

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Bakterienstämme

Zur Klonierung von PCR-Produkten in Plasmidvektoren wurden *Escherichia coli* TOP10 One Shot Cells (Invitrogen), sowie DH5 $\alpha$  oder XL1 Blue verwendet. Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen).

### 6.2 Plasmid-Vektoren

pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO	Invitrogen
pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO	Invitrogen
pcDNA3.1(+)	Invitrogen
pCRII-TOPO	Invitrogen
pMAL-c2x	NEB

### 6.3 Reagenzien

#### 6.3.1 Chemikalien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen und waren von analytischem Reinheitsgrad. Peptide wurden von der Firma Genosys bezogen.

Acetonitril (HPLC-Grad)	Fluka
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
ATP	Sigma
Agar	Oxoid
Ameisensäure	Fluka
BCIP	Biomol
BSA	Sigma A 2934
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva

$\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure	Sigma
Crosslinker: DMA, DTBP, DTSSP, SPDP, S-LC-SMPT	Sigma
DEPC	Sigma
dNTPs	Invitrogen, NEB
DTT	Sigma
Ethidiumbromid	Biomol
Hefeextrakt	ICN
Iodacetamid	Sigma
IPG-Buffer (3-10 NL/L)	Amersham Pharmacia
IPTG	Sigma
Geneticin (G-418 Sulphate)	Gibco-BRL
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
NBT	Biomol
PMSF	Serva
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete <sup>™</sup>	Boehringer Mannheim
Ponceau S	Sigma
Pyridin	Roth
Trifluoressigsäure	Fluka
Tris	Roth
TRIZOL Reagent	Life Technologies
Trypton	ICN
Xylencyanol	Serva

### 6.3.2 Kits und Marker

1-kb-DNA-Längenstandard	Gibco-BRL und
100-bp-DNA-Längenstandard	MBI Fermentas
ABI PRISM <i>BigDye</i> Terminator	
Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
EndoFree <sup>™</sup> Plasmid Maxi Kit	Qiagen
GFX <sup>™</sup> Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Pharmacia
Lipofectamin Plus <sup>™</sup> Reagent	Life Technologies
Lipofectamin 2000	Life Technologies

QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit	Qiagen
FirstChoice™ RLM-RACE Kit	Ambion
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
RNeasy Midiprep	Qiagen
SuperSignal West Pico	Pierce
Proteinmarker (high und low)	Sigma
QuickChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
UltraClean DNA Purification Kit	MoBio Laboratories, Inc.

### 6.3.3 Enzyme

Molekularbiologische Enzyme wie z.B. Restriktionsendonukleasen und -puffer wurden von den Firmen New England Biolabs oder Life Technologies bezogen.

Benzonase	Merck
DNase I	Life Technologies
Endoglycosidase H	Boehringer, NEB
Lysozym	Sigma
N-Glycanase F, PNGaseF	Glyco, Inc., NEB
RNase H	TaKaRa
Superscript II (Reverse-Transkriptase)	Gibco-BRL
<i>Taq2000</i> ™ DNA Polymerase	Stratagene
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Promega
T4-DNA-Ligase	Life Technologies
Trypsin (Sequenzierungsgrad)	Sigma
<i>Pfu Turbo</i> -DNA-Polymerase	Stratagene

### 6.3.4 Oligonukleotide

Oligonukleotide für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) oder für Sequenz-Reaktionen wurden von den Firmen InViTek, TIB Molbiol oder MWG Biotech synthetisiert. Oligo(dT)-Primer zur reversen Transkription wurden von der Firma Ambion oder Invitrogen Life Technologies verwendet.

Im den folgenden Tabellen bedeuten:

F = Forward, R = Reverse, E = *EcoRI*, X = *XbaI*, \* = pcDNA3.1, r = Ratte, m = Maus, CT = C-Terminus, NT = N-Terminus, TM = Transmembransequenzen

#### Universalprimer für die Sequenzierung:

Name	Sequenz	Vektor
malE F	5' -ggtcgctcagactgtcgatgaagcc-3'	pMAL-c2x
M13/pUC R	5' -cgccagggttttcccagtcacgac-3'	pMAL-c2x
M13 -20 F	5' -gtaaaacgacggccagt-3'	pCRII-TOPO
M13 R	5' -caggaaacagctatgacc-3'	pCRII-TOPO
T7 F	5' -taatacgaactcactataggg-3'	pcDNA3.1(+); */CT-GFP-TOPO
pcDNA3.1 R	5' -tagaaggcacagtcgagg-3'	pcDNA3.1(+); */NT-GFP-TOPO
GFP F	5' -cgacacaatctgccctttcg-3'	*/NT-GFP-TOPO
GFP R	5' -gggtaagctttccgtagtagc-3'	*/CT-GFP-TOPO

