

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

<u>Stoffbezeichnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP), Di-Natrium-Salz	Sigma, Deisenhofen
Agarose, biotechnologische Qualität	ICN, Costa Mesa, CA, USA
Agarose, niedrig schmelzend: Metaphor	Cambrex, Baltimore, MD, USA
Aluminiumoxid WN-3, neutrale Tonerde	Sigma, Deisenhofen
Aluminiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (Tris-Base)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin, Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Chemilumineszenz-Reagenz Supersignal West Dura	Pierce, Rockford, IL, USA
Choleratoxin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	ICN, Costa Mesa, CA, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Dowex AG50 WX4	Biorad, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethylenglykol-bis-2-aminoethyl-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EGTA)	Serva, Heidelberg
Forskolin	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
FuGENE 6	Roche Applied Science, Mannheim
Glucagon	Sigma, Deisenhofen
Glutamin	Biochrom, Berlin

Grace's Insektenzellmedium	Sigma, Deisenhofen
Guanosin-5'-O-(3-thio)-triphosphat (GTP γ S)	Sigma, Deisenhofen
Guanosindiphosphat (GDP)	Sigma, Deisenhofen
Guanosintriphosphat (GTP)	Sigma, Deisenhofen
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Imidazol	Sigma, Deisenhofen
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma, Deisenhofen
(\pm)-Isoprenalin	Sigma, Deisenhofen
Lipid-Mediumsupplement	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Molekulargewichtsstandard „Prestained Protein Molecular Weight Marker“	Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
o-Phenylendiamin (OPD) „Sigma Fast“	Sigma, Deisenhofen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin
Phosphoenolpyruvat, Kaliumsalz	Boehringer Mannheim, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Polyfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
Pyruvatkinase	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
RNase A	Sigma, Deisenhofen
Ro 20-1724	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Roti-Block	Roth, Karlsruhe
Roti-Nanoquant	Roth, Karlsruhe
Secretin	Sigma, Deisenhofen
Sf-900-II-SFM	Invitrogen, Karlsruhe
Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 500 PLUS	Zinsser Analytic, Frankfurt
Taq-Polymerase	Gibco BRL, Karlsruhe

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
TMN-FH-Insektenzellmedium	Pan Biotech, Aidenbach
TMN-FH 1,5X	Sigma, Deisenhofen
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
[Arg ⁸]Vasopressin (AVP)	Calbiochem, La Jolla, CA, USA

3.1.2 Antikörper, immunogene Peptide und Kopplungsreagenzien

<u>Antikörperbeschreibung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Kaninchen Anti-G $\alpha_{s/olf}$ IgG SC-383	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
immunogenes Peptid SC-383P	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
Ziege Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	Sigma, Deisenhofen
Protein-A-Sepharose	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA

3.1.3 Radioaktiv markierte Substanzen

<u>Substanz</u>	<u>Bezugsquelle</u>
[2,8- ³ H]Adenin (20-40 Ci/mmol)	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
[α - ³² P]ATP (800 Ci/mmol)	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
[2,8- ³ H]cAMP (25-40 Ci/mmol)	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
[³⁵ S]GTP γ S (1250 Ci/mmol)	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
[³⁵ S] Protein Labeling Mix EXPRE ³⁵ S ³⁵ S (1175 Ci/mmol)	Perkin Elmer, Boston, MA, USA

3.1.4 Oligodeoxynukleotide

3.1.4.1 PCR-Primer

Die Primer wurden von Sigma-ARK (Steinheim) und Qiagen Operon (Hilden) synthetisiert und im entschützten und entsalzten Zustand geliefert. In der folgenden Tabelle sind die mit den Primern in das Amplifikationsprodukt eingeführten Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen fett hervorgehoben.

Name	Sequenz	Restriktionsenzym
Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von G α S-L2-cDNA (vgl. Abschnitt 3.2.1.1.1) (unterstrichen dargestellt ist die Kozak-Sequenz [Kozak 1987])		
P1	5'- GCG GCC <u>GCC</u> CGC CAT GGG CTG CCT CGG CAA CAG-3'	<i>NotI</i>
P2	5'- AAG CTT TTA GAG CAG CTC GTA TTG GCG GA-3'	<i>HindIII</i>
PCR von kodierenden Sequenzen für eine interne Ribosomenbindungsstelle und das Grün Fluoreszierende Protein (vgl. Abschnitt 3.2.1.1.1)		
P3	5'- ACT AGT GCC CCT CTC CCT CCC CCC-3'	<i>SpeI</i>
P4	5'- GTC GAC CTC GAG TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC-3'	<i>SallI, XhoI</i>
PCR von Glucagon-Rezeptor-cDNA (vgl. Abschnitt 3.2.1.2.1)		
P5	5'- GAG CTC CCA ACC TCT GCC AGA TGT GG-3'	<i>SacI</i>
P6	5'- GCG GCC GCG CCC TTT CTG AAT CCA ACT TG-3'	<i>NotI</i>
PCR von kodierenden Sequenzen für eine interne Ribosomenbindungsstelle (vgl. Abschnitt 3.2.1.2.1)		
P7	5'- GCG GCC GCG CCC CTC TCC CTC CCC C-3'	<i>NotI</i>
P8	5'- GAA TTC TGT GGC CAT ATT ATC ATC GTG-3'	<i>EcoRI</i>
PCR der cDNA des β_2 -adrenergen Rezeptors (vgl. Abschnitt 3.2.1.2.1)		
P9	5'- GAA TTC CCT GCT CGT CTG CCA GCG ATG-3'	<i>EcoRI</i>
P10	5'- CTC GAG GTC CTG TCA GGG AGG GGT C-3'	<i>XhoI</i>
PCR der cDNA von <i>firefly</i> -Luziferase (vgl. Abschnitt 4.1.1.2)		
P11	5'- GAA TTC CAC AAA TCG TCG TAT GCA-3'	<i>EcoRI</i>
P12	5'- AAG CTT AAT TCA CGT TCA TTA TAA ATG TC-3'	<i>HindIII</i>

3.1.4.2 Oligodeoxynukleotide zur Transfektion in Säugierzellen

Die Oligodeoxynukleotide, die zur Transfektion in Zellen genutzt wurden, wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) in HPLC-gereinigter Qualität bezogen. Alle Konstrukte trugen Phosphorthioat-Bindungen zwischen den drei terminalen Nukleotiden.

Bezeichnung	Sequenz	Spezifität
Kontrolle	TTG TTG CGT CTC TAG CTA TGG	keine
ODN1	TGC ATA CGA CGA TTC TGT GA	<i>firefly</i> -Luziferase ^b
ODN1.propin ^a	<u>UGC</u> <u>AUA</u> <u>CGA</u> <u>CGA</u> <u>UUC</u> <u>UGU</u> GA	<i>firefly</i> -Luziferase ^b
ODN2	AAC AAA CAC TAC GGT AGG CT	<i>firefly</i> -Luziferase ^b
ODN2.propin ^a	<u>AAC</u> <u>AAA</u> <u>CAC</u> <u>UAC</u> <u>GGU</u> <u>AGG</u> <u>CU</u>	<i>firefly</i> -Luziferase ^b
G α_s .propin ^a	<u>CAU</u> <u>CUG</u> <u>CUU</u> <u>CAC</u> AAU GGU GCU – <u>UUU</u> <u>GCC</u> AGA <u>C</u>	G α_s

^a Alle Cytosin und Uracil wurden mit C₅-propin-Modifikation synthetisiert (unterstrichen)

^b *firefly*-Luziferase, NCBI-Referenznummer X65323

Eine katalytisch aktive DNA (DNAzym, Abschnitt 4.1.1.2) wurde bei konstantem katalytischen Bereich (fett hervorgehoben) mit unterschiedlich langen hybridisierenden Sequenzen eingesetzt. Nicht namentlich bezeichnete DNAzyme wurden über die Länge der hybridisierenden Bereiche zugeordnet (Abbildung 13).

Name	Sequenz	Hybridlänge ^a
	CATACGAGGCTAGCTACAACGAGATTCTGT	7/8
DZ1	TGCATACGAGGCTAGCTACAACGAGATTCTGTGA	9/10
	ACTGCATACGAGGCTAGCTACAACGAGATTCTGTGATT	11/12
	TCACTGCATACGAGGCTAGCTACAACGAGATTCTGTGATTTG	13/14
	TTTCACTGCATACGAGGCTAGCTACAACGAGATTCTGTGATTTGTA	15/16
DZ2	AACAAACACTAGGCTAGCTACAACGAGGTAGGCT	11/8

Kontrollkonstrukt ohne katalytische Aktivität (variiertes Bereich unterstrichen)

Mutante	TCACTGCATACGAC <u>GAGCTCTAGGA</u> ACCAGATTCTGTGATTTG	13/14
---------	--	-------

^a Hybrid: Länge der mit *firefly*-Luziferase-mRNA hybridisierenden Anteile, NCBI-Referenznummer X65323

3.1.4.3 Oligodeoxynukleotide zur Ligation in pSUPER

Mit dem Plasmid pSUPER (Oligoengine, Seattle, WA, USA) können siRNA in lebenden Zellen erzeugt werden [Brummelkamp 2002]. Die unten angegebenen Primer wurden von Qiagen Operon (Hilden) bezogen. Sie wurden phosphoryliert und nach hybridisiert (Firmenprotokoll Oligoengine). Das so erhaltene Fragment wurde in den mit *Bg*III und *Hind*III verdauten und über ein Agarose-Gel gereinigten pSUPER ligiert.

