

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

4.1.1.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genetischer Marker	Herkunft
	F' mcrAΔ-(mrr hsdRMS-mcrBC) φ80dlacZ	
	ΔM15	Life-Technologies,
<i>E.coli</i> DH10β	ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara,leu)7697	Karlsruhe, Deutschland
	galUgalKλrpsL end A1 nupG	
<i>E.coli</i> XL1-Blue	RecA1 end A1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (tet ^r)]	Stratagene

4.1.1.2 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Genetischer Marker	Herkunft
COS1	African Green Monkey Kidney cells, SV40 transformiert	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig, Deutschland

HEK293	Human Embryonic Kidney cells, Adenovirus Typ 5 transformiert	ECACC, Salisbury, UK
--------	---	-------------------------

4.1.2 Chemikalien

Reagenz	Bezugsquelle
[¹²⁵ I]-konjugiertes anti-Kaninchen IgG (28-111 Bq/mmol)	Amersham, Braunschweig, Deutschland
10 Kilobasen DNA Leiter	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
10 Kilodalton Protein Leiter	Gibco, Deutschland
[³ H]Arginin Vasopressin (68,5 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland
ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Agar	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
AquaSave	Zinsser Analytic, Deutschland
Arginin Vasopressin	FMP, Berlin, Deutschland
Casein	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Coomassie Brilliantblau G250	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxide	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
DNase I, Rnase frei	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Endoglykosidase H	New England BioLabs Inc., UK

Ethanol, z.A.	J.T. Baker, Niederland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Expand™ High Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Fetales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
GeneClean® II Kit	BIO101, Inc., USA
Geneticin	Calbiochem, USA
Glücksklee® Magermilchpulver	Nestle Deutschland AG
Glutathion 4B	Pharmacia, Braunschweig, Deutschland
Glycerin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Glycin, freie Base	Calbiochem, USA
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
JETstar Plasmid Midiprep Kit	Genomed
Kanamycin (Kanamycin/A) Monosulfat	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Kaninchen anti-GFP-Antiserum	FMP, Berlin, Deutschland
Kaninchen anti-GST-GFP-Antiserum	Biogenes, Berlin, Deutschland
Lipofectamin™ Reagent	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectin™ Reagent	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Lumi-Light Western Blotting Substrat	Roche,
Monoklonaler Maus-anti-GFP-Antikörper	Clontech, USA
Natriumdodecylsulfat, reinst (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NeutrAvidin™ (immobilisiert)	Pierce, Rockford, IL, USA
Nitrozellulose (OPTITRAN BA-S 85)	Schleicher & Schüll
Oligonukleotide	Biotez, Berlin, Deutschland
Penicillin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Peptid-Endoglykosidase F	New England BioLabs,

Peptone 140	Schwalbach, Deutschland Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Peroxidase-konjugierter-Ziege-anti-Kaninchen-IgG	
Phenylmethylsulfonylfluorid	SIGMA, Diesenhofen, Deutschland
Poly-L-Lysine	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau S, reinst	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership
Protein A	Sigma, Diesenhofen, Deutschland
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QuickChange™ <i>in vitro</i> Mutagenese System	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Schwalbach, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford, IL, USA
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Seromed, Berlin, Deutschland
Trypsin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Trypsininhibitor Typ I-S, aus Sojabohnen	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Gibco, Merck, Roth, Serva, Sigma, Aldrich, Fluka, Perkin Elmer und KMF Laborchemie.

In dieser Arbeit wurde für die Experimente Wasser verwendet, das mit dem Milli-Q Plus Wasseraufbereitungssystem von organischen und ionischen Bestandteilen befreit wurde.

4.1.3 Desoxyribonukleinsäuren

4.1.3.1 Vektoren

Vektor	Resistenzen	Replikon	Herkunft
pcDNA1.Neo	Kn ^R	Co1E1, SV40, M13	Invitrogen
pcDNA3	Kn ^R , Ap ^R	Co1E1, Sv 40	Invitrogen
pEGFP			

4.1.3.2 Rekombinante Plasmide

Rekombinantes Plasmid ^{*1}	Vektor	Funktioneller Bereich	Herkunft
Plasmide für das eukaryontische Zell-Expressionssystem mit V2R-cDNA			
pRCDN2	pcDNA1.Neo	V2R, Kn ^R	Schülein, R. 1996
pF328T	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pS329A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pS330A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pS331A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pV332T	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pS333A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pS334A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335Q	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Hermsilla, R. 2000
pL336T	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pR337Q	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit

pS338A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Hermosilla, R. 2000
pE335Q/R65Q	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pR65Q	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335Q/H70E	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pH70E	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335R	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335R/R65E	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pR65E	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335R/H70E	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T/R64Q/R65H	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T/R64Q	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T/R65H	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pR64Q	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pR65H	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T/A60Y/R64Q	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pA60Y	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339K/A60D	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339K	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339K/A60D	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Hermosilla, R. 2000
pA60L	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339A/A60L	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
Plasmide für das eukaryontische Zell-Expressionssystem mit V2R-GFP-cDNA			
pEU367.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Hermosilla, R. 2000
pF328T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pS329A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-	Diese Arbeit

		Fusion, Kn ^R	
pS330A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pS331A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pV332T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pS333A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pS334A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL336T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pR337Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pS338A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335Q/R65Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pR65Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335Q/H70E.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pH70E.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335R.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335R/R65E.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit

pR65E.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pE335R/H70E.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T/R64Q/R65H.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T/R64Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T/R65H.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pR64Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pR65H.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339T/A60Y/R64Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pA60Y.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339K/A60D.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339K.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pA60D.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Hermosilla,R. 2000
pA60L.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pL339A/A60L.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.CT.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Hermosilla,R. 2000
p71.F328T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-	Diese Arbeit

		Fusion, Kn ^R	
p71.S329A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.S330A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.S331A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.V332T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.S333A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.S334A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.L336T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.R337Q.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
P71.S338A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.F/V/L36/L39/L40-T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.F/V/L36/L39/L40-A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.F/V/L36-T.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
p71.F/V/L36-A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP- Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit

*¹ Die Nummern der Plasmide entsprechen den ausgetauschten Aminosäuren.

4.1.3.3 Oligonukleotide⁺¹

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Template	Resultierende Plasmide
PF328T-for	GGATCTATGCATCTACC AGCAGCGTGTCC	pRCDN2 pEU367.GFP	p.F328T p.F328T.GFP
PF328T im p71-for	GGGATCTATCTACCAGC AGCAGCG	pEU71.CT.GFP	p71.F328T.GFP
PS329A-for	GGATCTATGCATCTTTC GCGAGCAGCGTGTCC	pRCDN2 pEU367.GFP	p.S329A p.S329A.GFP
PS329A im p71-for	GGGATCTATCTTTCGCG AGCAGCGTGTCC	pEU71.CT.GFP	p71.S329A.GFP
PS330A-for	GCATCTTTCAGCGCTAG CGTGTCCCTC	pRCDN2 pEU367.GFP pEU71.CT.GFP	p.S330A p.S330A.GFP
PS331A-for	GCATCTTTCAGCAGCGC TGTGTCCCTCAGAGC	pRCDN2 pEU367.GFP pEU71.CT.GFP	p.S331A p.S331A.GFP P
PV332T-for	CTTTCAGCAGCAGCACC TCCTCAGAGCTGC	pRCDN2 pEU367.GFP pEU71.CT.GFP	p.V332T p.V332T.GFP
PS333A-for	CAGCAGCAGCGTGGCT TCAGAGCTGCGAAGC	pRCDN2 pEU367.GFP pEU71.CT.GFP	p.S333A p.S333A.GFP
PS334A-for	GCAGCAGCGTGTCCGC GGAGCTGCGAAGC	pRCDN2 pEU367.GFP pEU71.CT.GFP	p.S334A p.S334A.GFP
PL336T-for	GCGTGTCCCTCAGAGAC GCGAAGCTTGCTCTGC	pRCDN2 pEU367.GFP pEU71.CT.GFP	p.L336T p.L336T.GFP p71.L336T.GFP
PS338A-for	CCTCAGAGCTGCGAGC	pRCDN2	p.S338A