#### Spezifische Primer für TRPV1 der Ratte (Acc. No.: AF029310):

Klonierung von TRPV1 aus Ratten-DRG Gesamt-RNA in pcDNA3.1 und */CT- oder NT-GFP-TOPO			
<i>EcoRI</i> rVR1F	5' -gcgcg <b>gaattc</b> tggaaagg <b>atg</b> gaacaacg-3'	Klonierung	von
<i>XbaI</i> rVR1R	5' -gcgct <b>tctaga</b> <b>tt</b> atttctcccctgggacc-3'	TRPV1	in
TOPO-VR1F	5' - <b>atg</b> gaacaacgggctagctt-3'	pcDNA3.1(+)	
TOPO-VR1R/CT	5' -tctcccctgggaccatggaa-3'	Klonierung	von
TOPO-VR1F	5' - <b>atg</b> gaacaacgggctagctt-3'	TRPV1	in
TOPO-VR1R/NT	5' - <b>tt</b> atttctcccctgggacca-3'	*/CT-	GFP-TOPO
		Klonierung	von
		TRPV1	in
		*/NT-	GFP-TOPO

Mutagenese der Glycosylierungsstelle in pcDNA3.1/TRPV1		
VR1 1811 A/C F	5' -gattgaggatgggaaga <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">C</span> taactctctgcctatgg-3'	Mutagenese von TRPV1 A1811C
VR1 1811 A/C R	5' -ccataggcagagagtta <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">G</span> tcttcccatcctcaatc-3'	
Klonierung von TRPV1 NT oder CT <u>ohne</u> TM in pMAL-c2x und pcDNA3.1(+)		
rVR1 NFE 1-17	5' -gcgcgaattcatggaacaacgggctag-3'	Klonierung der kodierenden Sequenz des NT von TRPV1
rVR1 NRX 1281-93	5' -gcgctctagattacttgacaaatctg-3'	
rVR1 NF 1-20	5' -atggaacaacgggctagctt-3'	Amplifikation des NT (1293 bp) von TRPV1
rVR1 NR 1275-93	5' -ttacttgacaaatctgtcccac-3'	
rVR1 CFE 2044-60	5' -gcgcgaattcatgggtgagaccgtcaa-3'	Klonierung der kodierenden Sequenz des CT von TRPV1
rVR1 CRX 2500-17	5' -gcgctctagattatttctcccctgggac-3'	
rVR1 CF 2044-63	5' -atgggtgagaccgtcaacaa-3'	Amplifikation des CT (474 bp) von TRPV1
rVR1 CR 2498-2517	5' -ttatttctcccctgggacca-3'	
Klonierung von TRPV1 NT oder CT <u>mit</u> TM in */CT-GFP-TOPO		
TOPO-VR1F	5' -atggaacaacgggctagctt-3'	Klonierung von TRPV1 NT+TM
rVR1 NT 2052-71R	5' -gtgcaatcttgttgacggtc-3'	
rVR1 CT 1260-81F	5' -atgctcctacaggacaagtgggac-3'	Klonierung von TRPV1 CT+TM
rVR1 CT 2494-2515R	5' -ctttctcccctgggaccatgg-3'	
VR1 NT mutF	5' -accgtcaacaagattgca <span style="color: blue;">taa</span> gggcaattctgcag-3'	Mutagenese <b>STOP</b> vor GFP in TRPV1-NT+TM
VR1 NT mutR	5' -ctgcagaattgccctta <span style="color: blue;">t</span> tgcaatcttgttgacggc-3'	
VR1 CT mutF	5' -ccaggggagaaa <span style="color: blue;">taa</span> gggcaattctgcagatatoc-3'	Mutagenese <b>STOP</b> vor GFP in TRPV1-CT+TM
VR1 CT mutR	5' -ggatatctgcagaattgccctta <span style="color: blue;">t</span> tttctcccctgg-3'	
Überlappende Sequenzprimer für TRPV1		
rVR1 NF 1-20	5' -atggaacaacgggctagctt-3'	Sequenzierung
rVR1 NR 1275-93	5' -ttacttgacaaatctgtcccac-3'	Sequenzierung
rVR1 CT 1260-81F	5' -atgctcctacaggacaagtgggac-3'	Sequenzierung
rVR1 NT 2132-51R	5' -gtgcaatcttgttgacggtc-3'	Sequenzierung
rVR1 CF 2044-63	5' -atgggtgagaccgtcaacaa-3'	Sequenzierung
rVR1 CR 2498-2517	5' -ttatttctcccctgggacca-3'	Sequenzierung

