

III. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden in höchstmöglichem Reinheitsgrad, soweit nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Pharmacia Biotech	Freiburg
BD Bioscience	Heidelberg
Brand	Nürtingen
Clontech	Heidelberg
Difco Laboratories	Detroit, USA
Eppendorf	Köln
Fermentas	St. Leon-Rot
Greiner	Nürtingen
Invitrogen	Groningen, Niederlande
Merck KgaA	Darmstadt
MobiTech GmbH	Göttingen
New England Biolabs	Frankfurt/Main
PAA Laboratories	Pusching, Österreich
Pierce	Rockford, USA
PromoCell	Heidelberg
Qiagen GmbH	Hilden
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim
Roth	Karlsruhe
Sigma Chemie	München
Southern Biotechnologies	Birmingham, USA

3.1.2 Nährmedien und Lösungen für Bakterien

LB-Medium	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	Bacto Trypton
	5 g/l	NaCl
LB-Agar	LB-Medium + 15 g/l Agar-Agar	
Ampicillin 1000x	100 g/ml	Ampicillin-Na ⁺ in H ₂ O _{bd}
Kanamycin 1000x	10 g/ml	Kanamycin-SO ₄ ²⁻ in H ₂ O _{bd}

3.1.3 Nährmedien und Lösungen für eukaryontische Zellen

Als Nährmedium für die eukaryontischen Zellen wurde „Dulbecco`s modified Eagle`s medium“ mit 4,5 g/l Glukose (DMEM high Glucose, PAA) unter Zusatz von 5-10% fötalem Kälberserum und Penicillin-Streptomycin (Endkonzentration 1U/ml Penicillin; 0,1 mg/ml Streptomycin) verwendet. Die Zellen wurden zum Ablösen von der Platte mit Trypsin-EDTA behandelt, wobei Trypsin in einer Endkonzentration von 0,5 g/l und EDTA mit 0,2 g/l vorlag.

Alle Zellkulturmedien, Seren, Additiva, Trypsin-EDTA und PBS wurden von PAA Laboratories GmbH, Polyfect-Transfektionsreagenz von der Firma Qiagen bezogen.

3.1.4 Puffer zur Arbeit mit Nukleinsäuren

Puffer 1 (P1)	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
Puffer 2 (P2)	200 mM	NaOH
	1 %	SDS

Puffer 3 (P3) 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

TE, pH 8,0 10 mM Tris-HCl
 1 mM EDTA

3.1.5 Puffer für elektrophoretische Verfahren

TAE pH 8,3 40 mM Tris
 20 mM 100% Essigsäure
 2 mM EDTA

DNA-Probenpuffer 6x 60 mM EDTA-Natrium, pH 8,0
 60 % Glycerin
 0,15% Bromphenolblau
 0,15% Xylolcyanol

Ethidiumbromid (1000x) 0,05% Ethidiumbromid in H₂O_{bd}

3.1.6 Puffer zur Arbeit mit Proteinen

TBS 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
 150 mM NaCl

TBST TBS
 0,1% Tween 20

Anodenpuffer I 0,3 M Tris-HCl, pH 10,4
 20% Methanol

Anodenpuffer II 25 mM Tris-HCl, pH 10,4
 20 % Methanol

MATERIAL UND METHODEN

Kathodenpuffer	4 mM	6-Amino-n-capronsäure, pH 7,6
	20%	Methanol
SDS-Gel-Färbelösung	2,5 g	Coomasie Blau R250
	454 ml	Methanol
	92 ml	100% Essigsäure
	454 ml	H ₂ O _{bd}
SDS-Gel-Entfärbelösung	50%	Methanol
	1%	100% Essigsäure
Ponceau-Färbelösung	0,1%	Ponceau S
	5%	100% Essigsäure
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM	Tris
	200 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
Probenpuffer 2x	125 mM	Tris, pH 6,8
	4 %	SDS
	10 %	Glycerol
	0,006 %	Bromphenolblau

3.1.7 Lösungen für immunhistologische Nachweisverfahren

Serra	60 ml	100% Ethanol
	30 ml	37% Formaldehydlösung
	10 ml	Eisessig
PBS	29,25 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
	4,90 g	KH_2PO_4
	160,00 g	NaCl
	Stammlösung 1:20 verdünnen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$	
Citratpuffer	Stammlösung A:	21,1 g Citronensäuremonohydrat ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$
	Stammlösung B:	29,41 g Natriumcitratdihydrat ad 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$
	15 ml Stammlösung A, 80 bis 100 ml Stammlösung B auf 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$, pH-Wert auf 6 einstellen	
Acetatpuffer	11,52 g	Eisessig
	148,25 g	Natriumacetat
	ad 1000 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$
	Stammlösung 1:20 verdünnen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$	
Chromogenlösung	5 ml	Acetatpuffer 1x
	ad 100 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$
	30 mg	3-Amino-9-Ethylcarbazol in 2 ml DMSO/Triton
	10 μl	30% Perhydrol

3.1.8 Plastikwaren

Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Übernachtkulturröhrchen und Petrischalen wurden von den Anbietern Eppendorf (Köln), Greiner (Nürtingen) und Brand (Wertheim) bezogen.