siRNA gegen *firefly*-Luziferase:

sense: GAT CCC CCA CAG AAT CGT CGT ATG CAT TCA AGA GAT –
GCA TAC GAC GAT TCT GTG TTT TTG GAA A

antisense: AGC TTT TCC AAA AAC ACA GAA TCG TCG TAT GCA TCT –
CTT GAA TGC ATA CGA CGA TTC TGT GGG G

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung

Bezugsquelle

Mikrotiterplatten Nunc Immobilizer Amino, 96 Vertiefungen	Nunc A/S, Dänemark
Karton für <i>Western Blot</i> (2 mm Dicke)	Whatman, Maidstone, UK
Nitrozellulosefilter 0,45 µm Porengröße, Ø 25 mm, Typ CN	Advanced Microdevices, Ambala Cantt, Indien
Nitrozellulosemembranen Protran (0,45 µm)	Schleicher&Schuell, Dassel
Plasmid-Isolierung Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

3.1.6 Geräte

Gerät

Hersteller

Elektrophoresesysteme 7,5 x 4 cm ² , Dicke 0,75 mm, 15 Laufspuren 6 x 15 cm ² , Dicke 0,75 mm, 28 Laufspuren	Biorad, München Eigenbau Charité, Berlin
Elektroporationssystem Biorad Genepulser II mit Capacitance Extender Plus	Biorad, München
Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500	Berthold, Bad Wildbach
Isotopen-Dokumentationssystem Fuji BAS 1500 mit Bildplatte BASIII	Fuji Photo Film, Köln
Lumineszenz-Dokumentationssystem Fuji LAS 1000	Fuji Photo Film, Köln
Luminometer Lumacounter M 2080	Berthold, Bad Wildbach
Mikroinjektionssystem 5171 mit FemtoJet	Eppendorf, Hamburg

Mikroskop Axiovert	Zeiss, Oberkochen
Objektiv F-Fluar 40/1,3	Zeiss, Oberkochen
Polychrome II Monochromator	TILL Photonics, Gräfelfing
Dichroischer Spiegel <460, 505-525 nm	Chroma, Brattleboro, VT, USA
Bandpassfilter 460-500, 505-525 nm	Chroma, Brattleboro, VT, USA
Filterwechsler Lambda 10/2	Sutter, Novato, CA, USA
peltiergekühlte CCD-Kamera IMAGO	TILL Photonics, Gräfelfing
Platten-Spektrophotometer	Titertek, Huntsville, AL, USA
Multiskan MCC/340	
Sequenziergerät ABI Prism 377	Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA
Stickstoff-Dekompressionskammer	Parr Instrument Company, Moline, IL, USA
Ultraschallgenerator	Danbury, CT, USA
Branson Sonifier Cell Disruptor B15P mit Spitze für 1,5-ml-Reaktionsgefäße	
Western Blot System	Biorad, München

3.1.7 Lösungen und Puffer

HEG	20 mM HEPES (titriert mit NaOH zu pH 7,20); 5 mM EDTA; 10 mM D-Glucose; 118 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 1 mM MgCl ₂ ; steril filtriert
Elektroporationspuffer	DMEM 4,5 g/l Glucose; 10 % (v/v) FCS; 5 mM <i>N,N</i> -bis-(2- hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
Lysispuffer	20 mM HEPES (titriert mit NaOH zu pH 8,0); 5 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 150 mM NaCl
Membranpuffer	16 mM HEPES (titriert mit NaOH zu pH 8,0); 1 mM EDTA; 57 g/l Sucrose
Probenpuffer 4fach	150 mM Tris-HCl pH 6,8; 30 % (v/v) Glycerol; 2,9 % (w/v) SDS; 0,024 % (w/v) Bromphenolblau; 80 mM DTT
Laufpuffer	25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
Sammelgel	5% Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 37,5:1); Tris-HCl 95 mM pH 6,8; 0,15 % SDS; 0,1 % TEMED; 0,06 % APS

Trenngel	11% Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 37,5:1); Tris-HCl 500 mM pH 8,6; 0,1 % SDS; 0,01 % TEMED; 0,05 % APS
Transferpuffer	6,05 g Tris-Base; 28,8 g Glycin; 400 ml Methanol; ad 2 l H ₂ O
PBS-T	PBS; 1 % (v/v) Tween-20
ELISA-Waschpuffer	PBS; 0,5 % (v/v) Tween-20
HMED	20 mM HEPES (titriert mit NaOH zu pH 7,8); MgCl ₂ 2 mM; EDTA 1 mM; 2 mM DTT
Start-Mix	125 mM HEPES (titriert mit NaOH zu pH 8,0); 250 μM cAMP; 250 μM Ro 20-1724; 1,5 mM EDTA; 250 μg/ml BSA; 7,5 mM Phosphoenolpyruvat (Di-Kalium-Salz); 0,5 mM ATP (Di-Natrium-Salz); 25 mM MgCl ₂ ; 25 μg/ml Pyruvatkinase
SDS-Stopp-Lösung	2,5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat; 50 mM ATP (Di-Natrium-Salz); 1,75 mM cAMP
Imidazol-Lösung	20 mM Imidazol; 200 mM NaCl; pH 7,5
Akkumulationsmedium	Kulturmedium je nach Zelllinie, jedoch ohne Serumzusatz; 50 mM HEPES (titriert mit NaOH zu pH 7,40); 500 μM IBMX
Mikroakkumulationsmedium	PBS; 100 μM IBMX
TCA-Stopp-Lösung	5 % (v/v) Trichloressigsäure; 1 mM ATP (Di-Natrium-Salz); 1 mM cAMP in H ₂ O
HMEN	20 mM HEPES (titriert mit NaOH zu pH 8,0); MgCl ₂ 2 mM; EDTA 1 mM; 100 mM NaCl
GTPγS-Mix	50 mM HEPES (titriert mit NaOH zu pH 8,0); MgCl ₂ 10 mM; EDTA 1 mM; 100 mM NaCl; 100 μM GDP; 1 nM [³⁵ S]GTPγS (1250 Ci/mmol)
Filterwaschpuffer	20 mM Tris-Base pH 8,0; 25 mM MgCl ₂ ; 100 mM NaCl; dieser Puffer wurde kalt (4 °C) verwendet
RIPA-Puffer	25 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton 100; 0,5 % (w/v) SDS
IP-Waschpuffer A	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 % (v/v) Triton 100; 0,1 % (w/v) SDS

IP-Waschpuffer B	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,5 % (v/v) Triton 100; 0,1 % (w/v) SDS
Puffer DNazym-optimal	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM MgCl ₂ ; 150 mM NaCl; 0,01 % (w/v) SDS
Puffer Simuliert physiologisch	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM MgCl ₂ ; 150 mM KCl

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

Weit verbreitete molekularbiologische Methoden wie der Verdau von DNA durch Restriktionsenzyme, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Ligation wurden bei der Anfertigung dieser Arbeit verwendet. Ihre Durchführung ist detailliert im Buch „Molecular Cloning“ [Sambrock 2001] beschrieben, ihre Einbettung in Klonierungsstrategien wird im Folgenden dargelegt.

3.2.1.1 Klonierung von G α _S-Spleißvarianten kodierenden Plasmiden

Ziel für die Klonierung der Spleißvarianten war es, die für G α _S kodierenden cDNA-Stücke aus bakteriellen Expressionsvektoren in ein Plasmid zu überführen, von dem ausgehend Säugerzellen G α _S exprimieren können. Als Zielvektor wurde das pExchanger-System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) gewählt, bei dem das eingefügte Gen unter Kontrolle eines Zytomegalie-Viruspromotors steht. Um bei der G α _S-Expression in Säugerzellen die Transfektionseffizienz abschätzen zu können, sollte das Zielplasmid für eine bicistronische mRNA kodieren. Die Bildung bicistronischer mRNA steht unter Kontrolle einzigen Promotors. Die mRNA trägt zwei Leserahmen und eine dazwischen liegende *internal ribosom entry site* (IRES), so dass zwei Proteine translatiert werden [Jang 1990]. Im zu klonierenden Plasmid stand an erster Stelle nach dem Promotor die kodierende Sequenz für die G α _S-Spleißvariante, gefolgt von der IRES und der Sequenz für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP). Dadurch konnten anhand der GFP-Expression Klone selektiert werden, die ebenfalls G α _S exprimieren.

Die Klonierung der Plasmide für die vier Spleißvarianten erfolgte in zwei Stufen. Zuerst wurde die Spleißvariante G α _S-L2 mit der IRES-Sequenz und GFP in einem Zwischenvektor

vereinigt und in den Zielvektor kloniert. Anschließend wurden Plasmide, die für alle weiteren Spleißvarianten ($G\alpha_S$ -L1, S3, S4) kodierten, durch Austausch des 5'-Anteils der $G\alpha_S$ -cDNA im L2-Plasmid gegen den entsprechenden 5'-Anteil der Spleißvarianten-kodierenden cDNA erzeugt.

3.2.1.1.1 $G\alpha_S$ -L2-kodierendes Plasmid

Die für die Spleißvariante $G\alpha_S$ -L2 der Maus kodierende cDNA stammt aus einem bakteriellen Expressionvektor (pQE60), der von Kathrin Klass (Charité, Berlin) hergestellt wurde. Die Sequenz der cDNA entspricht weitgehend der von Datensatznummer BC062654 in der NCBI-Datenbank^a.

Eine Übersicht der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 5 angegeben. Durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Primern P1 und P2 wurde der $G\alpha_S$ -L2-Leserahmen amplifiziert. Mit dem Primer P1 wurden 5' eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *NotI* und eine Kozak-Sequenz angefügt ([Kozak 1987], Sequenz vgl. Abschnitt 3.1.4.1). Die PCR wurde mit einer *Taq*-Polymerase durchgeführt. Dieses Enzym fügt nach dem Ende der Matrize am 3'-Ende der neu synthetisierten DNA-Stränge ein Deoxyadenosin hinzu, das nicht im von der Matrize kodiert wird. Durch diesen ungepaarten „Überhang“ kann das Amplifikationsprodukt effizient in ein mit entsprechenden ungepaarten 3'-Thymidinresten versehenes, linearisiertes Plasmid ligiert werden [Mead 1991]. Das Amplifikationsprodukt wurde in das vorbereitete Plasmid (pGEM-TEasy, Promega, Madison, WI, USA) ligiert und wird nachfolgend als TEasy-L2 bezeichnet.