**Spezifische Primer für TRPV2 der Ratte (Acc. No.: AF129113):**

Klonierung von TRPV2 aus Rattenhirn-RNA in */CT-GFP-TOPO			
rVRL-1 1-24F	5'- <b>atg</b> acttcagcctccagccccca-3'	Klonierung von TRPV2	
rVRL-1 2257-80R	5'-gggactggaggacctgaagggca-3'		
rVRL-1 mutF	5'-tcaggtcctccagtccc <b>ctta</b> agggcaattctgcagat-3'	Mutagenese vor GFP in TRPV2	STOP
rVRL-1 mutR	5'-atctgcagaattgcc <b>ttagg</b> gggactggaggacctga-3'		
Klonierung von TRPV2 CT <u>ohne</u> TM in pMAL-c2x und pcDNA3.1(+)			
rVRL-1 FE 1933-53	5'-gcg <b>gaattcatg</b> agcgaaactgtcaaccac-3'	Klonierung von TRPV2 CT	
rVRL-1 RX 2269-86	5'-gcg <b>tctagatc</b> agggggactggaggac-3'		
Klonierung von TRPV2 NT oder CT <u>mit</u> TM in */CT-GFP-TOPO			
rVRL-1 1-24F	5'- <b>atg</b> acttcagcctccagccccca-3'	Klonierung von TRPV2 NT+TM	
rVRL-1 1948-71R	5'-tccagctgttgctcagcaacgtggt-3'		
rVRL-1 1146-69F	5'- <b>atg</b> caggagaaatgggatcggctcgtc-3'	Klonierung von TRPV2 CT+TM	
rVRL-1 2257-80R	5'-gggactggaggacctgaagggca-3'		
Klonierung weiterer TRPV2-Deletionsmutanten in durch Mutagenese von */TRPV2			
rVRL-1_E701F	5'-gatggtacccctgattagcgtggtgcttcaggg-3'	Klonierung von TRPV2 (1-700aa)	
rVRL-1_E701R	5'-accctgaagcaccagcgtaatcaggggtaccatc-3'		
rVRL-1_K735F	5'-gcatcactggtaattaaagaacccaacctctaaa-3'	Klonierung von TRPV2 (1-734a)	
rVRL-1_K735R	5'-tttagaggttgggttcttttaattaccagtgatgc-3'		
Mutagenese der Glycosylierungsstelle in */TRPV2			
N-571-F	5'-caaagcccctgaagata <b>ca</b> actccacagtgacgg-3'	Mutagenese zu TRPV2 N571T	
N-571-R	5'-ccgtcactgtggag <b>gt</b> tatcttcaggggctttg-3'		
N-572-F	5'-caaagcccctgaagata <b>ca</b> ctccacagtgacgg-3'	Mutagenese zu TRPV2 N5721T	
N-572-R	5'-ccgtcactgtggag <b>gt</b> gttatcttcaggggctttg-3'		
N-doppel-F	5'-caaagcccctgaagata <b>ca</b> <b>ca</b> ctccacagtgacgg-3'	Mutagenese zu TRPV2 NN571/2TT	
N-doppel-R	5'-ccgtcactgtggag <b>gt</b> <b>gt</b> tatcttcaggggctttg-3'		

Überlappende Sequenzprimer und Darstellung von TRPV2 in überlappenden PCR-Fragmenten		
rVRL-1 1-19F	5'- <b>atg</b> acttcagcctccagcc-3'	Sequenzierung
rVRL-1 34F	5'-ctggagacttccgatggaga-3'	Sequenzierung; PCR Fragment A (534 bp)
rVRL-1 568R	5'-catccgctccattctctacc-3'	
rVRL-1 549F	5'-ggtagagaatggagcggatg-3'	Sequenzierung; PCR Fragment B (656 bp)
rVRL-1 1205R	5'-accaagtagcaggcgaagtt-3'	
rVRL-1 1061F	5'-actcgggtgctggagatcatc-3'	Sequenzierung; PCR Fragment C (836 bp)
rVRL-1 1897R	5'-tgagaaggacgtaggccaac-3'	
rVRL-1 1618F	5'-ttcctgctggtctacctggt-3'	Sequenzierung; PCR Fragment D (633 bp)
rVRL-1 2251R	5'-cttcctctgaggcactgttc-3'	
rVRL-1 2286R	5'- <b>tca</b> gggggactggaggac-3'	Sequenzierung

Basen in **rot** geben die Erkennungssequenz für Restriktionsendonukleasen an.

### 6.3.5 Antikörper

#### Primäre Antikörper:

Spezifität	Spezies	# Nr. (Klon-Name)	Hersteller	Verdünnung
$\alpha$ -TRPV1 (NT 1-21); m, r	Rabbit	# PA1-747	ABR	1 :1000, WB + IF
$\alpha$ -TRPV1 (CT); r > h	Goat	# sc-8671 (R-18)	Santa Cruz	1 :1000, WB + IF
$\alpha$ -TRPV2 (CT 744-761); m, r	Rabbit	# PC421 (Ab-1)	Oncogene	1:100, WB + IF
$\alpha$ -GFP	Goat	# ab6673	Abcam	1:5.000, WB
$\alpha$ -MBP	Rabbit	# E8051S	NEB	1:20.000, WB
$\alpha$ -MAP1b; broad	Mouse	# M4528 (AA6)	Sigma	1:1000, WB
$\alpha$ -Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase $\beta$ 2; h, m, r	Mouse	# 610914 (35)	BD Transduction Labs	1:500, WB

#### Sekundäre Antikörper:

Spezifität	Spezies	# Nr. (Klon-Name)	Hersteller	Verdünnung
$\alpha$ -Mouse IgG AP-Konjugat	Goat	# A3688	Sigma	1:1000, WB
$\alpha$ -Mouse IgG HRP-Konjugat	Sheep	# A6782	Sigma	1:1000, WB
$\alpha$ -Rabbit IgG AP-Konjugat	Goat	# A3687	Sigma	1:1000, WB
$\alpha$ -Rabbit IgG HRP-Konjugat	Goat	# 111-035-003	Dianova	1:1000, WB
$\alpha$ -Rabbit IgG Cy <sup>2</sup> -Konjugat	Goat	# 111-225-003	Dianova	1:400, IF
$\alpha$ -Rabbit IgG Cy <sup>3</sup> -Konjugat	Goat	# 111-165-003	Dianova	1:400, IF
$\alpha$ -Goat IgG AP-Konjugat	Rabbit	# A4062	Sigma	1:1000, WB
$\alpha$ -Goat IgG HRP-Konjugat	Rabbit	# A5420	Sigma	1:1000, WB
$\alpha$ -Goat IgG Cy <sup>2</sup> -Konjugat	Rabbit	# 305-225-003	Dianova	1:400, IF
$\alpha$ -Goat IgG Cy <sup>3</sup> -Konjugat	Donkey	# 705-165-003	Dianova	1:400, IF