3.1.9 Verwendete Kits

EndoFree Plasmid Isolation Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
ProofStart DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
PCR cloning Kit	Qiagen, Hilden
Qproteome Cell Compartment Kit	Qiagen, Hilden
Super Sensitiv TM Immunohistochemistry Detection System	BioGenex, San Ramon, USA

3.1.10 Antikörper

Als spezifischer Erstantikörper in der Immunhistologie wurde der polyklonale Antikörper 2983 verwendet, der durch Immunisierung eines Kaninchens mit dem C-Terminus von Mdg1 und anschließender Aufreinigung gewonnen wurde (Müller 2005). Als Zweitantikörper dient goat α -rabbit HRP-conjugated.

Die Erstantikörper für die Western-Blot-Analyse waren anti-GFP der Firma Clontech, anti-myc der Firma Clontech und anti-BiP/GRP78 der Firma BD Bioscience. Als Zweitantikörper kamen goat α -rabbit HRP-conjugated der Firma Southern Biotechnologies und goat α -mouse HRP-conjugated der Firma Pierce zum Einsatz.

Erst-antikörper	Firma	Verdün- nung	Zweitantikörper	Firma	Verdünnung
Anti-GFP	Clontech Heidelberg	1:1.000	goat α -rabbit HRP- conjugated	Southern Biotechnologies Birmingham, USA	1:20.000
Anti-myc	Clontech Heidelberg	1:4.000	goat α -mouse HRP- conjugated	Pierce Rockford, USA	1:20.000
Anti- BiP/GRP78	BD Bioscience Heidelberg	1:200	goat α -mouse HRP- conjugated	Pierce Rockford, USA	1:20.000

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Erstantikörper und der dazu gehörenden Zweitantikörper inklusive Verdünnungen.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode, um *in vitro* spezifische Sequenzabschnitte von der cDNA ausgehend zu vervielfältigen. Der Ablauf der Reaktion ähnelt den Vorgängen bei der natürlichen Replikation. Der PCR-Prozess besteht aus 20 bis 30 Zyklen, wobei jeder Zyklus drei Schritte beinhaltet. Zunächst wird die doppelsträngige DNA für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen, die die Einzelstränge zusammenhalten, aufgebrochen werden. Die DNA liegt danach als Einzelstrang vor. In der nachfolgenden „Annealing“-Reaktion lagern sich die Primer an die DNA an. Dafür ist eine primerspezifische Temperatur nötig, die meist zwischen 55°C und 60°C liegt. Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf, wobei der Primer den Anfang des Einzelstrangs bildet. Dieser als Elongation bezeichnete Schritt findet bei einer Temperatur von 72°C statt. Die Zeit für diesen Reaktionsschritt richtet sich nach der Länge des zu synthetisierenden DNA-Strangs, wobei man eine Minute pro kb Plasmidlänge rechnet. Die Primerpaare, welche aus einem „forward“ und einem „reverse“ Primer bestehen, werden spezifisch für den gewünschten DNA-Abschnitt hergestellt. Die Primer stellen Startermoleküle dar, die aus synthetischen Oligonukleotiden bestehen. Eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) synthetisiert vom 3`-Ende des Primers aus den neuen DNA-Doppelstrang. Zur Kontrolle der PCR wurde nach Ablauf der Zyklen 10 µl des PCR-Fragments auf ein Agarosegel aufgetragen. Die restlichen 40 µl wurden mit dem PCR-Purification-Kit (Qiagen) gereinigt.

Die Reaktionen wurden im “T-Gradient-Cycler” (Biometra) durchgeführt.

Für eine Standard-PCR wurde folgender Ansatz gewählt:

- 10 ng Template-DNA
- 1 μ l 100 pmol "forward-Primer"
- 1 μ l 100 pmol "reverse-Primer"
- 1 μ l dNTPs
- 1 μ l Taq-Polymerase (1 U/ μ l)
- 5 μ l 10x PCR-Puffer

ad 50 μ l nicht autoklaviertes, destilliertes Wasser

Zusammensetzung des PCR-Puffers:

- 100 mM Tris-HCl pH 8,3
- 500 mM KCl
- 30 mM MgCl₂
- 0,1 % Gelatine

3.2.2 Klonierung der PCR-Fragmente und Sequenzierung

In der PCR wurde eine Taq-Polymerase verwendet. Diese verfügt über eine terminale Transferase-Aktivität, wodurch am 3`-Ende der PCR-Fragmente Adenin angehängt wird. Diese Adenin-Überhänge können an die Uracil-Überhänge des linearisierten Vektors pDrive binden. Mit Hilfe des PCR-Cloning Kits (Qiagen) wurden die Fragmente in pDrive kloniert und anschließend in kompetente Zellen transformiert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI inkubiert, wodurch das Insert (PCR-Fragment) aus dem Vektor geschnitten wurde. Mittels Gelelektrophorese konnte anschließend analysiert werden, ob sowohl die Vektor- als auch die Insert-Bande vorhanden sind. Solch ein positiver Klon wurde nach Fällung der DNA bei MWG (Ebersberg) sequenziert, um eventuelle Fehler in der Sequenz erkennen zu können und sicherzustellen, dass tatsächlich das korrekte Insert vorhanden ist.