	CTTGCTCTGCTGTGCC	pEU367.GFP pEU71.CT.GFP	p.S338A.GFP p71.S338A.GFP
PR337Q-for	GCGTGTCTCAGAGCTG CAAAGCTTGCTCTGCTG TGCCC	pEU367.GFP pEU71.CT.GFP	p.R337Q p.R337Q.GFP p71.R337Q.GFP
PR65Q-for	CGGCCCTAGCTCGGCA GGGCCGGCGGGGCC	pRCDN2 pEU367.GFP p.E335Q p.E335Q.GFP	p.R65Q p.R65Q.GFP
PH70E-for	CGGGGCCGGCGGGGCG AGTGGGCACCCATACA CG	pRCDN2 pEU367.GFP p.E335Q p.E335Q.GFP p.E335R p.E335R.GFP	p.H70E p.H70E.GFP
PQ335R-for	GCAGCAGCGTGTCTC ACGGCTGCGAAGCTTG CTCTGC	pRCDN2 pEU367.GFP	p.Q335R p.Q335R.GFP
PR64Q-for	GGCGGCCCTAGCTCAG CGGGGCCGGCGGG	pRCDN2 pEU367.GFP p.L339T p.L339T.GFP	p.R64Q p.R64Q.GFP
PR65H-for	CGGCCCTAGCTCGGCA CGGCCGGCGGGGCC	pRCDN2 pEU367.GFP p.L339T p.L339T.GFP	p.R65H p.R65H.GFP
PA60Y-for	GCAATGGCCTGGTGCT GTACGCCCTAGCTCGGC G	pRCDN2 pEU367.GFP p.L339T p.L339T.GFP	p.A60Y p.A60Y.GFP
PA60Y7 im R65Q-for	GCCGAGCTAGGGCGTA CAGCACCAGGCC	pRCDN2 pEU367.GFP p.L339T	p.A60Y/R65Q p.A60Y/R65Q.G FP

		p.L339T.GFP	
PA60D-for	GGCCTGGTGCTGGACG CCCTAGCTCGGCG	pRCDN2 pEU367.GFP p.L339K p.L339K.GFP	p.A60D.A60D.G FP
PL339K-for	CCTCAGAGCTGCGAAG CAAGCTCTGCTGTGCC GGG	pRCDN2 pEU367.GFP p.A60D p.A60D.GFP	p.L339K p.L339K.GFP
PA60L-for	GGCCTGGTGCTGCTGGC CCTAGCTCGG	pRCDN2 pEU367.GFP p.L339A p.L339A.GFP	p.A60L p.A60L.GFP
PF/V/L36-T- for	GGGATCTATCTACCAGC AGCAGCACGTCCTCAG AGACGCGAAGCTTGC	pEU71.CT.GFP p71.L39/L40-T. GFP	p71.F/V/L36/L3 9/L40-T.GFP p71.F/V/L36- T.GFP
PV/L36/L39/L 40-A-for	GCAGCAGCGCGTCCTC AGAGGCGCGAAGCGCG GCCTGCTGTGCC	pEU71.CT.GFP p71.F328A.GFP	p71.V/L36/L39/ L40-A.GFP p71.F/V/L36- A.GFP
PF/V/L36-A- for	GCAGCAGCGCGTCCTC AGAGGCGCGAAGCGCG GCCTGCTGTGCC	pEU71.CT.GFP	p71.F/V/L36- A.GFP

*1 Dargestellt sind nur die forward-Primer. Die entsprechenden reverse-Primer gehen selbstverständlich in die Mutagenesen mit ein.

4.1.4 Geräte

Laser Scanning Mikroskop	Zeiss LSM 410
Lumi-Imager F1 TM	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Mikrowelle	Siemens
Photometer	Pharmacia UV-visible Spectrophotometer
PCR-Maschinen	Perkin Elmer Thermocycler 9700 Biometra UNO-Thermoblock TM Biometra Trio-Thermoblock TM
pH-Meter	Hanna Instruments HI9321 Microprocessor pH Meter
Reinstwasseranlage	Typ MilliQ plus, Fa. Millipore, Eschborn
Roboter für Plasmidisolierung	QIAGEN Biorobot 9600
Rotoren	Beckman TLA-100.4 Festwinkelrotor Beckman 70.1 Ti Festwinkelrotor Sorwall SS34 Festwinkelrotor Beckman JA-14 Festwinkelrotor Beckman JA-25.50 Festwinkelrotor
Sequenzierer ABI 377 A	Perkin Elmer, Weiterstadt
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific innova TM 3240
Transilluminator	Herolab UVT-28MP
Ultraschaller	B. Braun 1000L, Labsonic
Videokamera	Herolab E.A.S.Y. 429K
Videodrucker	Mitsubishi Videocopy Processor
Waagen	Scaltel SBA52 Melter Toledo AG245
Zentrifugen	Beckman Optima TM TLX Ultrazentrifuge Beckman LE-70 Beckman TLK-100 Heraeus Biofuge 15 Heraeus Biofuge <i>pico</i> Sorval RC5C Plus (Dupont)

	Stratagene PicoFuge®
--	----------------------

Geräte in der Zellkultur

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

Geräte für Elektrophoresen und Transfertechniken

Blotkammern	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Elektrophoreseapparatur	Hoefler, Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekamme	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
Geltrockner	Hoefler, Freiburg, Deutschland
Horizontale Elektrophorese-Apparatur	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Spannungsgerät	Hoefler, Freiburg, Deutschland
Mikroliterspritze, Typ 710	Fa. Hamilton, Reno, USA

4.1.4.1 Rechner

Rechner	IBM kompatibler PC (CeCon)
Rechnerprogramme	Microsoft Windows 97, Clone Manager 2.0 für Windows, Microsoft Word für Windows 97 Version 7.0a [®] , Microsoft Excell für Windows 95 Version 7.0a [®] , Havard Graphics 4.0 für Windows 95, PowerPoint 3.0 für Windows 97, GraphPad PRISM [®] Version 2.01, RADLIG Version 4.0, MultiCalc Version 1.50, Corel Draw 8.0, ABI PRISM [™] Version 3.0, Sybyl Programmpaket TRIPOS Inc. ST. Louis, MO, USA, AMBER Version 4.1 und 4.5, LumiAnalyst 3.0 Zeiss,
Drucker	Hewlett-Packard LaserJet 5M Hewlett-Packard DeskJet 890C Hewlett-Packard Stylwriter Mac
Scanner	Hewlett-Packard ScanJET II CX

4.1.5 Medien

4.1.5.1 Flüssigmedien für *E.coli* und Medienzusätze

Sofern nichts anderes vermerkt ist, werden sowohl die Flüssigmedien als auch die Medien mit Agarzusatz 15 min bei 120 °C autoklaviert. Für das Gießen der Agarplatten werden pro Petrischale ca. 25 ml der auf 55 °C abgekühlten Flüssigkeit benötigt.