Die Sequenzen, die IRES und eine Variante des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) kodieren, wurden durch PCR mit den Primern P3 und P4 aus dem Vektor pIRES2-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA) amplifiziert. Mit den Primern wurden 5' bzw. 3' Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *SpeI* bzw. *XhoI* und *SalI* angefügt. Das Amplifikationsprodukt wurde ebenfalls in pGEM-TEasy (TEasy-IRES2-EGFP) ligiert.

^a Unter der PubMed-Referenz BC062654 ist eine Spleißvariante L1 hinterlegt. Sie unterscheidet von L2 sich neben dem Fehlen des Serin-kodierenden Codons AGT (ab Base 258 nach dem Start-Codon) in weiteren 6 Basen, von denen 2 zu Änderungen auf Aminosäureebene führen. Die veränderten Aminosäuren sind: Val256→Gly und Gly329→Val (Nummerierung entsprechend L1-Variante).

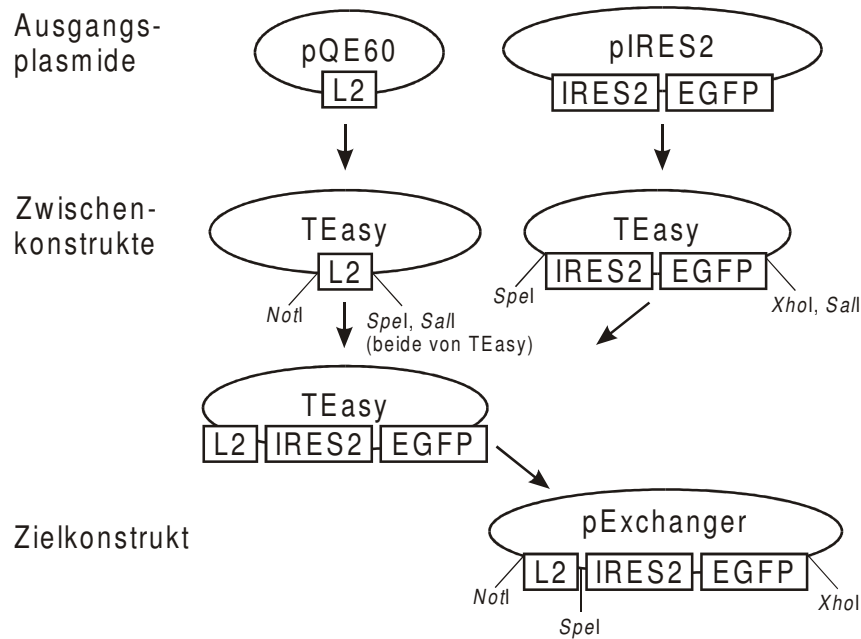


Abbildung 5: Klonierung eines Plasmids, mit Hilfe dessen Säugerzellen $G\alpha_s$ -L2 exprimieren können. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit wurden Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen nur nach ihrer Einführung und im Zielkonstrukt angezeigt. Weitere Details sind im Text angegeben.

Beide rekombinanten Zwischenkonstrukte (TEasy-L2, TEasy-IRES-EGFP) wurden in Bakterien (*E.coli*, Stamm BL21, Stratagene, La Jolla, CA, USA) amplifiziert und daraus isoliert. Die kodierende Sequenz wurde aus dem Zwischenkonstrukt TEasy-IRES2-EGFP durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *SalI* herausgeschnitten, gereinigt und in das mit den Enzymen *SpeI* und *SalI* geöffnete Plasmid TEasy-L2 ligiert. Das Ligationsprodukt (TEasy-L2-IRES2-EGFP) wurde erneut in Bakterien amplifiziert und daraus isoliert, anschließend wurden die vereinigten kodierenden Sequenzen durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XhoI* herausgeschnitten, isoliert und in den mit den gleichen Enzymen geöffneten Vektor pExchange-Core1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) ligiert.

3.2.1.1.2 $G\alpha_s$ -L1-, -S3- und -S4-kodierende Plasmide

Zur Erzeugung von Plasmiden, die für alle weiteren Spleißvarianten kodieren, wurde aus dem Plasmid $G\alpha_s$ -L2 der 5'-Bereich der $G\alpha_s$ -kodierenden Sequenz mit den Restriktionsenzymen *AccI* und *EcoRI* herausgeschnitten. Beide Erkennungsstellen sind in der $G\alpha_s$ -kodierenden cDNA bereits vorhanden und liegen vor bzw. nach den cDNA-Abschnitten, die sich zwischen den Spleißvarianten unterscheiden. Aus bakteriellen Expressionsvektoren (Kathrin Klass, Charité, Berlin), die kodierende Sequenzen der Spleißvarianten $G\alpha_s$ -L1,

S3 und S4 enthielten, wurden mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, die zwischen den Spleißvarianten differierenden Bereiche isoliert und in den zuvor geöffneten Vektor ligiert. Alle Plasmide wurden in Bakterien amplifiziert und anschließend daraus isoliert. Abbildung 6 zeigt ein Agarose-Gel zur Beurteilung der Reinheit der Plasmidpräparationen. Die bearbeiteten Schnittstellen und die mittels PCR amplifizierten Sequenzen aller vier Konstrukte wurden durch Sequenzierung nach Sanger *et al.* überprüft [Sanger 1977].

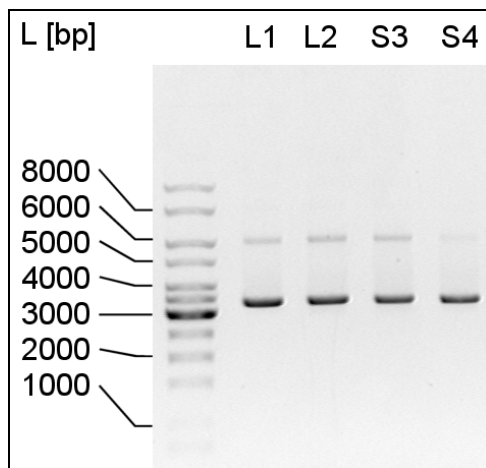


Abbildung 6: Kontrolle der Reinheit der Spleißvarianten-kodierenden Plasmide. Jeweils 500 ng Plasmid entsprechend der spektrometrischen Quantifizierung [Sambrock 2001] wurden in einem 0,5 % (w/v) Agarose-Gel getrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Größen der Plasmide betragen je nach Spleißvariante 6008-6056 Basenpaare. Spurenbezeichnung: L Fragmentgrößen-Standard; L1...S4 Plasmide der $G\alpha_s$ -Spleißvarianten

3.2.1.2 Rezeptor-kodierende Plasmide zur Expression in Säugerzellen

Im Laufe der Arbeit wurden verschiedene heptahelikale Rezeptoren exprimiert. Ihre Herkunft und durchgeführte Klonierungen werden im Folgenden beschrieben.

3.2.1.2.1 Klonierung eines Plasmids zur Expression des Glucagon- und β_2 -adrenergen Rezeptors in Säugerzellen

Für die Experimente sollten Säugerzelllinien generiert werden, die Glucagon- und β_2 -adrenergen Rezeptor stabil exprimieren. Um beide Rezeptoren mit der Transfektion eines einzigen Plasmids stabil ins Genom der Zellen zu integrieren, wurden die Rezeptor-kodierenden Sequenzen auf einem Plasmid vor bzw. nach eine Ribosomenbindungsstelle (IRES, Erläuterungen im Abschnitt 3.2.1.1) kloniert.

Eine Übersicht der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 7 angegeben. Die cDNA des Glucagon-Rezeptors wurde durch PCR mit den Primern P5 und P6 aus dem Plasmid GlucR/pCDNA3 (Ursprungsorganismus: Ratte; Quelle: M. Waelbroeck, Brüssel, Belgien) amplifiziert. Durch PCR mit den Primern P7 und P8 wurde die Sequenz für eine IRES aus dem Plasmid pIRES2-EGFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA) amplifiziert. Die cDNA des β_2 -adrenergen Rezeptors wurde mit den Primern P9 und P10 aus dem Plasmid

β 2AR/pCDNA1 (Ursprungsorganismus: Hamster; Quelle: T. Schöneberg, Leipzig) amplifiziert. Alle Amplifikate wurden isoliert und in pGEM-TEasy (Promega, Madison, WI, USA) ligiert.

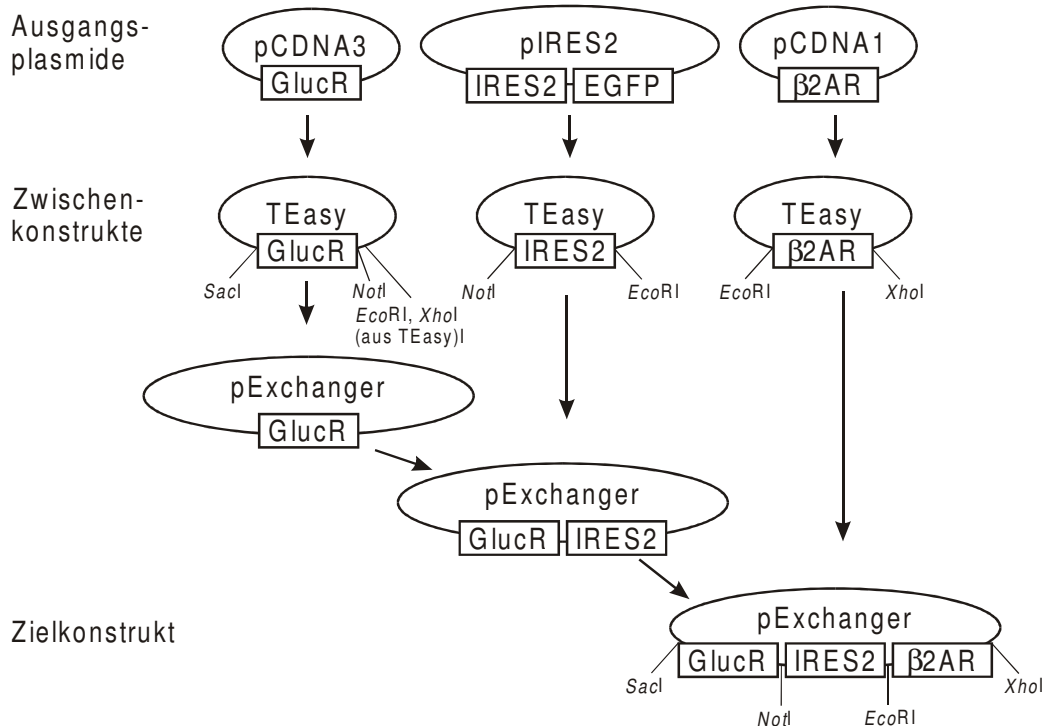


Abbildung 7: Klonierung eines Plasmids, mit dem Säugerzellen den Glucagon- und β 2-adrenergen Rezeptor exprimieren können. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit wurden Erkennungsstellen von Restriktionsenzymen nur nach ihrer Einführung und im Zielkonstrukt angegeben. Weitere Details siehe Text.