3.2.3 Vektoren

Vektoren sind DNA-Moleküle, in die fremde DNA-Abschnitte eingefügt werden können. Sie enthalten alle Strukturabschnitte, die benötigt werden, damit man sie in eine bakterielle Wirtszelle einbringen und dort vermehren kann. Die hier verwendeten Vektoren leiten sich von Plasmiden ab. Als Plasmide werden doppelsträngige, ringförmige DNA-Moleküle bezeichnet, die extrachromosomal in Bakterien vorkommen. Sie werden ebenso wie die chromosomale DNA der Wirtszelle vor jeder Zellteilung verdoppelt. Die in der Molekularbiologie verwendeten Plasmide sind etwa 3 kb groß und bestehen fast ausschließlich aus den für die DNA-Klonierung nötigen Sequenzabschnitten: einem Replikationsursprung, einem Resistenzgen und einer „multiple cloning site“, in welche die DNA-Fragmente eingefügt werden.

Für Klonierungsarbeiten wurden folgende Vektoren benutzt:

Vektor	Verwendung
pDrive	Sequenzanalyse der PCR-Fragmente
pcDNA3.1 (+) (Invitrogen)	Expressionsvektor für EGFP-CSGQ und EGFP-SSGQ
pEGFP-C1 (Clontech)	Expressionsvektor für EGFP-Fusionsprotein
pEGFP-N3 (Clontech)	Expressionsvektor für EGFP-Fusionsprotein

3.2.4 Wirtsbakterien

Als Wirtsbakterien wurden die vom E.coli K12 Stamm abgeleiteten Stämme DH5 α , JM109 und XL1-Blue verwendet.

3.2.5 Ligation

Bei der Klonierung der DNA-Fragmente in die Vektoren wurde eine gereinigte T4-DNA-Ligase verwendet. Das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor sollte 3:1 betragen. Die Inkubation erfolgte bei 14°C über Nacht.

Als Standardansatz wurde verwendet:

- x µl Insert
- y µl Vektor
- 1 µl Ligationspuffer 10x
- 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl)
- ad 10 µl H₂O_{bd}

Zusammensetzung des Ligationspuffers (Fermentas, St. Leon-Rot):

- 400 mM Tris-HCl, pH 7,8
- 100 mM MgCl₂
- 100 mM DTT
- 5 mM ATP

Anschließend wurde der gesamte Ligationsansatz ohne weitere Behandlung in kompetente Zellen transformiert.

3.2.6 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Als kompetente Zellen werden Bakterienzellen bezeichnet, welche durch spezielle Behandlung, wie durch hohe Konzentrationen zweiwertiger Kationen, in der Lage sind, Plasmide aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Dabei nimmt jede kompetente Zelle in der Regel nur ein einziges Plasmidmolekül auf. Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden zunächst nichtkompetente Bakterien auf einer Agarplatte ohne Zusatz von Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 3 ml LB-Medium bei 37°C über Nacht inkubiert.

500 µl dieser Übernachtskultur wurden am nächsten Tag in einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium überführt. Unter Schütteln bei 37°C wuchs diese Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5. Anschließend wurde die Bakterienkultur 10 Minuten auf Eis gestellt und in vier vorgekühlte 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4.000 rpm bei 4°C für 6 Minuten gesammelt, der Überstand verworfen und die Pellets in je 20 ml kalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 6 Minuten bei 4.000 rpm und 4°C wurde das Pellet in 10 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei gleichbleibenden Parametern wurde das Pellet in 2 ml kalter 1,0 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Den kompetenten Zellen wurde nun je 300 µl autoklaviertes Glycerin zugegeben, die Lösung zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.7 Transformation

Unter Transformation versteht man das Einbringen exogener DNA in Bakterienzellen. Die kompetenten Zellen wurden zunächst auf Eis für 10 Minuten aufgetaut und anschließend mit der zu transformierenden DNA versetzt. Dazu wurde entweder der Ligationsansatz oder 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNA verwendet. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis, wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten auf 42°C erhitzt, anschließend für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 600 µl LB-Medium (ohne Antibiotikazusatz) wurde der Ansatz für eine Stunde bei 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurde ein Teil der Bakterien auf einer Agarplatte, welche ein Antibiotikum enthielt, das sich nach dem jeweiligen Resistenzgen des Vektors richtete, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.8 Plasmid-DNA-Präparation