Luria Bertani (LB) - Medium (Typ Lennox)	Peptone 140	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
NZY+-Medium	für	Siehe LB-Medium

QuikChange™	Zugabe nach Autoklavieren:	
	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 M
	MgSO ₄ x 6 H ₂ O	1 M
	Glukose (steril filtriert)	2 M

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Agarplatten
Ampicillin	100 mg/ml H ₂ O	100 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml H ₂ O	30 µg/ml	30 µg/ml
IPTG	100 mM	-	0,1 mM
X-Gal	40 mg/ml DMFA	-	40 µg/ml

4.1.5.2 Flüssigmedien für eukaryontische Zelllinien und Medienzusätze

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	DMEM (pH 7,4) mit	90 % (v/v)
	Glukose (1g/l)	
	NaHCO ₃ (2g/l)	
	Nach Sterilfiltration Zugabe von FKS	10 % (v/v)

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration
Penicillin	10000 IE/ml	100 IE/ml
Streptomycin	10000 µg/ml	100 µg/ml

4.1.5.3 Agarplatten für Bakterienkultur

LB-Agarplatten	Peptone 140	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1 l
	Agar	12,5 g

4.2 METHODEN

Sofern keine Literatur angegeben ist, wurden die Methoden dem Handbuch von Sambrook (Sambrook et al., 1989) entnommen oder stellen eigene Entwicklungen dar.

4.2.1 Gerichtete Mutagenese

mit Hilfe des „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis„ Kit

Bei dieser Methode kann man mit einer doppelsträngigen Matrize direkt gerichtete Mutagenesen durchführen. Das Plasmid, in das die Mutation eingeführt werden soll, wird denaturiert und die Mutagenese-Oligonukleotide hybridisiert. Mit Hilfe der *Pfu-Turbo™* DNA-Polymerase werden unmethylierte, mutierte Stränge synthetisiert. Es entstehen Plasmide mit Einzelstrangbrüchen. Die methylierten, wildtypischen Matrizen-Stränge werden mit dem Enzym *DpnI* entfernt. Die mutierten Plasmide mit den Einzelstrangbrüchen werden in kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Die *E. coli* XL1-Blue Zellen können die Einzelstrangbrüche reparieren und die mutierten Plasmide replizieren.

Alle Reagenzien werden mit dem Kit geliefert.

<i>Pfu Turbo™</i> DNA-Polymerase	2,5 Einheiten/μl
10x Reaktionspuffer	100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 200 mM Tris-HCl (pH8,8), 20 mM MgSO ₄ , 1% Triton X-100®, 1 mg/ml BSA)
<i>DpnI</i> -Restriktionsendonuklease	10 Einheiten/μl
Kontroll-Oligonukleotid #1	34-mer 10 μM
Kontroll-Oligonukleotid #2	34-mer 10 μM
pWhitescript™ 4,5 kB Kontroll-Plasmid	5 ng/μl

dNTP Gemisch	20µM
Epicurian Coli [®] XL1-Blue kompetente Zellen	8x200µl
pUC18 Kontroll-Plasmid	0,1 ng/µl in TE-Puffer
NZY+-Medium für QuikChange [™]	s. 3.1.5

Durchführung:

1. Denaturierung, Bindung der Oligonukleotide und Auffüllreaktion:
2. Folgende Reagenzien werden in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben:

5 µl 10x Reaktionspuffer
 1 µl (50 ng) ds DNA (Matrize)
 2,5 µl (6,25 pmol) Mutagenese- Oligo #1
 2,5 µl (6,25 pmol) Mutagenese-Oligo #2
 1 µl dNTP Mix
 38 µl H₂O

Kontrolle: 2 µl (10 ng) pWhitescript[™] Kontroll-Plasmid (statt der DNA-Matrize)

1,25 µl (125 ng) der entsprechenden Kontroll-Oligonukleotide auffüllen mit H₂O auf 50 µl Endvolumen.

Zugabe von 1 µl (2,5 Einheiten) *Pfu Turbo*[™] DNA-Polymerase

3. PCR:
 - initiale Denaturierung 30 sec mit 95°C
 - 18 Zyklen:
 - 30 sec mit 95 °C
 - 1 min mit 55 °C
 - 20 min mit 68 °C (2 min pro 1 kb Plasmidlänge)
4. Verdau der Ausgangs-DNA-Stränge durch Zugabe von 1 µl *DpnI*, Inkubation: 2 Stunden bei 37 °C

5. Transformation der Epicurian Coli[®] XL1-Blue Zellen

1-5 µl der Ansätze werden mit 50 µl Zellen vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert

Transformationskontrolle: 1 µl (0,1 ng/µl) pUC18 als Kontrollplasmid.

Inkubation für 75 sec bei 42 °C, danach für 2 min auf Eis

Zugabe von 0,5 ml NZY+-Medium für QuikChange[™] (s. 3.1.5.1) und Inkubation im Schüttler bei 37 °C für 1 Stunde

6. Ausplattierung

Der Mutagenese-Ansatz wird auf einer LB-Agarplatte ausplattiert, die für den verwendeten Plasmidvektor selektiv ist.

Die Mutagenesekontrolle (250 µl) und die Transformationskontrolle (5 µl) werden auf LB-Agarplatten (mit X-Gal/IPTG und Ampicillin) (s. 3.1.5) ausplattiert.

Beim Ansatz der Mutagenese-Kontrolle sollten über 80% der Kolonien die Mutation enthalten (= blaue Kolonien). Bei der Transformationskontrolle sollten bis zu 250 Kolonien vorliegen von denen über 98% blau sind ($> 10^8$ koloniebildende Einheiten).

4.2.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit der Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei der PCR (polymerase chain reaction) ist die thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* (= Taq-Polymerase) entscheidend, da sie ihre Aktivität auch nach Erhitzen auf 95 °C beibehält. Für eine optimale Hybridisierung sollten die benötigten Oligonukleotide eine Sequenzlänge von 16-35 Bp haben und am 5'- und 3'-Ende ein Guanin- oder ein Cytosin-Nukleotid enthalten.