$\alpha$ - = anti-, AP = alkalische Phosphatase, Cy<sup>2</sup> = Cyanin, Cy<sup>3</sup> = Indocarbocyanin, HRP = Meerrettichperoxidase, WB = Westernblot, IF = Immunfluoreszenz, CT = C-Terminus, NT = N-Terminus

## 6.4 Medien, Lösungen und Puffer

### 6.4.1 Medien für die Molekularbiologie

<u>LB-Agar</u>	10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Agar, pH 7.0
<u>LB-Medium</u>	10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7.0
<u>LB/Glucose-Medium</u>	LB-Medium + 2 mM Glucose
<u>SOB-Medium</u>	20 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl
<u>SOB*-Medium</u>	SOB, 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub>
<u>SOC-Medium</u>	SOB*, 2 mM Glucose

Medien wurden autoklaviert und wenn erforderlich nach dem Abkühlen mit 50-100 µg/ml Ampicillin versetzt.

### 6.4.2 Lösungen und Puffer für die Molekularbiologie

<u>Amylose-Elutionspuffer</u>	10 mM Maltose, 50 mM PIPES pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0.2 mM MgCl <sub>2</sub>
<u>Amylose-Säulenpuffer</u>	20 mM Tris/HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1× Protease Inhibitor Cocktail
<u>Bakterien-Lysepuffer</u>	1 mg/ml Lysozym, 20% (w/v) Sucrose, 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1× Protease Inhibitor Cocktail
<u>Boil-Prep-Puffer</u>	15% (w/v) Saccharose, 0,01% (w/v) BSA, 0,01% (w/v) RNaseA, 2 mg/ml Lysozym; in TE-Puffer lösen
<u>6× DNA-Ladepuffer</u>	15% (w/v) Ficoll Typ 4000, 120 mM EDTA pH 8.0, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol FF
<u>DNA-Ladepuffer</u>	40% (w/v) Sucrose, 0,25% (w/v) Bromphenolblau (nicht-denaturierend)
<u>P1 Resuspensionspuffer</u>	100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0

<u>P2 Lysispuffer</u>	200 mM NaOH, 1% SDS
<u>P3 Neutralisationspuffer</u>	3 M KAc, pH 5.5
<u>QBT Äquilierungspuffer</u>	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7.0, 0,15% Triton X-100
<u>QC Waschpuffer</u>	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% Ethanol, pH 7.0
<u>QF Elutionspuffer</u>	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, 15% Ethanol, pH 8.5
<u>RF 1</u>	100 mM RbCl, 50 mM MnCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O, 30 mM KAc, 10 mM CaCl <sub>2</sub> × H <sub>2</sub> O, 15% (w/v) Glycerin, pH 6.8
<u>RF 2</u>	10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O, 15% (w/v) Glycerin, pH 6.8
<u>Salt-Solution</u>	1,2 M NaCl, 0,06 MgCl <sub>2</sub>
<u>1× TAE</u>	40 mM Tris/Ac pH 7.8, 1 mM EDTA pH 8.0
<u>1× TBE</u>	89 mM Tris/Borat pH 8.3, 2 mM EDTA pH 8,0

### 6.4.3 Lösungen und Puffer für die Proteinchemie

<u>ACS/BisTris-Puffer</u>	750 mM 6-Aminocaprinsäure, 50 mM BisTris
<u>Bradford-Reagenz</u>	0,06% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 42,8% (w/v) Perrchlorsäure
<u>Blotto</u>	5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-T, 0,02% (w/v) Natriumazid
<u>Blot-Puffer (Semidry)</u>	48 mM Tris/HCl, 39 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
<u>Blot-‘Stripping’</u>	62,5 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 100 mM β- Mercaptoethanol
<u>NBT/BCIP-Färbelösung</u>	0.61% (v/v) NBT, 0,33% (v/v) BCIP in TSM-Puffer
<u>Ponceau-S-Lösung</u>	2% (w/v) Ponceau S, 30% (w/v) Trichloressigsäure (TCA), 30% (w/v) Salicylsäure
<u>IP-Puffer</u>	20 mM Tris/HCl pH 8.0, 1% (w/v) Dodecylmaltosid, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF
<u>1× PBS</u>	4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl
<u>Solution A</u>	0,32 M Sucrose, 5 mM HEPES pH 7.4

<u>Solution B</u>	0,32 M Sucrose, 5 mM Tris-HCl pH 8.1
<u>Solution C</u>	0,32 M Sucrose, 1% Triton X-100, 12 mM Tris-HCl pH 8.1
<u>0,25 M STM-Puffer</u>	0,25 M Sucrose, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 5 mM MgSO <sub>4</sub>
<u>1× TBS</u>	20 mM Tris/HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 0,1% (v/v)
<u>1× TBS-T</u>	20 mM Tris/HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20
<u>1× TSM</u>	100 mM Tris/HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub>