Zur Identifizierung positiver Kolonien wurden von der Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher Einzelkolonien gepickt und in 3 ml antibiotikumhaltigem LB-Medium bei 37°C über Nacht im Brutschrank „Über-Kopf-rollend“ inkubiert. 2 ml dieser Übernachtskultur wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Plasmid-DNA-Präparation wurde mit Puffern der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Nach Zentrifugation wurden die Sedimente im Resttropfen resuspendiert, mit 300 µl Puffer P1 versetzt und im Vortex gemischt. Zur Lyse wurden 300 µl Puffer P2 zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Proteine zu fällen und die Lösung zu neutralisieren, wurden 300 µl Puffer P3 hinzupipettiert, gemischt und für 20 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße pipettiert und zur DNA-Fällung mit 600 µl Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation für 30 Minuten bei 14.000 rpm und 4°C wurde das Pellet mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Sediment wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl TE gelöst. Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurden Midi- und Maxi-Kits der Firma Qiagen verwendet. Für die Herstellung endotoxinfreier Plasmidpräparationen wurde ebenfalls ein Midi-Kit der Firma Qiagen benutzt. Die Plasmidgewinnung erfolgte nach dem entsprechenden Protokoll, wobei das Prinzip dem der Plasmidpräparation im kleinen Maßstab entspricht. Es wurden lediglich größere Mengen an Übernachtskulturen und Puffern verwendet. Nach Zugabe des Puffers P3 erfolgte jedoch keine Zentrifugation sondern eine Gewinnung des klaren Überstands mit Hilfe eines Filters. Für die endotoxinfreie Präparation wurde nach der Filtrierung der Puffer ER, welcher eine Bindung von LPS-Molekülen verhindert, zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert.

3.2.9 DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Zur Analyse der durch die Plasmidpräparation gewonnenen DNA wurde 1 µg dieser DNA mit 1 U des entsprechenden Enzyms für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dadurch wurde die doppelsträngige DNA von den Restriktionsendonukleasen an spezifischen Stellen

hydrolysiert. Anschließend konnte mittels Agarosegelelektrophorese das Muster der entstandenen Fragmente analysiert werden.

Folgender Standardansatz wurde verwendet:

1 µg DNA

1 U Restriktionsenzym

1 µl Puffer (Zusammensetzung des Puffers spezifisch für jedes Enzym)

1 µl BSA

ad 10 µl H₂O_{bd}

3.2.10 Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA konnte durch Agarosegelelektrophorese analysiert werden, da durch diese Methode die Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt werden. Je nach zu erwartender Fragmentgröße wurden unterschiedliche Agarosegelkonzentrationen zwischen 0,6 und 1,5% verwendet, wobei die Konzentrationen mit zunehmender Fragmentgröße abnehmen. Die Agarose wurde in 1% TAE-Puffer aufgekocht und gelöst. Die DNA-Fragmente wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert.

3.2.11 Glycerinstock

Um die positiven Klone über längere Zeit lagern zu können, wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß 850 µl der frischen Übernachtskultur mit 150 µl autoklaviertem Glycerin vermischt und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C. Zur Animpfung einer neuen Kultur wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein Teil des Glycerinstocks abgekratzt und in einen Erlenmeyerkolben mit LB-Medium, welches

das entsprechende Antibiotikum enthielt, gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 200 rpm für 16 Stunden.

3.2.12 Phenolisierung

Um für nachfolgende Sequenzreaktionen den Reinheitsgrad der DNA zu erhöhen, wurde diese nach der Präparation phenolisiert. Dazu wurde zur Volumenvergrößerung 1 Volumen TE-Puffer hinzugegeben. Nach Zugabe von 1 Volumen Phenol pH 8,0 wurde die Suspension für 10 Minuten durch wiederholtes Aufschütteln gut vermischt. Anschließend erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 4°C für 10 Minuten. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und mit 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol pH 8,0 versetzt. Wiederum erfolgte eine gute Durchmischung für 10 Minuten und eine anschließende Zentrifugation bei gleichen Bedingungen. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, der Rest verworfen.

3.2.13 DNA-Fällung

Für die Sequenzanalyse musste die DNA gefällt werden. Dazu wurden 2 µg der entsprechenden DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzt, gemischt und für eine Stunde bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch bei maximaler Geschwindigkeit für 30 Minuten und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und zur Sequenzanalyse zu MWG (Ebersberg) verschickt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Kultivierung der Zellen

Für die Versuche wurden COS7-Zellen sowie Medien der Firma PromoCell verwendet. COS7-Zellen sind Zellen einer Nierenzelllinie der grünen Meerkatze mit defizientem Glukokortikoidrezeptor. Die Zellen wurden in Schalen mit 10 cm Durchmesser bei 37°C und 5% CO₂ in einem Inkubator der Firma Heraeus kultiviert. Für das Splitten wurde 1 ml Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und nach der Ablösung der Zellen zur Neutralisation Medium beigemischt. Die Zellen wurden anschließend entsprechend der Dichte in neue Schalen ausplattiert.