Reagenzien

DNA-Matritze	50 ng/μl
Oligonukleotide (5' und 3')	10 μM
dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 10 μM
10 x PCR-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,4), 125 mM KCl, 1,9 mM MgCl ₂
Taq-DNA-Polymerase	5 Einheiten/μl

Durchführung

1 μl DNA-Matritze
 1 μl Oligonukleotid 5'
 1 μl Oligonukleotid 3'
 1 μl dNTP's
 5 μl 10x PCR-Puffer
 0,125 μl Taq-DNA-Polymerase
 x μl H₂O (Endvolumen: 50 μl)

initiale Denaturierung 5 min bei 95 °C

25 PCR-Zyklen: Denaturieren der Doppelstränge bei 95 °C
 45 sec Hybridisierung bei 55 °C
 45 sec Synthese der DNA-Stränge bei 72 °C
 90 sec Inkubation bei 72 °C

Inkubation bei 72 °C 4 min als terminaler Schritt

4.2.3 Spezifische DNA-Spaltung durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Reagenzien

Stop-Puffer	0,2% (w/v) Bromphenolblau, 1 mM EDTA (pH 8,0), 50 % (w/v) Glycerin
-------------	---

RNase-Lösung	200 µg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl
Restriktionsendonuklease	
10x Reaktionspuffer	

Durchführung

Hinsichtlich der Reaktionsbedingungen werden die vom Hersteller geforderten Bedingungen eingehalten und die mit den Restriktionsenzymen gelieferten Puffer verwendet. Die erforderliche Menge Restriktionsendonuklease wird zu der gelösten DNA pipettiert. Zugabe des entsprechenden 10xReaktionspuffers und von 0,2 µg RNase. Es wird mit H₂O auf das gewünschten Endvolumens (meist 20 µl) aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die Reaktion wird mit 1/5 Volumen Stop-Puffer abgebrochen und auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen.

4.2.4 Ethanolfällung

Mit Hilfe dieser Methode können alle Nukleinsäuren gefällt werden.

Reagenzien

Ethanol p.a., Ethanol 70%, 3,3 M NaAc (pH 4,8)

Durchführung

Zu der in wässriger Lösung vorliegenden DNA oder RNA wird 1/9 Volumen 3,3 M NaAc-Lösung pH 4,8 und 2,5 Volumen EtOH p.a. gegeben.

Zentrifugation (20000 x g, 4 °C, 15 min).

Das DNA-Pellet wird in 70%igem Ethanol gewaschen.

Zentrifugation wie oben beschrieben und Trocknung der DNA nach der Entfernung des Überstands.

Lösen der DNA in einer entsprechenden Menge H₂O.

4.2.5 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Reagenzien

20 x TAE-Puffer	484,4 g Tris, 114 ml Essigsäure (100%), 37,2 g EDTA, ad 5 l H ₂ O, (pH 7,8)
Größenstandard	1 kBasenpaare (kbp) Leiter (Gibco)
Ethidiumbromid	10 mg Ethidiumbromid auf 1 ml H ₂ O

Durchführung

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wählt man unterschiedliche Agarosekonzentrationen (0,8-2% (w/v) des Gels. Die Agarose wird in 200 ml TAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Die auf ca. 50°C abgekühlte Lösung wird in eine horizontale Kammer gegossen und nach dem Erstarren mit TAE-Puffer überschichtet.

Die mit Stopppuffer versetzten Proben werden in die durch Kämme vorgeformten Taschen pipettiert. Die Trennung der DNA bei 80-120 V vom Minus- zum Pluspol. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 15 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die Auswertung erfolgt auf dem Transilluminator.

4.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe des Gene Clean Kits (Dianova)

Reagenzien

3M NaI, Glasmilch-Suspension, New-Wash Puffer (Alle Lösungen sind im Kit enthalten)

Durchführung

1. Ausschneiden der DNA-Bande bei 365nm UV-Licht aus dem TAE-Gel und Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß
2. Abwiegen des Agarosestückes und Zugabe der 3-fachen Menge ($\mu\text{l} \cong \text{mg}$) NaI-Lösung

3. Ansatz bei 50°C schütteln, bis sich Agarosestück aufgelöst hat
4. Zugabe von 5 µl Glasmilch, Inkubation 5 min auf Eis
5. Zentrifugation (2000 g, 20 Sekunden, RT)
6. Waschen des Glasmilch-Pellets 3x mit 400 µl New-Wash-Puffer
7. Resuspension des Glasmilch-Pellets in 25 µl H₂O
8. Elution 3 min bei 50 °C, kurzes Zentrifugieren und Überführen des Überstandes mit der gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß

4.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Reagenzien

10x Ligationspuffer	500mM Tris-HCl (pH 7.5), 100mM MgCl ₂ , 10 mM dATP, 100mM DTT, 25 µg/ml BSA
T4 DNA-Ligase	1 Einheit/µl

Durchführung

Für Ligationen ist es ausreichend, ein molares Vektor/Insert-Verhältnis von 1/2 bis 1/3 zu wählen, d.h. im Reaktionsansatz befinden sich dann 2x bzw. 3x mehr Insert- als Vektormoleküle.

Zugabe einer entsprechende Menge 10x Ligationspuffer sowie 1 µl T4 DNA-Ligase zur zu ligierenden DNA und füllt mit H₂O auf das gewünschte Endvolumen auf.

Inkubation 12-16 Stunden bei 16 °C

Transformation (siehe 3.2.8)

4.2.8 Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen und Transformation

Reagenzien zur Herstellung kompetenter Zellen

100mM CaCl₂, 100% Glycerin, LB-Medium (s. 4.1.5.1)

Durchführung

1. Beimpfen von 100 ml LB-Medium mit 1ml einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli* Stammes, Inkubation 37°C bis OD₅₉₀ 0,5
2. Zentrifugation der Suspension (7000 x g, 4°C, 20 min)
3. Resuspension mit 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung und Inkubation mindestens 30 min auf Eis
4. Erneute Zentrifugation, Aufnahme in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung
5. Die kompetenten Zellen können direkt für die Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 1 ml Glycerin als 200µl Aliquots bis zu einem Jahr bei -80 °C gelagert werden.

Reagenzien zur Transformation von *E. coli*

LB-Medium (s. 4.1.5.1)

Durchführung

1. 200µl frische oder aufgetaute kompetente Zellen werden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit 1-100 ng Plasmid-DNA versetzt
2. Inkubation mindestens 30 min 4°C
3. Hitzeschock für den Transformationsansatz 90 sec bei 42°C
4. Zugabe von 1ml LB-Medium und Inkubation 1h unter leichtem Schütteln bei 37°C
5. Ausplattieren von je 100µl des Transformationsansatzes auf selektive Agarplatten, die über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

4.2.9 Nukleinsäure-Isolierungsmethoden

4.2.9.1 Plasmidisolierung aus *E.coli* im kleinen Maßstab

Die DNA-Isolierung im kleinen Maßstab erfolgt mit Hilfe des Qiagen-Bioroboters 9600 nach dem Qiaprep Turbo-Protokoll.

4.2.9.2 Plasmidisolierung aus *E.coli* im großen Maßstab

mit Hilfe des JETstar Kits (Genomed)

Reagenzien

Puffer E1	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase A
Puffer E2	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
Puffer E3	3,2M Kaliumacetat (pH 5,5)
Puffer E4	600mM NaCl; 100mM NaAc (pH 5,0); 0,15% (w/v) TritonX100
Puffer E5	800 mM NaCl; 100mM NaAc (pH 5,0)
Puffer E6	1,25 M NaCl; 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)

Durchführung

1. Pelletierung der 100 ml Übernacht-Kultur bei 6000 x g, 10 min
2. Resuspension des Zellpellets in 4 ml E1-Puffer
3. Lysieren der Zellen mit 4 ml E2-Puffer, vorsichtig Schütteln, Inkubation 5 min RT
4. Neutralisation mit 4 ml E3-Puffer, vorsichtig Mischen, Inkubation 5 min RT
5. Zentrifugation der Proteine und Zelltrümmer (20000g, 10 min, RT)
6. Lysat wird über äquilibrierte (10 ml E4-Puffer) JETstar-Säule gegeben

7. Säule wird 2 x mit 10 ml E5-Puffer gewaschen
8. Elution der DNA mit 5 ml E6-Puffer
9. DNA-Fällung mit 0,7 Volumen (3,5 ml) Isopropanol, 5 min RT, Zentrifugation (22000 x g, 30 min 4°C)
10. Pellet wird mit 10 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet
11. Resuspension in 500 µl H₂O

4.2.10 DNA Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgt durch Absorptionsmessung bei 260 nm. Die Konzentration wird mit dem Absorptionskoeffizienten (50) berechnet. Für die Reinheitsbestimmung wird die DNA bei 280 nm gemessen und so Verunreinigungen wie Proteine erfasst. Der Quotient OD₂₆₀/280 gibt den Reinheitsgrad an. Der Wert sollte zwischen 1.6-2.0 liegen.