### **Lösungen für Gelelektrophoresen von Proteinen**

<u>2D-Lysepuffer</u>	8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 40 mM Tris, 4% (w/v) Chaps
<u>2D-Rehydratisierungspuffer</u>	8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 40 mM Tris, 4% (w/v) Chaps, 0,625% IPG-Buffer, 0,1% (w/v) Bromphenolblau
<u>2D-Äquilibrierungspuffer</u>	1,5 M Tris/HCl pH 8.8, 6 M Harnstoff, 30% (w/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau
<u>2D-Versiegelungslösung</u>	0,5% (w/v) Agarose, 0,1% (w/v) Bromphenolblau
<u>16-BAC-Trenngel (6-10%)</u>	6% bzw. 10% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8), Bisacrylamid 1:126 im Verhältnis zu AMBA, 75 mM Na <sub>x</sub> H <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,1, 3 M Harnstoff, 0,1% (w/v) 16-BAC, 0,4 mM Ascorbinsäure, 8 µM FeSO <sub>4</sub> , 0,0012% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<u>16-BAC-Sammelgel (4%)</u>	4% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) Bisacrylamid 1:17 im Verhältnis zu AMBA, 125 mM Na <sub>x</sub> H <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> , pH 4,1, 1,67 M Harnstoff, 0,07% 16-BAC, 0,416 mM Ascorbinsäure, 5,5 µM FeSO <sub>4</sub> , 0,002% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<u>16-BAC-Probenpuffer</u>	250 mM 16-BAC, 8,3 M Harnstoff, 10% (w/v) Glycerin, 75 mM DTT, 0,01% (w/v) Pyronin Y
<u>16-BAC-Laufpuffer</u>	2,5 mM 16-BAC, 150 mM Glycin, 50 mM Ortho-Phosphorsäure

<u>A/PAGE-Tris-Puffer</u>	200 mM Tris Base, 125 mM Essigsäure, 35% (w/v) Sucrose, 0,05% (v/v) Triton X-100
<u>A/PAGE-Elektrodenpuffer</u>	40 mM Tris Base, 25 mM Essigsäure, pH 8.0
<u>3× BNEB</u>	1.5 M 6-Aminocapronsäure, 150 mM BisTris pH 7.0
<u>BN-Gel 4%-16%</u>	0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM BisTris, adäquate Menge an Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8); für 16%-Gel: + 16,7% (w/v) Glycerin, 0,03% (w/v) APS, 0,07% (w/v) TEMED
<u>BN-Anodenpuffer</u>	50 mM BisTris, eingestellt auf pH 7.0 mit HCl
<u>BN-Kathodenpuffer:</u>	50 mM Tricin, 15 mM BisTris, 0,005% (w/v) Coomassie blue G-250, pH 7.0
<u>BlauG-Puffer</u>	750 mM 6-Aminocapronsäure, 5% (w/v) Coomassie blue G-250, 50% (w/v) Glycerin
<u>Coomassie-Entfärbelösung</u>	30% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure
<u>Coomassie-Färbelösung</u>	0,1% (w/v) Servablau R-250, 30% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure
<u>SDS-Laufpuffer</u>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8.3 (nicht nachträglich zu titrieren)
<u>SDS-Probenpuffer (2×)</u>	62,5 mM Tris/HCl pH 6.8, 10% (w/v) Glycerin, 5% (w/v) β-Mercaptoethanol, 3% (w/v) SDS, 0,01% (w/v) Bromphenolblau
<u>SDS-Sammelgel (3%)</u>	3% (w/v), Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 1 mg/ml APS, 1 µl/ml TEMED
<u>SDS-Trenngel (10%)</u>	10% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 1 mg/ml APS, 1 µl/ml TEMED

### **Silberfärbung von Polyacrylamidgelen<sup>196</sup>**

<u>Fixierer</u>	50% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure
<u>Glutaraldehydlösung</u>	30% (v/v) EtOH, 0,5 M Na-Acetat, 0,2% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 0,5% (v/v) Glutaraldehyd
<u>Färbelösung</u>	0,1% (w/v) AgNO <sub>3</sub> , 0,01% (v/v) Formaldehyd

<u>Entwickler</u>	2,5% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH 10.9, 0,01% (v/v) Formaldehyd
<u>Stopmix</u>	50 mM EDTA, 0,02% (w/v) Thimerosal

### **Silberfärbung von Polyacrylamidgelen<sup>197</sup>**

<u>Fixierer</u>	50% (v/v) Ethanol, 5% (v/v) Essigsäure
<u>Sensibilisierung</u>	0,02% Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<u>Färbelösung</u>	0,1% (w/v) AgNO <sub>3</sub>
<u>Entwickler</u>	2% (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0.04% Formaldehyd
<u>Stopmix</u>	5% (v/v) Essigsäure, 0,9% (w/v) EDTA

### **Lösungen für den tryptischen Verdau von Proteinen für MALDI-MS**

<u>Schwellpuffer</u>	100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
<u>Reduktionslösung</u>	100 mM DTT, 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
<u>Carbamidomethylierung</u>	55 mM Iodacetamid, 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
<u>Trypsinlösung</u>	12,5 µg/ml Trypsin (bovine / Sequenzierungsgrad) in 25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
<u>Verdaupuffer</u>	25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>