3.3.2 Ausplattieren der Zellen

Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Durch Versetzen mit 1 ml Trypsin/EDTA wurden die Zellen abgelöst und anschließend mit 9 ml Medium versetzt. Die Anzahl der Zellen wurde mit Hilfe einer Zählkammer ermittelt. Für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung wurden die Zellen nun in 24-well-Platten ausplattiert, wobei pro well 30.000 Zellen verwendet wurden. Für die Zellfraktionierung wurden je 400.000 Zellen pro Schale mit 10 cm Durchmesser ausplattiert und zwei Tage inkubiert. Pro Versuchsansatz wurden 3 Schalen verwendet.

3.3.3 Klonierung der Konstrukte für die Lokalisationsstudien

Für die Klonierungen wurde ein cDNA-Klon (Pröls et al. 2001) verwendet, welcher aus differenzierenden Rattenendothelzellen gewonnen wurde. Die Primer wurden spezifisch für die jeweilige zu amplifizierende Sequenz von Hand, das heißt ohne Computerprogramm, konstruiert.

Klonierung des Mdg1(96-221) in pEGFP-N3

Mit den Primern Mdg1 fwd AA96 5'- CTC GAG ATG GGC AAA GGA CAA AGA AGC AAT GG -3' und Mdg1 GFP RI/931 5'- AGA ATT CTG TCC TGA ACA GTC -3' wurden die C-terminalen 400 bp von Mdg1, ausgehend vom cDNA-Klon, amplifiziert und in pDrive subkloniert. Nach Sequenzanalyse wurde das Fragment über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pEGFP-N3 ligiert.

Klonierung des Mdg1(96-222) in pEGFP-C1

Mit den Primern GKGQ/930 fwd XhoI 5'- TCT CGA GGA AAA GGA CAA AGA AG -3' und Mdg1 pEGFP-RI/3' 931 5'- CCG GAA TTC TAC TGT CCT GAA -3' wurden die C-terminalen 400 bp von Mdg1, ausgehend vom cDNA-Klon, bei einer Annealingtemperatur von 53°C amplifiziert und in pDrive subkloniert. Nach Sequenzanalyse wurde das Fragment über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pEGFP-C1 ligiert.

Klonierung des Mdg1 (154-221) in pEGFP-N3

Mit den Primern Mdg1 fwd AA160 5'- CTC GAG ATG GGA GGT GGA TTG TTT GAT GAT ATG -3' und Mdg1 GFP RI/931 5'- AGA ATT CTG TCC TGA ACA GTC -3' wurde der c-terminale Aminosäureabschnitt 154 bis 221 von Mdg1, ausgehend vom cDNA-Klon, amplifiziert und in pDrive subkloniert. Nach Sequenzanalyse wurde das Fragment über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pEGFP-N3 ligiert.

Klonierung des Mdg1 (154-222) in pEGFP-C1

Mit den Primern DP GGGLF in 930 XhoI 5'- TCT CGA GCT GGA GGT GGA TTG TTT GAT GA -3' und DP CSGQ in 930 RI 5'- GAA TTC CTA CTG TCC TGA ACA GTC G -3' wurde der C-terminale Aminosäureabschnitt 154 bis 222 Mdg1, ausgehend vom cDNA-Klon, bei einer Annealingtemperatur von 60°C amplifiziert und in pDrive subkloniert. Nach Sequenzanalyse wurde das Fragment über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pEGFP-C1 ligiert.

Klonierung des Mdg1 (96-153) in pEGFP-N3

Mit den Primern AA96 5'-CTC GAG ATG GGC AAA GGA CAA AGA AGC AAT GG-3' und GGGLrev 5'-AGA ATT CAA TCC ACC TCC AAA AGA-3' wurde der C-terminale Aminosäureabschnitt 96 bis 153 von Mdg1, ausgehend vom cDNA-Klon, amplifiziert und in pDrive subkloniert. Nach Sequenzanalyse wurde das Fragment über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pEGFP-N3 ligiert.

Klonierung des Mdg1 (125-180) in pEGFP-N3

Mit den Primern DP GQN-Mdg1 fwd 5'- CTC GAG ATG GGT CAG AAC CAG AAC-3' und DP FSG-Mdg1 rev 5'- GAA TTC AAG CCA CTA AAA GAA AAC AT-3' wurde der C-terminale Aminosäureabschnitt 125 bis 180 Mdg1, ausgehend vom cDNA-Klon, amplifiziert und in pDrive subkloniert. Nach Sequenzanalyse wurde das Fragment über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pEGFP-N3 ligiert.

Klonierung des Mdg1 (1-95) in pEGFP-N3

Mit den Primern Mdg1-HindIII fwd 02 5'- AAG CCT CGA TGG CAA CTC CAC AGT CAG TTT-3' und Mdg1-J rev BamHI 5'- GAA TCC AAT AGT AAA AGC GTG TGT CC-3' wurde die J-Domäne inklusive der vorderen 26 Aminosäuren des Mdg1, ausgehend vom cDNA-Klon, bei einer Annealingtemperatur von 63°C amplifiziert und in pDrive subkloniert. Nach Sequenzanalyse wurde das Fragment über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pEGFP-N3 ligiert.