4.2.11 DNA-Sequenzierung nach der Dideoxymethode

Reagenzien

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit: Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye)	ddATP-/ddCTP-/ddGTP-/ddTTP-Dye Terminator, dITP, dATP, dTTP, dCTP, Tris-HCl (pH 9,0), MgCl ₂ , Thermostabile Pyrophosphatase, AmpliTaq DNA-Polymerase, FS
10x TBE-Laufpuffer	108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,32 g EDTA, ad 1 l → pH 8,3H ₂ O
Polyacrylamid-Gel (6%)	22,5 g Harnstoff, 4,5 ml 10x TBE, 6,75 ml Acrylamid/ N, N-

	Methylenbisacrylamid (37,5%/2,5% (w/v)), 150 µl APS-Lösung, ad 45 ml H ₂ O
Sonstiges:	50 mM EDTA (pH 8,0), Formamid deion., Ethanol z.A., Ethanol 70% (v/v), 3M NaAc (pH 4,6), APS-Lösung 10% (w/v)

Durchführung

Zyklische Sequenzierungsreaktion:

Big Dye-Reaction-Mix	1,5 µl
DNA (500 ng/µl)	1 µl
Oligonukleotide (4 µM)	1 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Beim Thermocycler wird folgendes Programm eingestellt (35 Zyklen):

Denaturierung	96 °C, 16 Sekunden
Bindung	52 °C, 16 Sekunden
Extension	60 °C, 4 min

Nach Beendigung der Reaktion werden zur Reinigung der Proben je 2 µl 3 M NaAc (pH 4,6) und 50 µl Ethanol zugegeben. Der Ansatz wird zentrifugiert (15000 x g, RT, 30 min), das DNA-Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und bei 37 °C getrocknet.

Die Proben werden mit 4,5 µl 50 mM EDTA (pH 8,0)/deionisiertem Formamid (im Verhältnis 1/50) resuspendiert und direkt auf das Gel aufgetragen (Geldicke: 0,3 mm). Der Gellauf erfolgt mit TBE-Laufpuffer mit Hilfe des automatischem Sequenzierers ABI 377 A (Perkin Elmer) bei 40 W (1200-1500 V).

4.2.12 Säugerzellkultur

4.2.12.1 Kultivierung von Säugerzellen

Reagenzien

500x Penicillin/Streptomycin	100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Wachstumsmedium	90% (v/v) DMEM (pH 7,4), 10% (v/v) FKS, 1% (w/v) 500x Penicillin /Streptomycin
PBS	80 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05% (w/v)Trypsin, 0,02% (w/v) EDTA, ad 100 ml PBS

Durchführung

COS1- und HEK 293-Zellen werden in Zellkulturmedium mit Penicillin/Streptomycin in Zellkulturschalen in einem H₂O-gesättigten 5 %-CO₂/95 %-Luftgemisch bei 37 °C kultiviert. Die Zelllinien werden bei Konfluenz je nach Bedarf 1:5-1:15 gesplittet. Zweimal in der Woche wird das Medium partiell gewechselt.

Aussaat

Zellen in Zellkulturmedium (37 °C) aufnehmen.

Nach Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer werden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät (5 x 10⁵ Zellen/60er Schale; 1x 10⁵ Zellen/35er Schale; 0,5x 10⁵ Zellen/Well bei einer 24-Well-Platte).

Die Inkubation erfolgt über Nacht im CO₂-begasteten Brutschrank bei 37 °C.

4.2.12.2 Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Säugerzellen

Reagenzien

Einfriermedium 10 % (v/v) DMSO in Wachstumsmedium

Durchführung

1. Die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Zellen werden mit PBS (3 ml, 37 °C) gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37 °C) ca. 5 min bei 37 ° inkubiert
2. Nach Abrundung der Zellen wird die Trypsin/EDTA Lösung zu 80% abgesaugt und die Zellen werden weitere 10 min bei 37 °C inkubiert.
3. Danach werden die Zellen vom Boden abgeklopft, gesammelt und abzentrifugiert (1000 x g, 10 min, Raumtemperatur).
4. Resuspension in 3 ml Einfriermedium
5. Portionieren zu 1 ml in Kryoröhrchen
6. Inkubation 30 min bei 4°C
7. Überführen der Kryoröhrchen in einen –80°C Gefrierschrank
8. Nach dem Einfrieren werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Nach zügigem Auftauen bei 37°C werden die Zellen:

sofort mit 2 ml Wachstumsmedium mit 20%FKS versetzt und abzentrifugiert (1000 x g, 10 min, Raumtemperatur), resuspendiert in Wachstumsmedium und auf Zellkulturschalen ausgesät.

Nach 12 h erfolgt der erste vollständige Mediumwechsel.

4.2.13 Transiente Transfektion von COS1- und HEK 293-Zellen

COS 1-Zellen exprimieren konstitutiv das SV40 T-Antigen.

HEK 293-Zellen exprimieren konstitutiv das humane Adenovirus Typ 5 DNA-Gen.

Die transiente Transfektion der Zellen mit Plasmiden erfolgt mit Hilfe von kationischen Lipiden (Lipofectin™, Lipofectamin™). Diese binden an die negativ geladene DNA und können als Liposomen-Nukleinsäure-Komplex mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren

Reagenzien

Lipofectin™, Lipofectamin™

Durchführung

Transiente Transfektion erfolgt mit Lipofectin™ oder Lipofectamin™

Einen Tag nach der Aussaat werden die Zellen transient mit Plasmid-DNA transfiziert.

Transfektionsansatz

Schale	DNA (Konzentration > 0,1 µg/µl)	Lipofectin™
60er (21 cm ²)	3,5 µg in 250 µl Medium	26,25 µl in 250 µl Medium
35er (9 cm ²)	1 µg in 100 µl Medium	7,5 µl in 100 µl Medium
24-Well-Platte (je 2 cm ²)	0,25 µg in 25 µl Medium (je well)	1,875 µl in 25 µl Medium

1. DNA und das Lipofectin™ werden im Medium ohne FKS und Antibiotikum verdünnt.
2. Beide Ansätze werden gemischt und für mindestens 20 min bei RT inkubiert.
3. Zugabe von serumfreiem Medium (2 ml/60er Schale; 800 µl/35er Schale; 250 µl/well in 24-well-Platten).
4. Waschen der Zellen zwei Mal mit Serum- und Antibiotika-freiem Medium und Überschichtung mit dem Transfektionsansatz

5. Inkubation über Nacht im CO₂-begasteten Brutschrank bei 37 °C (ca. 18 Stunden)
6. Nach der Transfektion wird das serumfreie Medium durch Medium mit 10% FKS und Antibiotika ersetzt (60er Schale = 5 ml, 35er Schale = 2 ml, 24er well = 1 ml/well). Die Zellen werden zwei Tage im CO₂-begasteten Brutschrank inkubiert.