Die Glucagon-Rezeptor-kodierende Sequenz wurde durch Verdau mit *SacI* und *NotI* aus dem pGEM-TEasy-Konstrukt herausgeschnitten, isoliert und in einen entsprechend geöffneten pExchange-Core1 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) ligiert. Dieser Vektor wurde durch Verdau mit *NotI* und *EcoRI* 3' der Sequenz des Glucagon-Rezeptors erneut geöffnet, und das mit den gleichen Restriktionsenzymen ausgeschnittene Fragment der IRES-Sequenz aus dem pGEM-TEasy-Konstrukt an dieser Stelle hineinligiert. Der Vektor wurde wiederum 3' der IRES-kodierenden Sequenz mit *EcoRI* und *XhoI* geöffnet und mit dem durch die gleichen Enzyme ausgeschnittene Fragment des β 2-adrenergen Rezeptors aus dem pGEM-TEasy-Konstrukt ligiert.

Die bearbeiteten Schnittstellen und alle mittels PCR amplifizierten Sequenzen wurden durch Sequenzierung nach der Methode von Sanger überprüft [Sanger 1977].

3.2.1.2.2 Weitere Rezeptor-kodierende Plasmide

Für weitere Rezeptoren kodierende Plasmide wurden von folgenden Quellen bezogen:

cDNA	Spezies	Vektor	Quelle
Secretin-Rezeptor	Mensch	pCDNA3	M. Waelbroeck (Brüssel, Belgien)
Histamin-H ₂ -Rezeptor	Ratte	pCMV	C. Harteneck (Berlin)
V2-Vasopressin-Rezeptor	Mensch	pCDps	T. Schöneberg (Leipzig)
[Schulz 1999]			
LH-Rezeptor	Mensch	pCDNA3	T. Schöneberg (Leipzig)
[Sangkuhl 2002]			

Die von diesen Plasmiden kodierenden Proteine wurden von Säugerzellen exprimiert, die Expression stand jeweils unter Kontrolle des Promotors des Zytomegalie-Virus.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten wurden unter Beachtung zellbiologischer Arbeitsgrundsätze in Laboratorien der Klassifikation „S1“ und unter Beachtung der gesetzlichen Bestimmungen durchgeführt. Hier nicht beschriebene Standardmethoden, wie Subkultivierung und Auftauen von tiefgefrorenen Säugerzellproben können im ausführlichen Standardwerk von Lindl [Lindl 2002] nachgeschlagen werden. Individuell angepasste Methoden werden im Folgenden beschrieben.

3.2.2.1 Heterologe Expression in der Insektenzelllinie Sf9

Zur Untersuchung der Interaktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und heterotrimeren G-Proteinen wurden Zellen der Linie *Spodoptera frugiperda* (Sf9) genutzt. Sf9 ist eine klonale Linie aus dem Ovar der Puppe des *fall army worm* [Vaughn 1977] und erlaubt im Gegensatz zur Expression in *E.coli* die co- und posttranslationale Prozessierung vieler Proteine und deren korrekte Lokalisation, z. B. von membranständigen Proteinen [Bouvier 1998]. Gegenüber anderen eukaryotischen Systemen zeigen Sf9-Zellen meist eine hohe Expressionsrate und können leicht in großen Mengen kultiviert werden.

Der Virus *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV, Familie *Baculoviridae*) infiziert Sf9-Zellen. Anstelle des viralen Polyhedrin-Genes können Fremdgene in das Genom von AcNPV integriert und in Sf9-Zellen exprimiert werden.

3.2.2.1.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen können adhärent oder in Suspension kultiviert werden. Die Zellen wurden in Grace's oder TMN-FH-Insektenzellmedium ohne zusätzliche Begasung bei 27 °C propagiert. Suspensionskulturen enthielten zusätzlich 1 % (v/v) Lipid-Mediumsupplement

und wurden bei einer Zelldichte zwischen $0,5-2,5 \cdot 10^6/\text{ml}$ gehalten. Die Suspensionskulturen wurden bei 90 Umdrehungen pro Minute in Erlenmeyerkolben geschüttelt. Durch Befüllung der Kolben zu mindestens 30 aber maximal 50% des Nominalvolumens wurde sichergestellt, dass die Suspension effektiv durchmischt wurde, ohne Scherstress auf die Zellen auszuüben.

3.2.2.1.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Zur Herstellung rekombinanter Baculoviren wurde das System Bac-to-Bac (GibcoBRL, inzwischen Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die Methode basiert auf der positionsspezifischen Transposition einer DNA-Sequenz aus einem Transfervektor (pFastBac) in das Baculovirusgenom (Bacmid). Die Transposition findet in einem modifizierten *E.coli*-Stamm (DH10Bac) statt, der neben dem Bacmid ein für eine Rekombinase kodierendes Plasmid trägt. Anschließend wird das Bacmid aus den Bakterien isoliert; es trägt alle zur Virus-Entstehung nötigen Informationen sowie das inklonierte Fremdgen. Dieses wird von den Viren unter der Kontrolle des Polyhedrin-Promotors exprimiert und ersetzt das virale Protein, welches nicht zur Virusgenerierung essentiell ist, jedoch in der Natur die Überlebensfähigkeit des Virus im sterbenden Wirtsorganismus sichert.

Die in Abschnitt 3.2.1.1 beschriebenen Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *HindIII* verdaut, die Spleißvarianten-kodierenden Fragmente isoliert und in den entsprechend verdauten pFastBac ligiert. Durch die Klonierung in diesen Vektor wird eine unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors stehende cDNA des Enzyms β -Galaktosidase unterbrochen, so dass erfolgreich ligierte Klone durch Blau/Weiß-Selektion identifiziert werden können. Um die Färbung der Klone zu verstärken, wurden sie 24 Stunden nach der Transformation auf frische Substratplatten übertragen und erneut für 24 Stunden inkubiert. Klone, die in diesem zweiten Durchlauf weiß blieben, wurden in 2 ml LB-Medium überführt und für 16-18 Stunden wachsen gelassen. Anschließend wurde das rekombinierte Bacmid isoliert und durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Für die Transfektion des Bacmides in Sf9-Zellen wurden ca. $0,9 \cdot 10^6$ Zellen in eine 35-mm-Schale ausgesetzt und mindestens 30 Minuten stehen gelassen, um die Zellen adhären zu lassen. Ein Viertel des gereinigten Bacmids wurden in 100 μl Sf-900-II-SFM-Medium verdünnt. In einem weiteren Gefäß wurden 6 μl liposomales Transfektionsreagenz (Cellfectin, Invitrogen, Karlsruhe) ebenfalls in Sf-900-II-SFM-Medium verdünnt. Die Lösungen wurden gemischt und 15-45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde

das Medium über den Zellen abgenommen, die Zellen einmal mit Sf-900-II-SFM gespült und mit der Bacmid-Liposomen-Mixtur überschichtet. Die Zellen wurden für 5 Stunden bei 27 °C inkubiert, danach wurde das Medium gegen Kulturmedium ausgetauscht. Die Lyse der Zellen setzte nach 72 Stunden ein, nach 4-5 Tagen wurde der Überstand mit den darin enthaltenen Baculoviren abgenommen und durch Zentrifugation ($3000 \times g$, 10 min) von Zelltrümmern gereinigt. Die Viren im Überstand wurden wie im folgenden Abschnitt beschrieben amplifiziert, jedoch betrug das eingesetzte Überstandsvolumen $1/100$ der Suspensionskultur.

Die Baculoviren, welche $G\alpha_s$ -Spleißvarianten exprimieren, wurden Plaquereinigungen unterzogen (vgl. Abschnitt 3.2.2.1.4). Dazu wurden im Anschluss an die Titerbestimmung Viren aus 8 bis 40 Plaques isoliert und erneut amplifiziert. Nach Infektion von Sf9-Zellen und Expression für 48 Stunden wurde der $G\alpha_s$ -Gehalt der Plasmamembranen mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (vgl. Abschnitt 3.2.3.3) und von *Western blots* (3.2.3.5.1) zwischen den isolierten Klonen verglichen. Klone mit der höchsten relativen Expression wurden für die weiteren Experimente genutzt.

3.2.2.1.3 Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Zur Amplifikation von Baculoviren wurde eine Suspensionskultur von Sf9-Zellen (Zelldichte $0,6 \cdot 10^6$ /ml) mit $1/1000$ Volumen virushaltigen Überstands versetzt. Die Kultur wurde 5-8 Tage bei 27 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert ($3000 \times g$, 10 min) und der virushaltige Überstand vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert.