## 6.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Airfuge	Beckman
Autoklav 3870 EL	Systeme GmbH
Autoklav 17	MELAG
Blot-Apparatur	Schleicher&Schuell
Brutschrank (Bakterien) Modell 300	Memmert GmbH
Brutschrank (Zellkultur)	
CO <sub>2</sub> -Inkubator C200	Labotect GmbH
CO <sub>2</sub> -Inkubator 3164	Forma Scientific, Inc.
Filmentwickler Optimax Typ TR	MS Laborgeräte
Geldokumentationssystem GeldDoc 2000	BioRad
Gelektrophorese-Kammern:	
EasyCast™ Minigel System	Owl Scientific
Mini Protean II	BioRad
Protean II xi	BioRad
Hyperfilm-ECL	Amersham-Buchler
IEF Immobiline Dry Strips pH 3-10 NL/L, 13 cm	Amersham Pharmacia
Immobilon P-Membran	Millipore
IPGphor IEF System	Amersham Pharmacia
Magnetrührer IKAMAG RCT basic	IKA Werke
Massenspektrometer Bruker Reflex	Bruker Daltonik
Mikroskope:	
Leitz DMIRB (Fluoreszenzmikroskop)	Leica
LSM 510 (konfokales Mikroskop)	Zeiss
Radiance2000 (konfokales Mikroskop)	BioRad
TMS-F (inverses Mikroskop)	Nikon
Milli-Q Millipore water purification system	Biocel
Nitrozellulose-Membranen Hybond-C	Amersham-Buchler
pH-Messgerät Modell 643	Knick
pH-Elektrode N 5700 A	Schott
Photometer UV-1202	Shimadzu Corp.
Schüttelinkubator HT	Infors AG

## Spannungsgeräte:

Power Pac 300

BioRad

EPS 3000/150

Pharmacia

Spektrometer DU 650

Beckman

## Thermocycler:

Primus

MWG-Biotech

PTC-150

MJ Research, Inc.

Thermomixer Compact

Eppendorf

Ultraschallgerät Sonorex TK 30

Bandelin

## Vakuumkonzentrator:

Evaporatorzentrifuge Univapo VUC 150 H

Leybold-Heraeus

Lyophilisator GT 2

Leybold-Heraeus

Wasserbad MA 6

Lauda

## Zentrifugen:

Kühlzentrifuge Centricon H-401

Kontron-Hermle

Tischzentrifuge 5415 C

Eppendorf

Tischzentrifuge BioFuge Primus R

Heraeus

Tischzentrifuge UEC Force 14/B

UniEquip

Ultrazentrifuge TGA-65

Kontron

ZipTips

Millipore

## 6.6 Molekularbiologische Methoden

### 6.6.1 RNA-Präparation mit TRIZOL

Die Isolierung qualitativ hochwertiger RNA ist problematisch, bedingt durch die Instabilität der Moleküle und vor allem durch den Einfluss äußerst stabiler Ribonukleasen (RNasen), welche entweder von außen eingeführt oder bei der Gewebepreparation freigesetzt werden können. Zur Vermeidung eines enzymatischen Abbaus bei der Präparation wurden alle Puffer und Lösungen, deren Bestandteile keine primären Amine besaßen (wie z.B. Tris), mit 0,1% DEPC (v/v), einem chemischen RNase-Inhibitor, versetzt, mindestens 2 h bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert. Plastikmaterialien wurden mit 0,1% (v/v) DEPC in Wasser behandelt, autoklaviert und bei 60°C getrocknet. Laborbedarf aus hitzeresistenten Materialien wurde mindestens 8 h bei 180°C erhitzt.

Qualitativ besonders hochwertige RNA aus Zellen oder Geweben konnte mit Hilfe von TRIZOL (einphasige Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat) isoliert werden. Beim Homogenisieren/Lysieren der Probe ermöglicht TRIZOL die Erhaltung der Integrität der RNA, während andere Zellbestandteile zersetzt werden. Nach Zugabe von Chloroform und Zentrifugation, sammelt sich hochmolekulare DNA in der Interphase und stabile RNA bleibt im wässrigen Überstand, aus der sie mit Hilfe von Isopropanol gefällt werden kann.

Pelletierte F11-Zellen oder Gewebe (Rattenhirn, tiefgefroren und in flüssigem Stickstoff zermörsert) wurden mit 1 ml TRIZOL in einem Eppendorfgefäß mit einem Pistill homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde gemischt, 3 min bei RT inkubiert und bei 4°C, 12.000 × g für 15 min zentrifugiert. Die RNA in der oberen Phase wurde mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, bei 7.500 × g für 5 min bei 4°C zentrifugiert und an der Luft getrocknet. Das Pellet wurde in 50-100 µl DEPC-gereinigtem Wasser aufgenommen und für 10 min bei 60°C gelöst. Die Reinheit der Präparation wurde auf einem 1%igem TBE-Agarosegel überprüft.