Die Transfektion mit Lipofectamin™ erfolgt wie bei Lipofectin™. Das Transfektionsgemisch verbleibt allerdings nur 6 Stunden auf den Zellen. Mit Lipofectamin™ wurden HEK 293-Zellen transfiziert. Diese Zellen können schon 24 Stunden nach der Transfektion für den Folgeversuch verwendet werden.

4.2.14 Membran-Präparation von eukaryontischen Zellen und Proteinbestimmung

Reagenzien für die Membranpräparation

PBS	siehe 4.2.12.1
PMSF-Lösung	40 mM (in Ethanol z. A.)
Proteaseinhibitoren-Gemisch	100 mM Benzamidin, 2 µg/ml Trypsininhibitor, 1 µg/ml Aprotinin
PBSI	10 ml PBS, 125 µl PMSF-Lösung, 80 µl Proteaseinhibitoren-Gemisch
DNase (RNase frei)	10 Einheiten/µl

Durchführung

1. Waschen (3x) der Zellen mit eiskaltem PBS und Abschaben mit 1 ml PBSI
2. Lysieren 2 x 2sec mit dem Ultraschallgerät
3. Trennung membrangebunder von löslichen Proteinen durch Ultrazentrifugation (100000 x g, 4 °C, 1 Stunde).
4. Überstand verwerfen, Membranpellet in 1 ml PBSI resuspendieren und erneut zentrifugieren (100000 x g, 4 °C, 1 Stunde)
5. Resuspension des Pellets in 50 – 100 µl PBSI

6. Zum Verdau der DNA in den Proben werden zu 200 µl Membranpräparation 2 µl DNase gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Reagenzien für die Proteinbestimmung

Coomassie-Proteinreagenz Brillantblau G250-Lösung (CBB)	100 mg/l CBB, 4,25% (v/v) Ethanol 95 Vol.%, 8,5% (v/v)H ₃ PO ₄ 85%
Ovalbumin	0,1 mg/ml und 1 mg/ml
NaOH	2 N
H ₂ O	

Durchführung

Aufnahme einer Eichkurve mit bekannten Ovalbuminkonzentrationen aufgenommen (0, 1, 2, 5, 10, 20 und 40 µg in 50 µl H₂O). Je 5 µl der Proteinprobe werden mit 45 µl H₂O verdünnt.

Zugabe von 50 µl NaOH-Lösung, Inkubation 10 min bei 60 °C

Zugabe von 1 ml CBB und Messen der Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer

4.2.15. Bestimmung der Rezeptorzahl an intakten Zellen

Scatchard Analyse

Bei dieser Methode wird mit Hilfe von AVP und [³H]AVP Anzahl (B_{MAX}) und Affinität (K_D) der V2-Rezeptoren gemessen, die sich an der Zelloberfläche befinden.

Reagenzien

Waschpuffer (DPBS)	0,133 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0,1 g/l MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0,2 g/l KCl, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 8 g/l NaCl, 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ , ad 1 l H ₂ O, pH 7,4
Bindungspuffer	0,195 - 100 nM [³ H]AVP (68,5 Ci/mmol) in

	DPBS
Verdrängungspuffer	entsprechender Bindungspuffer + 1 μ M AVP in DPBS
Lysis-Puffer	0,1 N NaOH
Aquasafe 300 Plus	Szintillator

Durchführung

Zur Erstellung einer Sättigungskurve wird der Ligand im Bindungspuffer in einer Konzentration zwischen 0,195 und 100 nM mit immer sich verdoppelnden [3 H]AVP-Konzentrationen eingesetzt.

Die spezifische Bindung berechnet sich aus der Differenz der gemessenen totalen und nicht-spezifischen Bindung.

1. Aussaat und Transfektion der Zellen in 24-well Platten (siehe 4.2.13), Bindungsversuch 48 Stunden nach Transfektion
2. Waschen der Zellen mit eiskaltem Waschpuffer (2 ml) bei 4°C
3. Bestimmung der totalen Bindung durch Zugabe von 450 μ l Bindungspuffer der entsprechenden Verdünnung [3 H]AVP in jedes well
4. Bestimmung der unspezifischen Bindung durch Zugabe von 450 μ l Verdrängungspuffer der entsprechenden Verdünnung in jedes well
5. Inkubation 2 Stunden bei 4 °C
6. Waschen der Zellen 3x mit Waschpuffer (je 2 ml)
7. Lyse der Zellen mit 500 μ l Lysis-Puffer
8. Überführen des Lysates in ein 5 ml Szintillationsgefäß und vermischen mit 4 ml Aquasafe 300 Plus
9. Auswertung der Proben mit Hilfe eines β -Counters.

Zur korrekten Bestimmung der Rezeptorzahl pro Zelle sowie der Rezeptorzahl pro mg Protein wurde von jedem Bindungsversuch aus zwei wells Zellzahl (siehe 4.2.12.1) und aus zwei wells die Proteinmenge (siehe 4.2.14) ermittelt.

Zur korrekten Bestimmung der eingesetzten Aktivität wurden aus jedem Bindungspufferansatz 45 μ l entnommen, mit 4 ml Szintillator gemischt und im β -Counter gemessen

Berechnung der K_D

Die gemessenen Zerfälle pro Minute (dpm) werden in das RADLIG Programm eingegeben. Die K_D -Werte werden durch eine iterative, nicht lineare Regression berechnet.

4.2.16 Mikroskopie an lebenden Zellen

Für diese Studien werden transient transfizierte HEK 293-Zellen verwendet, die GFP-Fusionsproteine exprimieren.

Die Zellen werden auf Deckgläser (\varnothing 33 mm) ausgesät (s. 4.2.12.1) und transient mit Lipofectamin™ oder Lipofektin™ transfiziert (s. 4.2.13). Je nach Zelldichte werden die Zellen nach 1 oder 2 Tagen für den Versuch verwendet.

Das Deckglas wird 2x mit PBS gewaschen, in einer selbst gebauten Kammer eingespannt und mit 1 ml PBS bedeckt. Die GFP(Green Fluoreszenz Protein)-Fluoreszenzen werden dann bei einer λ_{exc} = 488 nm und $\lambda_{em} \geq 515$ nm mit dem Laser scanning Mikroskop (LSM) untersucht. Es werden sowohl x/y-Scans als auch z-Scans aufgenommen.

4.2.16.1 Rhodamin-Färbung

Mit Hilfe von Rhodamin 6G und dessen Eigenfluoreszenz kann man das endoplasmatische Retikulum intakter Zellen lokalisieren.

Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenzsignale wird unter dem Mikroskop Rhodamin 6G in einer Verdünnung 1:1000 zu den Zellen pipettiert. Die Rhodaminfluoreszenz wird nach ca. 10 min Inkubation (λ_{exc} = 543 nm, $\lambda_{em} \geq 690$ nm) aufgenommen.

4.2.17 Nachweis der Transportfähigkeit des Rezeptors über Biotinylierung

Mit Hilfe der Biotinylierung und anschließender spezifischer Immunpräzipitation über die Rezeptor-GFP-Fusionsproteine kann man die Rezeptoren nachweisen, die an die Zelloberfläche transportiert wurden.

