auch fixierte Zellen nach Immunfluoreszenz beobachtet. Auf Deckgläschen wachsende, lebende Zellen wurde mit mCLCA3-YFP alleine oder mit den Markerplasmiden pDsRed2-ER, pDsRed-GT oder pDsRed-SI ko-transfiziert und 48 h nach Transfektion analysiert. Die YFP-Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 514 nm mit einem Argon-Laser. Bei der Ko-Lokalisationsstudie wurden Doppelfarbbilder von YFP und von dsRed gemacht, die bei 514 nm mit einem Argon-Laser und bei 543 nm mit einem Neon-Laser angeregt wurden.

Bei der Immunfluoreszenz wurde der Alexa488 Farbstoff mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt. Die aufgenommenen Daten wurden mit der Leica Confocal SoftwareTM ausgewertet.

¹ Die Ko-Lokalisationsstudie wurde freundlicherweise von Dr. Marwan Alfalah, Institut für Physiologische Chemie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, durchgeführt.

3.14 Allgemein verwendete Puffer

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

0,8%	NaCl
0,2%	KCl
8 mM	Na ₂ PO ₄
1,5 mM	K ₂ HPO ₄ , pH 7,4

Glycerin-Farbstoffpuffer zum Beladen von Agarosegelen

50 %	Glycerin
1 mM	EDTA, pH 8,0
0,1 %	Bromphenolblau

TBE-Laufpuffer 0,5x

45 mM	Trisborat
1 mM	EDTA

TBE-Laufpuffer-Stammlösung 5x

54 g	Tris-Base
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0

3.15 Allgemein verwendete Chemikalien und ihre Quellen

Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
APS	Fa. Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Fa. Serve Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Borsäure	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Coomassiebrillantblue	Fa. Serve Electrophoresis GmbH, Heidelberg
DOC	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
DTT	Fa. Merck, Darmstadt
EDTA	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Fa. Carl Roth, Karlsruhe

Glyzerin	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
KCl	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
K ₂ HPO ₄	Fa. Merck, Darmstadt
Methanol	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Na ₂ PO ₄	Fa. Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Fa. Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Fa. Sigma, München
Tween-20	Fa. Carl Roth, Karlsruhe