Klonierung von EGFP-CSGQ in pcDNA 3.1 (+)

Mit den Primern GFP fwd in pcDNA 3.1 (+) mit Eco RI 5'- GAA TTC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG -3' und CSGQ-XhoI in GFP 5'- CTC GAG CTA CTG TCC TGA ACA GTC GAG TCC GGA CTT -3' wurde CSGQ-GFP, ausgehend vom Vektor pEGFP-C3, bei einer Annealingtemperatur von 65°C amplifiziert, in pDrive subkloniert und die Sequenz analysiert. Anschließend erfolgte die Ligierung in pcDNA 3.1 (+) über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI*.

Klonierung von EGFP-SSGQ in pcDNA 3.1 (+)

Mit den Primern GFP fwd in pcDNA 3.1 (+) mit Eco RI 5'- GAA TTC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG -3' und SSGQ-XhoI in GFP 5'- CTC GAG CTA CTG TCC TGA TGA GTC GAG TCC GGA CTT -3' wurde SSGQ-GFP, ausgehend vom Vektor pEGFP-C3, bei einer Annealingtemperatur von 65°C amplifiziert, in pDrive subkloniert und die Sequenz analysiert. Anschließend erfolgte die Ligierung in pcDNA 3.1 (+) über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI*.

Bei allen Konstrukten wurde, soweit nicht anders angegeben, die Annealingreaktion bei einer Temperatur von 55°C durchgeführt. Die Zyklenzahl der PCR betrug bei allen Konstrukten 35 Zyklen. Im Anschluss an die PCR wurde ein Aliquot von 10 µl auf ein Agarosegel aufgetragen, um zu kontrollieren, ob durch die PCR das richtige Fragment amplifiziert wurde und keine weiteren Fragmente zusätzlich vorliegen. Nach Ligation in den Vektor pDrive und Plasmidgewinnung wurde ein positiver Klon sequenziert. Nach Überprüfung der Sequenz auf Richtigkeit wurde das Insert mittels der spezifischen Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* isoliert und in einen neuen Vektor, den Expressionsvektor ligiert. Dabei wurden die Vektoren pEGFP-C1 und pEGFP-N3 verwendet, bei denen EGFP einmal C-terminal und einmal N-terminal der multiple cloning side liegt. Somit konnten die Mdg1-Konstrukte C -oder N-terminal des EGFP kloniert werden. Nach Isolierung eines positiven Klons erfolgte wiederum eine Sequenzierung zur Kontrolle der korrekten Sequenz und des Leserasters.

3.3.4 Transfektion von COS7-Zellen

Die Zelltransfektion fand 24 Stunden nach Ausplattieren der Zellen statt. Dazu wurde als Transfektionsreagenz Polyfect der Firma Qiagen verwendet. Zunächst wurde DMEM ohne Zusätze mit der zu transfizierenden DNA versetzt und auf dem Vortex geschüttelt. Nach Zugabe von Polyfect wurde das Gemisch nochmals für 10 Sekunden auf dem Vortex gemischt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde Medium mit Zusätzen zugegeben, zu den mit PBS gewaschenen Zellen pipettiert und mit Medium aufgefüllt.

Für die 24-well-Platten wurde folgender Ansatz verwendet:

- 150 µl DMEM
- 2,5 µg DNA
- 15 µl Polyfect
- 650 µl Medium

Von diesem Ansatz wurden pro Vertiefung 150 µl pipettiert und mit 500 µl Medium aufgefüllt.

Für die Schalen mit 10 cm Durchmesser wurde folgender Ansatz verwendet:

- 275 µl DMEM
- 4 µg DNA
- 25 µl Polyfect
- 1.000 µl Medium

Der gesamte Ansatz wurde in die Schale mit 10 cm Durchmesser pipettiert und mit 7 ml Medium versetzt.

3.3.5 Hitzeschock

Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 43°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank inkubiert.

3.3.6 Fixieren der transfizierten Zellen

Die 24-well-Platten wurden direkt vom Inkubator auf Eis gestellt und das Medium abgenommen. Die Zellen wurden einmal mit PBS und anschließend einmal mit 4% PFA (Roth) gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde Bisbenzimid (Hoechst 33342, Sigma-Aldrich), im Verhältnis 1:1.000 in 4% PFA gelöst, verwendet. Pro Vertiefung wurden 500 µl zugegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Abnahme des Bisbenzimid wurde 300 µl PBS auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur für 5 bis 10 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Eindeckelung der Zellen mit 3 µl Mobiglow (MobiTech GmbH, Göttingen). Nach Trocknung des Mobiglow über Nacht bei 4°C wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert und fotografiert.