3.2.2.1.4 Titerbestimmung von Baculovirus-haltigen Zellkulturüberständen

Um den Erfolg der Amplifikation zu kontrollieren und Sf9-Zellen unter reproduzierbaren Bedingungen infizieren zu können, wurden die Titer aller eingesetzten Virusüberstände mit Hilfe der Plaque-Methode bestimmt. Dafür werden adhärent wachsende Zellen mit einer hohen Verdünnung eines Virusstocks infiziert und mit Agarose-Gel überschichtet. Die Agarose behindert die Diffusion der Viren so stark, dass ausgehend von einer infolge der Infektion lysierten Zelle nur benachbarte Zellen infiziert werden. Nach mehreren Runden von Infektion, Lyse und erneuter Infektion bilden sich ausgehend von jeder einzelnen ursprünglich infizierten Zelle makroskopisch sichtbare Höfe (Plaques) von lysierten Zellen. In 35-mm-Schalen wurden je $0,7 \cdot 10^6$ Zellen ausgesetzt und für mindestens 30 Minuten bei 27 °C inkubiert. Vom zu testenden Virusüberstand wurden serielle Verdünnungen im

Bereich $1:10^4$... $1:10^7$ im Kulturmedium der Insektenzellen hergestellt. Von den adhärenierten Sf9-Zellen wurde das Medium abgenommen und durch 1 ml einer Verdünnung ersetzt. Die Zellen wurden für 1-2 Stunden weiter inkubiert. Währenddessen wurde Agarose-Medium hergestellt: Niedrig schmelzende Agarose wurde in einer 4,1 % (w/v)-Stammlösung verflüssigt und davon 0,47 Anteile mit 0,2 Anteilen FCS und 1,33 Anteilen TMN-FH-1,5X-Medium versetzt. Die resultierende Lösung wurde auf 42 °C temperiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Virusverdünnung von den Zellen abgenommen und die Schale mit 2 ml Agarose-Medium überschichtet. Nach dem Abkühlen der Agarose wurden 2 ml Vollmedium überschichtet und die Schalen für 4-6 Tage bei 27 °C inkubiert.

Um die entstandenen Plaques deutlich sichtbar zu machen, wurden lebende Zellen mit dem Farbstoff MTT angefärbt. Der gelbe Farbstoff wird von Zellen aufgenommen und in metabolisch aktiven Zellen zum unlöslichen, violetten MTT-Formazan reduziert. MTT wurde aus einer Stammlösung zu final 50 µg/ml zugesetzt. Nach 4-6 Stunden hoben sich helle Plaques toter Zellen deutlich vom Hintergrund ab. Gezählt wurden Schalen, die 15-80 Plaques aufwiesen. Der Titer des ursprünglichen Virusüberstandes wurde nach Gleichung 1 berechnet.

$$Titer = \frac{Plaques}{Verdünnung}$$

Titer: [Plaquesformende Einheiten je 1 ml in Ausgangslösung]
Plaques: [gezählte Plaques in einer Schale]
Verdünnung: [eingesetzte Virusverdünnung in dieser Schale]

Gleichung 1: Berechnung des Virustiters

3.2.2.1.5 Infektion von Sf9-Zellen mit Baculoviren

Zur Expression von membranständigen Proteinen wurden, sofern bei den einzelnen Experimenten nicht anders angegeben, Sf9-Zellen unter folgenden Bedingungen mit Baculoviren infiziert:

Sf9-Zellen in Suspensionskultur (Zelldichte $0,75 \cdot 10^6$ /ml) wurden mit Baculovirus-haltigen Überständen versetzt. Um eine vollständige und gleichzeitige Infektion aller Zellen zu erreichen, wurden die Viren im Überschuss gegenüber den vorgelegten Zellen (MOI) eingesetzt:

Virus kodierend für ...	MOI
G-Protein-gekoppelter Rezeptor	1,5
G β_2	1,5
G γ_2	1,5
G α_s	5

Die Suspension wurde für 46-60 Stunden bei 27 °C geschüttelt, anschließend wurden die Zellen sedimentiert (3000 × g, 10 min) und Plasmamembranen nach der Stickstoff-Dekompressionsmethode präpariert (Abschnitt 3.2.3.2).

3.2.2.2 Kultivierung von Säugerzellen

Um die Signaltransduktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zur Adenylylcyclase zu untersuchen, wurden Säugerzellen als Modellsystem genutzt.

Zellen der Linie CHO-K1 (Ovar des chinesischen Hamsters) wurden von der *American Type Culture Collection* bezogen. Die Zellen wurden in Kulturmedium (Ham's F12; 10 % (v/v) FCS; 2 mM L-Glutamin) in 5 %-CO₂-begasten Brutschränken in feuchter Atmosphäre bei 37 °C kultiviert.

Zellen der Linie 2B2 [Bastepe 2002] wurden aus der Arbeitsgruppe Jueppner (Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA) bezogen. Sie wurden in Ham's F12/DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10 % (v/v) FCS und 2,5 mM L-Glutamin kultiviert. Diese Zellen sind mit einer temperatursensitiven Variante des T-Antigens immortalisiert und wachsen daher bei 33 °C und 5 %-CO₂-Begasung in feuchter Atmosphäre. Zur Kultur von stabil transfizierten Zellen (für den Glucagon- und β_2 -adrenergen Rezeptor kodierendes Plasmid, vgl. Abschnitt 3.2.1.2.1) wurden 70 μ g/ml Hygromycin B zugesetzt.

Alle Zelllinien wurden in Plastikflaschen (Greiner, Frickenhausen) propagiert. Um beim Ablösen von der Wachstumsfläche die Membranproteine der Zellen vor Verdau zu schützen, wurde statt Trypsin eine Lösung auf EDTA-Basis (HEG, siehe Abschnitt 3.1.7) eingesetzt.

3.2.2.2.1 Transfektion der Zelllinie 2B2 durch Elektroporation

Die Elektroporation erlaubt die Einführung von Plasmid-DNA in Säugerzellen. Die Zellen werden dazu in einer DNA-haltigen Lösung resuspendiert. Durch das kurzzeitige Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Integrität der Plasmamembran gestört, so dass DNA in die Zelle gelangt.

Zur Transfektion wurden Zellen aus logarithmisch wachsenden Kulturen eingesetzt. Die Zellen wurden durch Behandlung mit HEG vom Kulturgefäß abgelöst. Die Wirkung des HEG wurde durch Verdünnen mit dem doppelten Volumen Kulturmedium gestoppt, die Anzahl der Zellen in der Suspension wurde bestimmt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation ($200 \times g$, 10 min) sedimentiert und in kaltem Elektroporationspuffer zu einer Zelldichte von $7,5 \cdot 10^6$ /ml resuspendiert.

200 μ l der Zellsuspension wurden mit Plasmid-DNA gemischt, bei Elektroporation (siehe unten) unterschiedlicher Plasmidmengen eines $G\alpha_s$ -kodierenden Plasmids wurden die Proben mit Leerplasmid zu gleichen DNA-Massen ergänzt. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette (4 mm Spalt) überführt und mit einem Puls (530 μ F, 200 V) elektroporiert. Anschließend wurde die Suspension in 7,5 ml Kulturmedium überführt.

3.2.2.2.2 Generierung stabiler Zelllinien

Durch stabile Integration der cDNA des β_2 -adrenergen und Glucagon-Rezeptors in das Genom von 2B2-Zellen wurde eine konstante Expression der Rezeptoren angestrebt.

β_2 -adrenerger und Glucagon-Rezeptor wurden (vgl. Abschnitt 3.2.1.2.1) in den Vektor pExchange1 kloniert. Das Exchanger-System (Stratagene, La Jolla, CA, USA) erlaubt es, in diesen Vektor Antibiotikaresistenzen eines verschiedener Spendervektoren mit Hilfe der Cre-Rekombinase einzuführen. Für die Selektion von 2B2-Zellen wurde die Hygromycin-Resistenz gewählt. In Vorversuchen wurde die minimale Konzentration des Antibiotikums bestimmt, bei der untransfizierte 2B2-Zellen abgetötet wurden. Diese untere Schwelle lag bei 50 μ g/ml.

Die stabile Integration eines Plasmids in ein Genom ist ein statistisch selten auftretender Vorgang. Es wurde gezeigt, dass freie Enden von DNA-Strängen häufiger in das Genom einer Zelle integriert werden [Colbere-Garapin 1979]. Um die Wahrscheinlichkeit einer stabilen Transfektion zu erhöhen, wurde daher das Plasmid durch Verdau mit *NaeI* linearisiert. Das linearisierte Plasmid wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion von Salzen und Enzymen gereinigt, anschließend wurde die DNA-Konzentration in der erhaltenen Lösung quantifiziert.

2B2-Zellen wurden mit FuGENE 6 nach Anweisung des Herstellers transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde dem Wachstumsmedium Hygromycin B zur Finalkonzentration von 100 μ g/ml zugesetzt. Innerhalb von 7 Tagen nach Transfektion starb die

überwiegende Zahl der Zellen ab, wenige Zellen verblieben und wuchsen bis 20 Tagen nach Beginn der Selektion zu deutlich sichtbaren Kolonien aus. Es wurden 15 Hygromycin-resistente Kolonien isoliert, bei denen die funktionelle Integration der transfizierten DNA geprüft wurde. Dazu wurde die Aktivität der Adenylylcyclase in Abhängigkeit von der Stimulation der Rezeptoren gemessen. Drei Zelllinien zeigten erhöhte Adenylylcyclase-Aktivität nach Stimulation mit Glucagon und Isoprenalin. Acht Wochen nach Beginn der Selektion der Zellen wurde die Antibiotikumkonzentration auf 70 µg/ml reduziert.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen wurden mit der Methode nach Bradford [Bradford 1976] bestimmt. Dazu wurden die Proben bzw. Verdünnungen (Volumen 1-30 µl) in Mikrotiterplatten vorgelegt und 200 µl des Bradford-Reagenz (Roti Nanoquant, Roth, Karlsruhe) in einfacher Konzentration zupipettiert. Nach Inkubation für 5 Minuten wurden die OD_{620 nm} und OD_{450 nm} mit einem Platten-Spektrophotometer bestimmt. Alle Proben wurden als Doppelwerte gemessen. Jede Messung wurde mit Hilfe einer Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) kalibriert.