### 6.6.2 cDNA-Synthese

Die meisten eukaryotischen mRNA-Moleküle besitzen an ihrem 3'-Ende einen Poly(dA)-Schwanz. Ein synthetisches Oligonukleotid mit einer Nukleotidsequenz von etwa 15-20 aufeinanderfolgenden Thymidinresten kann mit diesem Poly(dA)-Schwanz hybridisieren und somit ein freies 3'OH-Ende für eine Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase bilden.

Ein 30 µl Reaktionsansatz wurde folgendermaßen in ein DEPC-behandeltes 0,5 µl-Reaktionsgefäß pipettiert:

Bis zu 5 µg Gesamt-RNA wurde mit 200 ng Oligo(dT)<sub>17</sub>-Primer versetzt und auf 17 µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Zum Auflösen von RNA-Sekundärstrukturen wurde für 10 min auf 65°C erhitzt. Danach erfolgte auf Eis die Zugabe von 6 µl 5× RT-Puffer (Erststrangpuffer), 1 µl RNase Out (RNase-Inhibitor), 500 µM dNTPs, 10 mM DTT und 300 U Reverse Transkriptase. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert (Transkriptionsreaktion), dann für 2 min bei 80°C, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Nach Abkühlung auf Eis erfolgte durch Zugabe von 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, 6 µl Strangpuffer II, und 50 U RNase H und weiterer 30-minütiger Inkubation bei 37°C der Verdau der mRNA von den mRNA/DNA-Hybridmolekülen. Die Inaktivierung der RNase H erfolgte durch Inkubation für 2 min bei 80°C. Nach Abkühlung auf Eis wurde die cDNA in Aliquots zu 4 µl bei -80°C gelagert.

### 6.6.3 Polymerase-Kettenreaktion<sup>198</sup>

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch zu amplifizieren. Für die PCR wird eine DNA-Matrize benötigt, deren Sequenz am 5'- und am 3'-Ende des amplifizierten Bereiches bekannt ist, damit zwei Oligonukleotide abgeleitet werden können. Sie dienen der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* als Primer, von deren 3'-Hydroxyl-Ende aus abhängig von der einzelsträngigen DNA-Matrize ein neuer DNA-Strang synthetisiert wird. Ein Zyklus besteht aus Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Anlagerung der Primer (Annealing) und DNA-Synthese (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus wird das spezifische DNA-Fragment theoretisch exponentiell angereichert. Das PCR-Produkt ist eine doppelsträngige DNA.

Ein Standard-Ansatz von 15 µl enthielt etwa 50 ng DNA, jeweils 100 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, jeweils 5 pmol (= 0.33 µM) Primer und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase in 1× PCR-Puffer. Die Standard-Reaktion begann mit einem initialen DNA-Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C, daran schlossen sich 30-35 Zyklen mit jeweils 30 s bei 95°C (DNA-Denaturierung), 30 s bei der Primer-Annealing-Temperatur abhängig von den thermodynamischen Eigenschaften der Primer und 60 s bei 72°C (Elongation) an. Zum Abschluss erfolgte noch ein Elongationsschritt für 7 min bei 72°C. Die Produkte der PCR wurden zur Kontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Annealing-Temperatur eines Primers wurde nach folgender Formel abgeschätzt :

$$T = [4 \times n(\text{C+G}) + 2 \times n(\text{A+T}) - 5] \text{ } ^\circ\text{C}$$

mit n = Anzahl der jeweiligen Basen in der Primersequenz.

Es wurden Annealing-Temperaturen zwischen 49°C und 67°C verwendet. Alle eingesetzten PCR-Primer, die im Rahmen dieser Arbeit definiert wurden, sind unter 6.3.4 aufgeführt.

#### 6.6.4 RACE-PCR

RACE (rapid amplification of cDNA ends) ist eine Methode zur Identifizierung der absoluten Termini einer cDNA/mRNA. Die Methode basiert auf der Ligation bekannter Sequenzabschnitte (Adapter) an die mRNA und die anschließende Amplifikation der gewünschten Sequenz mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Voraussetzung für die Anwendung ist die Kenntnis über einen Sequenzabschnitt der zu untersuchenden mRNA, um spezifische Primer für die PCR zu generieren.

##### **5'-RACE-PCR**

Der hier verwendete AMBION RLM-RACE Kit bietet den Vorteil, dass nur vollständige mRNA in der PCR zu einem Produkt führt. Dies wird durch die aufeinanderfolgende Behandlung der RNA mit CIP (calf intestinal phosphatase) und TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) gewährleistet. Im ersten Schritt wird das 5'-Phosphat aller unvollständigen, verkürzten mRNAs durch die CIP entfernt.

Anschließend wird die Cap-Struktur am 5'-Ende der vollständigen mRNAs durch die TAP entfernt, wodurch ein freies 5'-Phosphat erzeugt wird. Lediglich an diese phosphorylierten Enden kann im nächsten Schritt der Adapter ligiert werden.