3.3.7 Tiere

Für die Versuche wurden Mäuse des Stammes C57/Bl6 von Charles River Laboratories verwendet. Die adulten Mäuse waren 2 Monate alt, 20 bis 22 g schwer und weiblich. Für die Untersuchungen an embryonalen bzw. fetalen Stadien wurden die Embryonen bzw. Feten am Tag 9, 12 und 18 nach der Bedeckung entnommen, wobei der Tag, an dem ein Plug sichtbar wurde, als Tag 0,5 angenommen wurde. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen mit regelmäßiger Nahrungs- und Wasserzufuhr gehalten. Die Haltung der Tiere sowie die Entnahmen der Organe und der verschiedenen Entwicklungsstadien fanden in den Räumen des Instituts für Anatomie und Zellbiologie I der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg statt. Die Tötung der Tiere wurde dem Regierungspräsidium Freiburg ordnungsgemäß angezeigt.

3.3.8 Organentnahme und Fixation

Die Mäuse wurden mittels CO₂ betäubt, durch Genickbruch getötet und das Abdomen sowie der Thorax anschließend in der Medianen eröffnet. Die Organe wurden herauspräpariert und zur Fixation in Serra überführt. Die Embryonen und Feten wurden

durch Eröffnung des Uterus freigelegt und entnommen. Embryonen am Tag 9 wurden zum Teil zusammen mit dem Uterus in Serra fixiert. Am nächsten Tag erfolgte die Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe. Dabei wurden die Präparate zunächst in 70%igem, dann in 80%igem, 90%igem, 95%igem und anschließend in 100%igem Alkohol für jeweils 30 Minuten inkubiert. Über Nacht erfolgte eine Inkubation in Rotihistol (Lösungsmittel mit Orangerterpenen als Ersatz für Xylol der Firma Roth). Die Präparate wurden anschließend in flüssiges Paraffin überführt und darin über 24 Stunden belassen. Am nächsten Tag erfolgte die Einbettung in Paraffin.

3.3.9 Anfertigung der Schnitte

Von den Präparaten wurden 5 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf „Superfrost-Objektträger“ aufgezogen. Die Trocknung erfolgte über Nacht bei 60°C im Brutschrank.

3.3.10 Immunhistologie

Die Anfärbung der Schnitte mit einem spezifischen Antikörper gegen Mdg1 erfolgte mittels der Super-Sensitiv-Methode (BioGenex). Dazu wurden die Schnitte zunächst zweimal für fünf Minuten in Rotihistol (Roth) entparaffiniert und anschließend zweimal für zwei Minuten in 100%igem Alkohol rehydriert. Zur Blockierung wurden die Objektträger 30 Minuten in 50 ml Methanol mit 500 µl H₂O₂ gegeben. Nach Spülung mit destilliertem Wasser und Inkubation in PBS mit DMSO wurden die Präparate sechs Minuten in Citratpuffer (pH 6) gekocht, wodurch die Epitope, welche durch die Fixierung und Paraffineinbettung des Gewebes maskiert wurden, für den Antikörper wieder zugänglich wurden. Um unspezifische Bindungsstellen für den folgenden Antikörper zu blockieren, wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 1%igem BSA inkubiert. Der nun zugegebene Mdg1-Antikörper (1:1.000 in PBS) konnte nur an spezifische Bindungsstellen binden. Die Objektträger verblieben für eine Stunde in der feuchten Kammer. Anschließend wurde für 20 Minuten ein sekundärer Antikörper („Link“), an den ein Enzym gebunden war, zugegeben. Nach Entfernen dieses Antikörpers folgte eine

Inkubation für weitere 20 Minuten mit einem Peroxidase-Anti-Peroxidasekomplex („Label“), welcher das Markierungsenzym enthielt. Durch Inkubation für 15 Minuten in Chromogen konnte die Farbreaktion deutlich gemacht werden, da das in der Chromogenlösung enthaltene Aminoethyl-Carbazol ein Substrat der Peroxidase darstellt und durch diese umgesetzt wird. Zur Kerngegenfärbung wurden die Objektträger für 30 Sekunden in Hämalaun gegeben und anschließend unter fließendem Wasser abgepült. Die Objektträger wurden schließlich in Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck) eingedeckelt.

Für die Anfertigung der Negativkontrollen wurde das gleiche Protokoll verwendet, allerdings die Schnitte anstelle des Erstantikörpers mit PBS inkubiert.

Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Zeiss-Mikroskop „Anxioskop“ bei 4-, 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung analysiert und mit einer Leica-Kamera fotografiert. Dabei wurden pro Organ etwa 20 Fotografien verschiedener Vergrößerungen angefertigt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Fraktionierung

Zur Untersuchung der Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle wurde eine Zellfraktionierung mit einem Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Es wurden pro Ansatz COS7-Zellen von drei Schalen mit 10 cm Durchmesser verwendet, so dass etwa 500.000 Zellen analysiert wurden. Vor Durchführung der Fraktionierung wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert, ob tatsächlich eine Transfektion der Zellen stattgefunden hat und ob genügend Zellen transfiziert wurden. Das Medium wurde anschließend vorsichtig abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Pro Schale wurde 1 ml Trypsin/EDTA hinzugegeben und die Zellen von der Schale abgelöst. Durch Zugabe von PBS wurden die Zellen abgespült, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 4°C und 500 g für 10 Minuten geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde CE1-Puffer zugegeben und für 10 Minuten bei 4°C „Über-Kopf-rollend“ inkubiert. Der Puffer brach die Plasmamembran auf, ohne diese zu lösen. Somit entsprach die erste Fraktion den zytosolischen Proteinen. Nach Zentrifugation bei 4°C und 1.000 g für 10 Minuten wurde die erste Fraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu den Zellen wurde nun CE2-Puffer hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4°C „Über-Kopf-rollend“ inkubiert. Dadurch wurden die Plasmamembran sowie alle Membranen der Zellorganellen, außer der Kernmembran, gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 6.000 g wurde diese membranständige Fraktion in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mit 7 µl Benzoase und 13 µl H₂O_{bd} versetzt. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurde CE3-Puffer hinzugegeben und das Zellgemisch für 10 Minuten bei 4°C „Über-Kopf“ gerollt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 6.800 g und der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch den Puffer CE3 wurden alle membrangebundenen Kernproteine gelöst, so dass sich alle gelösten und gebundenen Kernproteine in dieser Fraktion befanden. Das Sediment wurde in CE4-Puffer gelöst, wodurch alle übrigen Proteine, welche hauptsächlich den Proteinen des Zytoskeletts entsprachen, in Lösung gebracht wurden.

3.4.2 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen diente die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Gele bestanden aus einem Sammelgel und einem Trenngel, welche je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine verschiedene Konzentrationen von Acrylamid enthielten. Die hier verwendeten Gele mit einer Konzentration von 14% wurden nach folgender Anleitung hergestellt:

Sammelgel:

- 2,25 ml Acrylamid 40%
- 3 ml 1M Tris, pH 6,7
- 240 µl 10% SDS
- 18,4 ml H₂O_{bd}
- 36 µl TEMED
- 300 µl APS 10%

Trenngel:

- 15,75 ml Acrylamid 40%
- 5,6 ml 3M Tris, pH 8,9
- 450 µl 10% SDS
- 23,2 ml H₂O_{bd}
- 67,5 µl TEMED
- 225 µl APS 10%

Zunächst wurde das Trenngel fertig gestellt, in die Apparatur gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Polymerisation wurden die Lösungen für das Sammelgel vermischt und in die Kammern gegeben. Anschließend wurden die Kämme eingesetzt, um später die Taschen zur Einfüllung der Proben zu erhalten.

Die Proteinproben wurden in 4x Probenpuffer aufgenommen, 10 Minuten bei 100°C erhitzt und in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Als Längenmarker wurde der Protein MW Marker der Firma peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen) verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in 1x Laufpuffer bei 25 mA pro Gel durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

3.4.3 Western-Blot

Nach Auftrennung der Proteine im Acrylamidgel wurden diese im "semidry"-Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Parablot NCL, Macherey-Nagel) transferiert. Dazu wurde das Gel in einer Blot-Apparatur luftblasenfrei zwischen Anoden- und Kathodenplatte geschichtet, so dass die Geloberfläche der Kathodenseite zugewandt war. Die Filterpapiere, welche zwischen den Platten und dem Gel lagen, waren in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt. Dem Gel lag auf der Anodenseite eine Nitrocellulosemembran an. Der Proteintransfer erfolgte bei 50 mA pro Gel für 60 Minuten. Anschließend wurde der Blot mit Ponceau S-Lösung, einem anionischen, hydrophilen Diazofarbstoff, angefärbt und in Wasser gewaschen. Der Blot wurde bei 37°C für 60 Minuten mit 2% BSA/TBST blockiert und anschließend mit TBST gewaschen. Der Erstantikörper wurde in der jeweiligen Verdünnung (in 1% BSA/TBST) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Um eine ständige Benetzung der Membran sicherzustellen, fanden alle Inkubationen auf einem Rollenmischer statt. Nach Abnahme des Erstantikörpers und Waschungen mit TBST erfolgte die Zugabe des Zweitantikörpers, welcher mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war. Dieser wurde 1:20.000 verdünnt und für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach intensivem Waschen in TBST wurde der Blot mit 1 ml Luminol, 50 µl Cumarinsäure und 0,3 µl H₂O₂ versetzt und ein Röntgenfilm (HyperfilmTM MP, Amersham Bioscience) aufgelegt. Dieser wurde nach 10 bis 30 Sekunden Inkubationszeit entwickelt. Die Länge der Inkubationszeit richtete sich nach dem verwendeten Erstantikörper und der Intensität des Signals.