3.2.3.2 Präparation von Plasmamembranen

Zur Aktivierung von G-Proteinen mit Agenzien, die nicht Plasmamembran-permeabel sind (z.B. AlF₄⁻), und zur elektrophoretischen Auftrennung müssen Säugerzellen aufgebrochen und die Plasmamembran von anderen Zellbestandteilen wie dem Zellkern isoliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde verschiedene Methoden angewandt, die sich im Grad der Aufreinigung der Plasmamembranen und der technischen Skalierbarkeit unterscheiden. Vor dem Aufschluss von Säugerzellen wurden diese in Wachstums- bzw. Ablösemedium (in Suspension bzw. adhärent wachsende Zellen) bei 200 × g für 10 Minuten sedimentiert und das Pellet einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Aufschlusstechniken wurden bei 4 °C in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren in allen Lösungen (100 µM Phenylmethylsulfonylfluorid; 3,21 µg/ml Leupeptin-Proteaseinhibitor; 3,21 µg/ml Limabohnen-Trypsininhibitor; 4 mg/ml Aprotinin) durchgeführt.

Als Teil der vorliegenden Arbeit wurden drei Techniken verglichen, der Aufschluss durch Ultraschall wurde optimiert (vgl. Abschnitt 4.3.2). Im Folgenden sind die optimierten Abläufe beschrieben.

1. Stickstoff-Dekompression

Die Zellsuspension wird in einer druckdichten Kammer mit Hilfe von gasförmigem Stickstoff unter Druck versetzt. Beim raschen Absinken des Druckes werden die Zellen durch ausperlende Gasblasen zerstört [Hunter 1961]. Zellkerne bleiben weitgehend intakt. Das Zellpellet (3-10 Mio. Zellen) wurde in 20 ml Lysispuffer resuspendiert und in eine vorgekühlte Stickstoff-Dekompressionskammer überführt. Nach dem Verschluss der Kammer wurde mittels Pressstickstoff ein Druck von 50 bar angelegt. Die Zellen wurden für 20 Minuten äquilibriert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch den Auslass entnommen. In diesem passiert die Zellsuspension ein Ventil eines definierten Durchmessers. Hier werden die Zellen zusätzlich zur Belastung durch ausperlenden Stickstoff noch geschert, vergleichbar der Wirkung einer French-Press [Milner 1950]. Die Suspension wurde in einer Zentrifuge auf $1000 \times g$ beschleunigt und ohne Bremse auslaufen gelassen. Bei dieser Behandlung sedimentieren Zellkerne und nicht zerstörte Zellen, Plasmamembranen bleiben im Überstand. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und 20 min bei $100\,000 \times g$ zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit Hilfe einer Insulinspritze in Membranpuffer zu einer Proteinkonzentration von $0,5\text{-}2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ resuspendiert.

Sofern die Plasmamembranen nicht sofort verwendet werden sollten, wurde die Membransuspension durch Eintropfen in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2. Einfrieren-Auftauen

Das Zellpellet von 30 Millionen Zellen wurde in $500 \mu\text{l}$ Lysispuffer resuspendiert. Zur Zerstörung der Zellen wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und unter Schütteln im $37 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Wasserbad gerade wieder getaut. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Plasmamembranen bei $40\,000 \times g$ für 20 Minuten sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in Membranpuffer zu einer Proteinkonzentration von $0,5\text{-}2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ resuspendiert.

3. Ultraschall

Der Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung wurde als Teil der vorliegenden Arbeit optimiert. Daher sind bei einzelnen Experimenten Abweichungen vom folgenden Ablauf angegeben.

Ein Zellpellet von 3-10 Millionen Zellen wurde in 200 µl Lysispuffer in einem Mikroreaktionsgefäß resuspendiert. Das Gefäß wurde während des Aufschlusses in Eis gehalten. Die Spitze des Ultraschallkopfes (Durchmesser 3 mm) wurde möglichst tief in die Suspension getaucht, ohne die Gefäßwandungen zu berühren. Wenn nicht anders angegeben, wurden mit dem Ultraschallgenerator drei Pulse der Intensitätsstufe 3 bei einem Lastanteil („duty cycle“) von 50 % der gerätetypspezifischen Maximalleistung durchgeführt. Anschließend wurden die Plasmamembranen 20 Minuten bei 40 000 × g sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in Membranpuffer zu einer Finalkonzentration von ca. 0,5-2 µg/µl resuspendiert.

3.2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (PAGE) nach Laemmli [Laemmli 1970]. Bei einer nativen Gelelektrophorese wird die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen im elektrischen Feld auf der Seite des Proteins durch seine Konformation und die Summe seiner elektrischen Ladungen bestimmt. Bei der denaturierenden Gelelektrophorese werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der meisten Proteine aufgebrochen. Die Denaturierung wird erreicht durch Natriumdodecylsulfat (SDS), das an Proteine im relativ konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS je 1 g Protein bindet. Die elektrischen Ladungen der Proteine werden dadurch überdeckt, Proteine erhalten in der Summe eine negative Ladung, die zum Molekulargewicht korrespondiert. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ist damit linear abhängig vom Logarithmus ihres Molekulargewichtes [Weber 1969]. Zusätzlich werden Disulfidbrücken durch Dithiothreitol (DTT) gespalten. Auf der Seite des Gels bestimmen bei beiden Methoden unter anderem die Porengröße und die Stärke des Feldes die Wanderungsgeschwindigkeit.

Zur Auftrennung wurden Gele im Biorad-Minigel-System (Trennstrecke ca. 4 cm, Dicke 0,75 mm, 15 Laufspuren) oder Großgele (Trennstrecke ca. 6 cm, Dicke 0,75 mm, 28 Laufspuren) benutzt. Beide Formen bestanden aus einem Sammelgelanteil und einem Trenngelanteil (Zusammensetzung siehe unten). Das Sammelgel unterscheidet sich neben

der größeren Porengröße im niedrigeren pH-Wert (pH 6,8) vom Trenngel (pH 8,6). Bei dem niedrigeren pH-Wert liegt die Aminosäure Glycin, die dem Laufpuffer zugesetzt ist, als nach außen neutrales Zwitterion vor und führt zu einer hohen lokalen Spannungsdifferenz. In dem lokalen elektrischen Feld werden die geladenen Proteine der Probe an der schmalen Lauffront konzentriert.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit Probenpuffer versetzt und für 3 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert und die Elektrophorese bei einer Spannung von 100-200 V im Laufpuffer durchgeführt. Der Ablauf wurde an der Migration des Farbstoffes Bromphenolblau im Probenpuffer verfolgt. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurde durch Vergleich mit Standardproteinen bestimmt, die durch kovalente Kopplung mit Farbstoffen direkt im Gel sichtbar sind.

3.2.3.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western blot)

Um Proteine immunologisch nachweisen zu können, wurden sie aus SDS-PAGE-Gelen auf Nitrozellulosemembranen transferiert [Towbin 1979]. Auf der Membran sind Proteine für Antikörper gut zugänglich. Unter den Transferbedingungen wird das SDS von den Proteinen entfernt.

Zum Transfer wurden Membran und Gel in Transferpuffer frei von Luftblasen aufeinander gelegt und nach Anweisung des Herstellers in der Apparatur platziert. Der Transfer erfolgte im Tankverfahren für Biorad-Minigele unter konstanter Spannung (100 V) über 50 min bzw. für Großgele unter konstanter Stromstärke bis zum Erreichen einer Ladungsmenge von 8100 A·s.

3.2.3.5 Immunologische Detektion und Quantifizierung

3.2.3.5.1 Detektion von auf Nitrozellulosemembranen immobilisiertem $G\alpha_s$

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran mit Rotiblock (Roth, Karlsruhe) für 30-60 Minuten inkubiert. Zur Absättigung von Bindungsstellen des sekundären Antikörpers auf der Membran wurde diese mit einem Konjugat des Anti-Kaninchen-Antikörpers mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (Verdünnung von 1:4000 in PBS-T) für 30 Minuten inkubiert. Dieses Enzym erzeugte bei der späteren Detektion kein Signal. Der Überschuss wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS-T für je 10 Minuten entfernt. Es folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper (Kaninchen

Anti-G $\alpha_{S_{olf}}$, 1:1000 in PBS-T) für 60 Minuten und dreimaliges Waschen für je 3 Minuten. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen, HRP-konjugiert, 1:40 000 in PBS-T) für 30 Minuten inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen für je 10 Minuten. Die Membran wurde für ca. 10 Minuten getrocknet bevor Chemilumineszenz-Reagenz auf sie gegeben wurde. Nach Inkubation für 5 Minuten wurde die Lumineszenz mit einem Lumineszenz-Dokumentationssystem fotografiert.

3.2.3.5.2 Quantifizierung von G α_S im *enzyme-linked immunosorbent assay*

Für diesen immunologischen Nachweis von G α_S wurde eine bereits beschriebene Methode adaptiert [Ransnäs 1988]. Der beschriebene *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) beruht auf der Competition des Antigens (G α_S) und dem zur Antikörpergenerierung verwendeten Peptid um den Antikörper. Mikrotiterplatten werden mit dem zur Antikörpergenerierung verwendeten Peptid beschichtet. Ein Überschuss des G α_S -spezifischen Antikörpers und G α_S wurden gemischt und die Lösung in die beschichteten Platten überführt. Nur der Teil des Antikörpers, der nicht an ein Antigen gebunden ist, kann noch an das Peptid auf der Mikrotiterplatte binden. Damit ist der immobilisierte Anteil des Antikörpers indirekt abhängig von der Menge des G α_S -Proteins. Nach Abwaschen von ungebundenem Antikörper kann der immobilisierte G α_S -spezifische Antikörper mit einem gegen ihn gerichteten enzymkonjugierten Antikörper gekoppelt werden. Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung der Menge des gebundenen Enzyms und Vergleich mit Kalibrierproben.