Reagenzien

PBS-CM	PBS (siehe...), 1mM MgCl ₂ , 0,1 mM CaCl ₂
Sulfo-NHS-Biotin TM	1 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin in PBS-CM
Ammoniumchlorid	50 mM NH ₄ Cl
Puffer A	50 mM Tris-HCL pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM Na ₂ -EDTA pH 8, 0,1 % Triton-X-100, 0,1 % SDS
Immobilized NeutrAvidin TM	100 µl Neutravidin-Sepharose
Waschpuffer 1	50 mM Tris-HCL pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM Na ₂ -EDTA pH 8, 0,5 % Triton-X-100, 0,1 % SDS
Waschpuffer 2	50 mM Tris-HCL pH 8, 0, 1 mM Na ₂ -EDTA, pH 8, 0,5 % Triton-X-100, 0,1 % SDS
Lämmli-Puffer	siehe 4.2.20.1

Durchführung

1. Waschen der mit transient transfizierten HEK293-Zellen konfluent bewachsenen 60er Schale (s. 4.2.13) 3 x mit je 3 ml eiskaltem PBS-CM
2. Zugabe von 1,5 ml Sulfo-NHS-Biotin Lösung, Inkubation 30 min, 4°C schütteln
3. zum Abstoppen der Reaktion Zugabe von 1 ml 50 mM NH₄CL, Schütteln 10 min 4°C
4. Schalen 3 x waschen mit PBS-CM
5. Zugabe von 1 ml PufferA, Inkubation schüttelnd 1 Stunde 4°C
6. Überstand mit gelösten und lysierten Zellen in ein Eppi überführen, Abnahme von 10 µl für Proteinbestimmung (siehe 4.2.14)
7. Reinigung des Überstandes durch Zentrifugieren bei 20 min, 47.000 x g, 4°C

8. zum Überstand Zugabe von 100 µl immobilisiertem NeutrAvidin™, Inkubation rotierend 1,5 - 2 Stunden bei 4°C
9. Zentrifugation 3 min 16.500 x g
10. Waschen der Sepharose 3 x mit Waschpuffer 1 und 1 x mit Waschpuffer 2
11. Sepharose-Pellet in 50-60 µl Lämmli lösen, Inkubation 5 min bei 95 °C
12. Zentrifugation 16.500 x g 5 min
13. Überstand mit Hamilton-Spritze abnehmen und elektrophoretisch auftrennen

4.2.18 Analyse des Glykosylierungsstatus von Membranproteinen

Um den Glykosylierungsstatus der Proteine zu bestimmen, werden Endoglykosidase H (*EndoH*) und Peptid-Endoglykosidase F (*PNGaseF*) eingesetzt. *EndoH* entfernt nur mannosereiche-Glykosylierungen, die bei im ER oder frühen Golgi-Apparat lokalisierten Proteinen zu finden sind. *PNGaseF* hingegen kann sowohl mannosereiche- als auch komplexe Glykosylierungen abspalten; letztere liegen erst nach Durchlauf durch den späten Golgi-Apparat vor und stellen kein Substrat für *EndoH* dar.

4.2.18.1 Verdau der mannosereichen Glykosylierung mit *EndoH*

Reagenzien

10x Denaturierungspuffer	5% (w/v) SDS, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol
10x G5-Puffer	0,5 M Na-Citrat (pH 5,5)
<i>EndoH</i>	1000 Einheiten/µl
H ₂ O	

Durchführung

Entnahme von 30,6 µl der Membranfraktion einer 60er Schale, die nach Zellfraktionierung (s. 4.2.14) in ≥ 100 µl H₂O aufgenommen wurde
Zugabe von 4,05 µl H₂O sowie 3,85 µl 10x Denaturierungspuffer

Denaturieren 10 min bei 95 °C

Abkühlung auf RT, Zugabe von 4,5 µl G5-Puffer und 2 µl *EndoH*

Inkubation mindestens 1 Stunde bei 37 °C

4.2.18.2 Verdau der komplexen Glykosylierung mit *PNGaseF*

Reagenzien

10x Denaturierungspuffer	(s. 3.2.15.2.1)
NP-40	10% (w/v)
10x G7-Puffer	0,5 M Na ₂ PO ₄ (pH 7,5)
<i>PNGaseF</i>	500 Einheiten/µl

Durchführung

Entnahme von 30,6 µl der Membranfraktion einer 60er Schale, die nach Zellfraktionierung (s. 4.2.14) in ≥ 100 µl H₂O aufgenommen wurde

Zugabe von 3,4 µl 10x Denaturierungspuffer

Denaturieren 10 min bei 95 °C

Abkühlung auf RT, Zugabe von 4,5 µl NP-40, 4,5 µl G7-Puffer und 2 µl *PNGaseF*

Inkubation mindestens 1 Stunde bei 37 °C

4.2.19 Nachweis der Fusionsproteine

4.2.19.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (=PAGE) (LAEMMLI ET AL., 1970) wird in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt.

Reagenzien

4x Laemmli-Probenpuffer	2 ml Glycerin, 1,5 ml 10% SDS (w/v), 1 ml
-------------------------	---

	2M Tris-HCl (pH 6,8), 375 µl 2-Mercaptoethanol, 5 mg Bromphenolblau
Rotiphorese® Gel 30	gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 30%ige Acrylamid-stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid
Trenngelpuffer	0,75 M Tris-HCl (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	0,625 M Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Lösung	20% (w/v) SDS
TEMED	unverdünnt
Ammoniumpersulfat-Lösung	10 % w/v
Laufpuffer	3 g Tris, 14,4 g Glyzin, 1 g SDS ad 1 l, (pH 8,3-8,4)
<u>Trenngel</u>	3,75 ml Acrylamidstammlösung, 5,625 ml Trenngelpuffer, 56,5 µl SDS-Lösung, 5,65 µl TEMED, H ₂ O 1,75 ml, 79 µl APS-Lösung

Durchführung

Die einzelnen Komponenten werden vermischt und das Gel sofort gegossen. Um einen glatten Oberflächenrand des Trenngels zu bekommen, wird es mit 70%igem Isopropanol beschichtet. Das Isopropanol wird nach Polymerisierung des Trenngels unmittelbar vor dem Gießen des Sammelgels vollständig entfernt.

<u>Sammelgel</u>	835 µl Acrylamidstammlösung, 625 µl Sammelgelpuffer, 25 µl SDS-Lösung, 5 µl TEMED, 3,5 ml H ₂ O, 25 µl APS-Lösung
------------------	--

Die einzelnen Komponenten des Sammelgels werden in dieser Reihenfolge gemischt. Die fertige Lösung wird sofort auf das polymerisierte Trenngel gegossen und der Kamm für die entsprechenden Geltaschen eingefügt.

Die mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben (z.B. Membranfraktionen) werden 5 min bei 95 °C gekocht, kurz abzentrifugiert und mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen pipettiert.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der „High Molecular Weight“-Größenstandard (10 kDa Protein Ladder) verwendet.