Um die Platten mit dem Peptid (Abschnitt 3.1.2) zu beschichten, wurde die Peptidstamm-lösung mit PBS zu 0,08 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 100 μl in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte (96 Vertiefungen) pipettiert. Die Platte wurde 16-24 Stunden bei 4 °C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit vollständig aus der Platte entfernt und die Vertiefungen dreimal mit jeweils 200 μl ELISA-Waschpuffer gespült.

Lösungen der von G α_S wurden in PBS mit 1 % (w/v) Natriumcholat für 1h bei 4 °C aus Plasmamembranen extrahiert. Anschließend wurden die Lösungen 20 Minuten bei 15 000 \times g, 4 °C zentrifugiert. Vier Volumenteile der Überstände wurden mit einem Volumenteil einer Verdünnung des Anti-G α_S -Antikörpers (1:1200 in PBS) vermischt und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Von jedem Ansatz wurden 100 μl in die Vertiefungen der

beschichteten Mikrotiterplatte überführt. Kontrollwerte für nicht spezifische Bindung wurden auf dieser Stufe ohne Antikörper und ohne G-Protein angesetzt, Kontrollwerte für die maximale Bindungskapazität (B0) wurden mit Antikörper, jedoch ohne G-Protein angesetzt.

Die Mikrotiterplatte wurde für 16 Stunden bei 4 °C in feuchter Atmosphäre inkubiert, dreimal mit ELISA-Waschpuffer gespült und mit 100 µl einer 1:1000 Verdünnung des sekundären Antikörpers (Anti-Kaninchen, Meerrettichperoxidase-gekoppelt) je Vertiefung für eine weitere Stunde inkubiert. Nach sechs Waschvorgängen wurden die Vertiefungen gründlich von Flüssigkeit befreit und mit je 100 µl OPD-Lösung gefüllt. Die Platten wurden bei Raumtemperatur in feuchter Atmosphäre inkubiert, bis die Absorption der B0-Kontrollen bei einer Wellenlänge von 450 nm im Bereich von 0,7-0,9 lag.

3.2.3.5.3 Standard zur Quantifizierung von $G\alpha_s$

Für Quantifizierungen wurden Konzentrationsreihen von gereinigtem $G\alpha_s$ -Protein eingesetzt. Das verwendete $G\alpha_s$ (Kathrin Klass, Charité, Berlin) trug C-terminal sechs Histidin, die durch ihre Affinität zu Nickel eine säulenchromatographische Reinigung erlaubten. Die verwendete Präparation hatte eine Reinheit von ca. 90 % (Abbildung 8). Die $G\alpha_s$ -Konzentration wurde nach der Bradford-Methode gemessen (3.2.3.1).

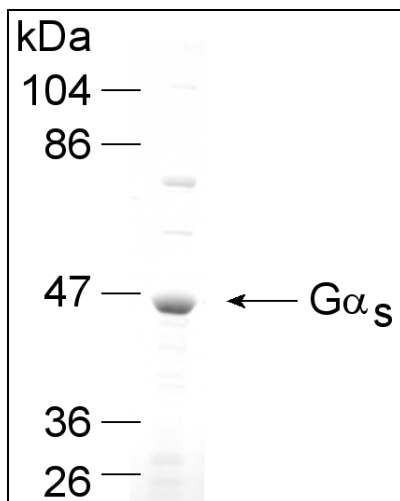


Abbildung 8: Reinheit des verwendeten $G\alpha_s$ -Standards. 4 ng $G\alpha_s$ wurden mit einem 11 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Farbstoff angefärbt.

3.2.4 Methoden zur funktionellen Analyse von Enzymen

3.2.4.1 Adenylylcyclase-Aktivität an isolierten Plasmamembranen

Die Adenylylcyclase katalysiert die Umwandlung von ATP zu cAMP. Nach der Methode von Salomon *et al.* [Salomon 1974] wird das radioaktiv markierte Substrat [α - ^{32}P]ATP angeboten und nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Detergens und Überschuss unmarkierten Substrats das radioaktiv markierte Produkt säulenchromatografisch vom Substrat und von Nebenprodukten getrennt. Zur Quantifizierung von Verlusten bei der Chromatografie wird den Proben ein interner Standard (^3H]cAMP) zugesetzt.

In einem Volumen von 60 μl wurden Plasmamembranen, 1 μM GTP und bei Bedarf Agonisten in HMED angesetzt und auf Eis gelagert. Zum Start der Inkubationszeit wurden 40 μl Start-Mix zugesetzt, der neben dem radioaktiv markierten Substrat (Aktivität 1-2 Mio. Zählimpulse pro Minute (cpm) und Probe, final 0,2 mM ATP) einen Phosphodiesterase-Inhibitor (Schutz des cAMP vor Hydrolyse) und ein ATP-regenerierendes System (Pyruvatkinase und Substrat Phosphoenolpyruvat) enthielt. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Reaktion 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Mit Zugabe von 850 μl SDS-Stopp-Lösung wurde die Reaktion beendet. Um die Wiederfindungsrate während der folgenden chromatografischen Trennung zu bestimmen, wurde allen Proben dieselbe Menge ^3H]cAMP (ca. 5000 cpm) zugesetzt.

Die Ansätze wurden auf Wasser-gespülte Dowex-Säulen (1 ml Säulenvolumen) überführt, mit 2 ml H_2O gespült und mit weiteren 4 ml H_2O auf Aluminiumoxid-Säulen eluiert. Von diesen wurden die Proben mit 3 ml Imidazol-Lösung eluiert mit je 8 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen. Im Flüssigkeitsszintillationszähler wurde der Energiebereich der β -Strahlung in zwei nicht überlappende Energiefenster für ^3H und ^{32}P aufgeteilt (Energiebereich in gerätespezifischer Angabe ohne Einheit: 0...1000, ^3H -Bereich: 0...399, ^{32}P -Bereich: 400-1000). Die Überstrahlung von ^{32}P in das ^3H -Fenster wurde mit Hilfe von Kontrollen, die ausschließlich [α - ^{32}P]ATP enthielten, bestimmt und korrigiert. Die spezifische Adenylylcyclase-Aktivität wurde nach Gleichung 2 berechnet.

$$AC = \frac{cpm_{Probe} - cpm_{Leerwert}}{spezAkt \cdot R \cdot t \cdot m}$$

<i>AC</i>	spezifische Adenylylcyclase – Aktivität $\left[\frac{\text{nmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right]$
<i>cpm</i>	Zerfallsereignisse je Minute im ^{32}P - Fenster der entsprechenden Probe
<i>spezAkt</i>	spezifische Aktivität [cpm/nmol]
<i>R</i>	Rückgewinnungsrate von [^3H] - cAMP [dimensionslos]
<i>t</i>	Reaktionszeit [min]
<i>m</i>	Membranmenge [mg]

Gleichung 2: Berechnung der spezifischen Adenylylcyclase-Aktivität

Agonisten wurden, wo immer möglich, in Wasser gelöst. Ausnahmen davon sind Peptid-liganden (Secretin, Glucagon: Konzentration der Stammlösung 1 mM), die in 1 % (v/v) Essigsäure gelöst wurden und Forskolin, das in DMSO zu 5 mM gelöst wurde. Die Stammlösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Aluminiumfluorid (AlF_4) wurde in finaler Konzentration von 30 μM eingesetzt. Um diese Konzentration des Komplexes zu erreichen, wurden 30 μM AlCl_3 und 10 mM NaF eingesetzt.

3.2.4.2 Adenylylcyclase-Aktivität an intakten Zellen

An intakten Zellen wurde die Adenylylcyclase-Aktivität als Umwandlung von tritiiertem ATP zu cAMP bestimmt [Humes 1969]. Dazu wuchsen die Zellen in Gegenwart von 2,8- ^3H Adenin, das von den Zellen aufgenommen unter anderem in ATP umgewandelt wird. 8-18 Stunden vor der Durchführung der Messung erhielten die Zellen frisches Kulturmedium, dem ^3H Adenin zugesetzt war (2 $\mu\text{Ci/ml}$). Zum Zeitpunkt der Messung wurde das Kulturmedium abgenommen und durch Akkumulationsmedium ersetzt. Die Inkubation wurde fortgesetzt in einem Wärmeschrank bei der je nach Zelllinie üblichen Temperatur. Nach 5-10 Minuten wurde das Akkumulationsmedium erneut gewechselt, diesmal zusätzlich Agonisten enthaltend. Die Akkumulation wurde fortgesetzt wie beim einzelnen Experiment angegeben und beendet durch Abnehmen des Mediums und sofortiges Zupipettieren von TCA-Stopp-Lösung (1 ml auf 3,5 cm^2 Kulturfläche). Die weitere Reinigung und Quantifizierung des entstandenen ^3H cAMP erfolgte säulen-chromatografisch wie unter 3.2.4.1 beschrieben.

3.2.4.3 Adenylylcyclase-Aktivität an mikroinjizierten Zellen

Die Mikroinjektion wurde verwendet, um Substanzen verschiedener chemischer Natur (Oligodeoxynukleotide, Plasmide) mit definiert gleich hoher Effizienz zu transfizieren. Diese Methode erreicht jedoch nur einen geringen Durchsatz. Daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine besonders empfindliche Methode zur Detektion von cAMP entwickelt [Falk 2003].

Um geringe Zellzahlen handhaben zu können, wurde die Zellen auf Mikroträgern ausgesät. Zur Herstellung der Mikroträger wurden Mikroskopie-Deckgläser (0,5 mm Dicke) mit einer Diamantspitze angeritzt und gebrochen (ca. 1 mm² Wachstumsfläche). 24 Stunden vor der Mikroinjektion wurden Zellen auf den Mikroträgern ausgesät. Zur Injektion wurden die Träger in getrennte Kulturschalen überführt und mit einem manuellen Mikroinjektionssystem transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf den Mikroträgern gezählt und die Träger in Mikroakkumulationsmedium (50 µl je Träger) überführt. Nach Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C wurde das Medium abgenommen und durch Mikroakkumulationsmedium mit den angegebenen Agonisten ersetzt. Nach der jeweils angegebenen Zeit wurden die Träger in jeweils 40 µl Ethanol überführt. Die Proben wurden 60 Sekunden geschüttelt und durch Vakuumzentrifugation vom Ethanol getrocknet. Die absolute cAMP-Menge in den Proben wurde mit einem cAMP-spezifischen ELISA unter Anwendung des vom Hersteller beschriebenen Acetylierungsprotokolls bestimmt (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA).

3.2.4.4 Bindungskinetik von [³⁵S]GTPγS an Plasmamembranen

Die α-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine liegen im inaktiven Zustand mit dem Nukleotid GDP gebunden vor. Die Aktivierung vollzieht sich durch Dissoziation des GDP, Aufnahme eines GTP-Moleküls und nachfolgende Konformationsänderungen. Die Dissoziation des GDP ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [Cassel 1978], er wird durch Kontakt der α-Untereinheit mit einem aktiven Rezeptor beschleunigt. Mit dem schlecht hydrolysierbaren Nukleotidanalogs [³⁵S]GTPγS kann der Aktivierungszustand fixiert und nach Abtrennung von ungebundenem Nukleotid die Menge an aktivierter α-Untereinheit gemessen werden [Northup 1982]. Die Geschwindigkeit der Bindung, ausgedrückt durch die scheinbare Bindungskonstante k_{app} , ist ein Maß für die Interaktionsintensität zwischen dem G-Protein und Rezeptoren.

Die hier beschriebene Methode wurde als Teil der vorliegenden Arbeit optimiert. Daher sind bei einzelnen Experimenten Abweichungen vom folgenden Protokoll angegeben. Die zu untersuchende Plasmamembran (jeweils 1 µg) wurde mit bzw. ohne Agonist zu einem finalen Volumen von 100 µl in HMEN verdünnt. Zur Durchführung der Bindung wurden die Proben in ein auf 30 °C temperiertes Wasserbad überführt. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurden 100 µl vorgewärmter GTPγS-Mix zugesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte die Trennung des proteingebundenen von freiem [³⁵S]GTPγS durch Vakuumfiltration durch Nitrozellulosefilter. Dazu wurde je Probe ein in H₂O vorgequollener Nitrozellulosefilter in einer Vakuumapparatur platziert und mit 2 ml kaltem Filterwaschpuffer gespült. Die Probe wurde auf den Filter überführt und der Filter mit 12 ml kaltem Filterwaschpuffer gespült. Der Filter wurde entnommen, getrocknet und in 4 ml Szintillationsflüssigkeit überführt. Die auf dem Filter fixierte Radioaktivität wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler quantifiziert. Mit Hilfe der spezifischen Aktivität des eingesetzten [³⁵S]GTPγS wurde daraus die molare Menge des gebundenen Nukleotids errechnet. Die unspezifische Bindung des Substrates an die Filter wurde in Anwesenheit von 10 µM unmarkiertem GTPγS bestimmt und von allen Probenwerten subtrahiert.

3.2.4.5 Messung der Aktivierung von Proteinkinase A mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) besteht aus regulatorischen und katalytischen Untereinheiten, welche nur in Anwesenheit von cAMP dissoziieren. Bei Fusion der Untereinheiten mit GFP-Varianten (CFP, YFP) kann die Interaktion der Untereinheiten als Maß für die Aktivierung von PKA mit Hilfe des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) gemessen werden [Zaccolo 2000]. Eingestrahktes Licht mit einer Wellenlänge im Absorptionsbereich des CFP wird zum Teil strahlungslos auf YFP übertragen und kann als Zunahme im Emissionsspektrum des YFP gemessen werden.

Die Experimente wurden an einem Mikroskop mit CCD-Kamera aufgezeichnet (Beschreibung der Anlage im Abschnitt 3.1.6). Zur Messung wurde das Trägerglas mit darauf wachsenden, transfizierten Zellen in die Messkammer eingespannt und die Kammer mit PBS gefüllt. Das Anregungslicht einer Quecksilberdampfampe wurde gefiltert (430 nm für CFP und 510 nm für YFP) und durch einen dichroischen Spiegel (<460 und 505-525 nm) geteilt, bevor es auf die Probe traf. Das emittierte Licht wurde zur Detektion von CFP (460-500 nm) bzw. YFP (540-580 nm) gefiltert und in 2-Sekunden-Intervallen mit der

Kamera aufgezeichnet. Bei jedem Messzyklus wurden CFP für 20-60 ms und YFP für 10-15 ms angeregt. Die Fluoreszenz-Intensitäten von 5-7 Zellen wurden aufgenommen und durch spektrale Dekonvolution korrigiert.

3.2.4.6 Metabolische Markierung

Zur Bestimmung der Protein-Abbauraten in lebenden Zellen werden für eine Markierungszeit radioaktiv markierte Aminosäuren angeboten. Diese werden in neu gebildete Proteinmoleküle inkorporiert. Nach dem Ende der Markierungszeit kann der Abbau der markierten Proteine verfolgt werden, um die Proteinhalfwertszeit zu bestimmen. Um aus der Vielfalt der markierten Proteine $G\alpha_s$ identifizieren zu können, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt.

2B2-Zellen wurden in 21-mm-Kulturgefäßen ausgesetzt und nach 24 Stunden mit Plasmiden transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe von FuGENE 6 nach Herstellerprotokoll. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit [³⁵S]Cystein/Methionin markiert. Das Medium über dem Zellrasen wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und mit Cystein-/Methionin-freiem Wachstumsmedium versetzt. Die Zellen wurden für 60 Minuten im Brutschrank inkubiert, um den zellulären Vorrat an Cystein und Methionin aufzubrechen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, und die Zellen mit Wachstumsmedium mit Protein Labeling Mix (80 μ Ci/ml; 0,4 ml je 21-mm-Schale) versetzt. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt und durch Vollmedium mit Überschüssen unmarkierter Aminosäuren (150 μ M Cystein; 50 μ M Methionin) ersetzt und die Zellen weiterhin inkubiert.

Der Abbau der Proteine wurde in den Kulturgefäßen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe der unmarkierten Aminosäuren gestoppt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gespült und 700 μ l RIPA-Puffer (inklusive Proteaseinhibitoren: 100 μ M Phenylmethylsulfonylfluorid; 3,21 μ g/ml Leupeptin-Proteaseinhibitor; 3,21 μ g/ml Limabohnen-Trypsininhibitor; 4 mg/ml Aprotinin) zupipettiert. Der Überstand, der die lysierten Zellen enthielt, wurde in Mikroreaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Alle Schritte der folgenden Immunpräzipitation wurden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Nicht lysierte Bestandteile wurden abzentrifugiert (15 000 \times g, 15 min). 200 μ l des Überstandes wurden durch Inkubation mit 10 μ l Protein-A-Sepharose (1 Stunde) von unspezifisch bindenden Bestandteilen gereinigt. Die Sepharose wurde sedimentiert

(3000 × g, 3 min). Der Überstand wurde wiederum mit 10 µl Protein-A-Sepharose und 1 µl G $\alpha_{s/olf}$ -spezifischem Antikörper versetzt. Der Ansatz wurde für 14 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose sedimentiert (3000 × g, 3 min), der Überstand abgenommen und verworfen. Die Sepharose wurde zweimal mit 200 µl IP-Waschpuffer A und einmal mit 200 µl IP-Waschpuffer B gewaschen, mit 25 µl PAGE-Probenpuffer versetzt und 3 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Nach Trocknen der Membranen wurde die in Proteine inkorporierte Radioaktivität mit einem Isotopen-Dokumentationssystem detektiert.

3.2.4.7 Aktivitätsbestimmung von Luziferasen

Die Inhibition der Expression durch verschiedene Nukleinsäuren wurde anhand der Expression von Luziferasen quantifiziert. Als Zielmolekül diente mRNA der *firefly*-Luziferase (*Photinus pyralis*, nordamerikanischer Leuchtkäfer), welche durch ein transfiziertes Plasmid generiert wurde. Gleichzeitig wurde ein für die *Renilla*-Luziferase (*Renilla reniformis*, Seefeder) kodierendes Plasmid als interner Standard transfiziert. Beide Plasmide wurden von Prof. Wittig (FU Berlin) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. 24 Stunden vor der Mikroinjektion wurden Zellen auf gläsernen Mikroträgern (ca. 1 mm²) ausgesät. Die Zellen wurden mit einem manuellen Mikroinjektor injiziert. Die Konzentration des *firefly*-Luziferase kodierenden Plasmids betrug 0,75 ng/µl, die des *Renilla*-Luziferase kodierenden Plasmids 2 ng/µl in der Injektionslösung. 24 Stunden nach der Mikroinjektion wurden die Träger in *Passive Lysis Buffer* (Promega, Madison, WI, USA) überführt. Die Aktivität beider Luziferasen wurde mit einem Dual-Luciferase-Kit (Promega) bestimmt. Die Messung der Lichtentwicklung erfolgte mit einem Luminometer.

3.2.5 Verwendete Computerprogramme

Quantifizierungen der Bilder von Nitrozellulosemembranen wurden mit den Programmen NIH Image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [U.S. National Institutes of Health 2004] bzw. Scion Image (Scion, Frederick, MD, USA) [Scion Corporation 2001] durchgeführt.

Anpassungen von Funktionen an gemessene Daten wurden nach der Methode der kleinsten Quadrate mit Graphpad [GraphPad Software 2004] durchgeführt.