Elektrophorese: 20 mA/Gel bis Front ausgelaufen ist (ca. 1½ Stunden)

4.2.19.2 Proteintransfer auf die Nitrozellulose (Tankblotten)

Reagenzien

Blotpuffer	2,4 g Tris, 11,26 g Glyzin, 200 ml Methanol, 750 µl SDS-Lösung, ad 1 l H ₂ O, pH 8,3
Ponceau-Rot-Färbelösung	0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) Essigsäure
TBS	6,05 g Tris, 8,76 g NaCl, 0,1 g NaN ₃ , ad 1 l H ₂ O, pH 7,2

Durchführung

Der Aufbau des Blotsandwich erfolgt von der Anoden- zur Kathodenseite wie folgt:

Anodenseite (weiß)
Schaumstoff
Whatman-Filterpapier
Nitrozellulose
Gel
Whatman-Filterpapier
Schaumstoff
Kathodenseite (schwarz)

Der Transfer erfolgt mit 1,7 mA/cm² für ca. 1½ Stunden bei 4 °C.

Um alle Proteinbanden nach dem Blotten sichtbar zu machen, wird die Nitrozellulose in Ponceau-Rot-Färbelösung geschüttelt. Die Markerproteine werden

auf der Nitrozellulose mit einem weichen Bleistift gekennzeichnet. Danach wird die Nitrozellulose in TBS entfärbt.

4.2.19.3 Antigen-Antikörperreaktionen

4.2.19.3.1 Immunoblot mit Peroxidase-konjugiertem IgG

Reagenzien

Blotto	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,15 mM NaCl, 1% (w/v) Triton X-100 [®]
Blotto (mit MP)	5% (w/v)Milchpulver in Blotto
Tris-Waschlösung	10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
Färbelösung 1 + 2	Lumi-Light Western Blotting Substrat

Durchführung

Der entfärbte Filter wird im Folgenden bei Raumtemperatur und unter Schütteln inkubiert.

Blocken mindestens 1 Stunde in Blotto (mit MP)

1.AK: monoklonaler anti-GFP Antikörper (1:5000), polyklonales anti-GST-GFP-Antiserum (1:1000) oder polyklonales anti-GFP-Antiserum (1:15000) mindestens 1 Stunde in Blotto (mit MP)

Waschen 3 x 15 min mit Blotto

2.AK: Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:5000) mindestens 1 Stunde in Blotto (mit MP)

Waschen 3 x 10 min mit Blotto (mit MP), 2 x 10 min mit Blotto, 1x 5 min mit Tris-Waschlösung

Färben: Je 2 ml aus der Färbelösung 1 + 2 auf die Nitrozellulose geben und für 2 min bei RT inkubieren; Auswertung erfolgt im Lumi-Imager.

4.2.19.3.2 Immunoblot mit [¹²⁵I]-markiertem IgG

Reagenzien

10x TNA	24,2 g Tris-HCl, 180 g NaCl, ad 2 l H ₂ O, pH 10 mM Glutathion-Elutionspuffer 7,2
Blockpuffer	1x TNA, 1% (w/v) Casein, 1% (w/v) Gelatine
TNA + NP40	1x TNA, 0,05% (w/v) NP40

Durchführung

Der entfärbte Filter wird im Folgenden bei Raumtemperatur und unter Schütteln inkubiert.

Blocken mindestens 2 Stunde in Blockpuffer

1.AK: polyklonales Kaninchen anti-GFP-Antiserum (1:15000) mindestens 2 Stunden in Blockpuffer

Waschen 3 x 10 min mit 1 x TNA

2.AK: [¹²⁵I]-markiertes Esel-anti-Kaninchen IgG (2 µCi pro Schale) (1:5000) mindestens 2 Stunden in Blockpuffer

Waschen 2 x 5 min mit TNA, 1x 10 min mit TNA+NP40

Exponieren: Nach dem Trocknen wird auf die Nitrozellulose ein X-OMAT-Röntgenfilm (Kodak) aufgelegt. Die Exposition erfolgt je nach Signalstärke zwischen 1-5 Tagen.

4.2.20 Herstellung eines anti-GST-GFP-Antiserums zur spezifischen Präzipitation und Detektion des GFP-markierten V2-Rezeptors

Reagenzien

Triton X 100	20%
Glutathion-Sepharose 4B	Pharmacia
Glutathion-Elutionspuffer	Pharmacia

Um die biochemische Detektion der GFP markierten V2-Rezeptoren zu ermöglichen, wurde ein spezifisches Antiserum gegen GFP hergestellt. Als Antigen wurde ein in Bakterien (BL21) exprimiertes GST-GFP-Fusionsprotein gewählt. Das Gen für GST-GFP wurde per EcoRI/NotI-Schnittstelle in den pGEX - Expressionsvektor kloniert (siehe 4.2.2; 4.3.3.; 4.2.5. und 4.2.7.). Das Plasmid wurde in Bakterien des BL21-Stammes transformiert (siehe 4.2.8.). Eine 200 ml Übernacht-Kultur wurde 1:10 in frischem, vorgewärmtem Medium (siehe 4.1.5.1.) verdünnt. Nach 2h bei 37°C wurden die Zellen mit 1mM IPTG (siehe 4.1.5.1.) induziert. Nach weiteren 2h bei 37 °C wurden die Zellen bei 7700 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 ml kaltem PBS-I (siehe 4.2.14.) aufgenommen und die Zellen resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall lysiert. Die Suspension wurde mit 20%igem Triton X 100 auf eine Endkonzentration von 1% gebracht und 30 min bei 4 °C geschüttelt. Anschließend wurde bei 12.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit dem gelösten GST-GFP-Fusionsprotein wird zu 10 ml vorbereiteter Glutathion-Sepharose 4B gegeben.

Die Glutathion-Sepharose 4B wird folgendermaßen vorbereitet: Das 1,3-fache Volumen, also 13 ml gelöste Glutathion-Sepharose 4B, wird zweimal mit 100 ml kaltem PBS-I und bei 500 x g zentrifugiert und gewaschen und die Sepharose in 10 ml kaltem PBS-I aufgenommen.

Das Lysat mit der Glutathion-Sepharose 4B wurde für 1h bei RT im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde das Inkubat dreimal mit je 100 ml PBS und bei 500 x g gewaschen.

Das an die Glutathion-Sepharose immobilisierte GST-GFP wird mit Glutathion-Elutionspuffer eluiert. Hierzu wird das gewaschene Pellet mit 50 ml versetzt, vorsichtig geschüttelt und für 10 min bei RT inkubiert. Das Inkubat wird für 5 min bei RT und 500 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Diese Elution wird insgesamt dreimal durchgeführt und die Eluate zusammengeführt. Das Eluat wird über Nacht im Vakuum-Trockner auf ca. 1 ml konzentriert. Mit dem Eluat wird nach Bradford eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe 4.2.15.1.) und eine Probe des Eluats und des konzentrierten Eluats per SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel Coomassie gefärbt.

Das Eluat mit 1ml Volumen und einem Proteingehalt von 5 mg total wurde lyophilisiert und der Firma BIOGENES gesendet. Diese immunisierten zwei Kaninchen für 6 Wochen mit dem hergestellten Antigen. Das gewonnene

Antiserum wurde im ELISA auf seinen anti-GFP-IgG Gehalt getestet. Der Titer beider Seren lag über 1:200.000 (siehe Protokoll der Firma BIOGENES). Die Seren wurden parallel mit dem Präimmunserum auf ihre Spezifität gegenüber dem V2R-GFP im Western-Blot und in der Immunpräzipitation getestet (Siehe Ergebnisteil: 5.1.).