10 µg RNA wurden mit 2 µl CIP in 1× CIP-Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion durch Zugabe von 15 µl Ammoniumacetat, 115 µl H<sub>2</sub>O und 150 µl Phenol/Chloroform. Die Lösung wurde 15 sec gemischt und zur Phasentrennung bei 13.000 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde mit 150 µl Chloroform versetzt, erneut gemischt und zentrifugiert. Die in der oberen Phase befindliche RNA wurde mit 150 µl Isopropanol während einer 10-minütigen Inkubation auf Eis gefällt und durch Zentrifugation bei 12.000 × g, 4°C für 20 min sedimentiert. Abschließend wurde die RNA mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert und bei RT getrocknet. Die RNA wurde in 11 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen. 5 µl wurden mit 2 µl TAP in 1× TAP-Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Davon wurden 2 µl zusammen mit 300 ng 5'RACE-Adapter, 1× RNA-Ligase-Puffer und 2 µl T4-Ligase in den Ligationsansatz eingesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. In der anschließenden reversen Transkription wurden 2 µl aus dem Ligationsansatz mit 500 µM je dNTP, 5 µM random decamers, 1 ml RNase-Inhibitor und 1 µl M-MLV-RT in 1× RT-Puffer für 1 h bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der M-MLV-RT erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 15 min. Danach ist die mRNA zur cDNA-Synthese vorbereitet. Häufig ist es notwendig eine verschachtelte PCR (nested PCR) anzuschließen um ein Produkt zu erhalten.

### **3'-RACE-PCR:**

Die 3'-Race-PCR ermöglicht die Amplifikation und damit die Identifikation unbekannter Sequenzen am 3'-Ende eukaryotischer mRNAs. Sie unterscheidet sich von einer Erststrang-cDNA-Synthese mit einem Oligo(dT)-Primer dadurch, dass an das 5'-Ende des Primers eine zusätzliche, bekannte Sequenz von 20-40 Nukleotiden Länge angehängt wird (Adapter). Dadurch erhalten alle revers transkribierten cDNA-Moleküle ein einheitliches Sequenzmotiv an ihrem 3'-Ende. Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung des Primers 5'-gcgagcacagaattaacgactcactataggt<sub>(12)</sub>vn-3'. Nach dieser Erststrangsynthese wird mit

einem genspezifischen und einem 3'-RACE Primer (komplementär zu der Adaptersequenz) eine PCR durchgeführt.

1 µg wurde in einem Reaktionsansatz von 20 µl mit je 500 µM dNTPs, 2 µl 3' RACE-Adapter, 1 µl U RNase-Inhibitor und 1 µl M-MLV-RT in 1× RT-Puffer für 1 h bei 42°C inkubiert. Die M-MLV-RT wird anschließend durch eine Inkubation bei 70°C für 15 min inaktiviert. Die Erststrang-cDNA dient danach als Matrize zur Amplifikation der gesuchten Sequenz in einer PCR (siehe 6.6.3).

### 6.6.5 RT-PCR an Einzelzellen (Single cell RT-PCR)

F11-Zellen wurden in 5× RT-Erststrangpuffer auf eine Konzentration von 1 Zelle / 4 µl verdünnt und unter dem Mikroskop in einer 96-well Platte nochmals kontrolliert, dass nur eine Zelle pro 4 µl vorkam. Nur Einzelzellen wurden direkt für die reverse Transkription eingesetzt. Die Erststrangsynthese erfolgte in 20 µl mit 200 U Superscript II, 500 µM je dNTPs, 40 U RNase Out und 5 mM DTT bei 42°C für 60 min. Darauf folgte ein Inaktivierungsschritt bei 70°C für 15 min. Als Kontrolle wurden eine Probe ohne Reverse Transkriptase inkubiert. Die anschließende PCR wurde wie beschrieben durchgeführt (siehe 6.6.3), allerdings mit 40 anstatt 35 Zyklen.

### 6.6.6 Konzentrationsbestimmung von gelösten Nukleinsäuren

Eine Bestimmung der Konzentration gelöster Nukleinsäuren kann aufgrund des Absorptionsmaximums bei 260 nm photometrisch erfolgen. Dabei gilt:

$$\begin{aligned} & 50 \mu\text{g dsDNA/ml} \\ 1 \text{ OD}_{260} = & 40 \mu\text{g ssRNA/ml} \\ & 33 \mu\text{g ssDNA/ml} \end{aligned}$$

Stammlösungen wurden in einer 100 µl-Mikroküvette mit Wasser verdünnt und die Absorption über einen Wellenlängenbereich von 200-300 nm gemessen. Die Nukleinsäurekonzentration in der Stammlösung errechnet sich aus der Formel:

$$\text{Konz.} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor in der Küvette} \times \text{spezifische Konzentration/ml}$$

### 6.6.7 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA<sup>199</sup>

Restriktionsendonukleasen sind prokaryotische Enzyme, die spezifisch doppelsträngige DNA erkennen und spalten. Erkennungsstellen der Restriktionsendonukleasen sind meistens vier- bis achtbasige, oft palindromische Sequenzen. Bei der restriktionsenzymatischen Spaltung von DNA werden Typ-II-Restriktionsendonukleasen ohne Methylase-Aktivität eingesetzt, die im Bereich der Erkennungssequenz schneiden und je nach Enzym kohäsive Enden mit 5'-Überhang, kohäsive Enden mit 3'-Überhang oder glatte Enden erzeugen.

Ein Ansatz enthielt 5-10 U Restriktionsenzym pro µg eingesetzter DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer. Der Ansatz wurde für 2-15 h bei der enzyspezifischen Temperatur inkubiert und die Vollständigkeit der Reaktion durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA zu einer Endkonzentration von 10 mM beendet.

### 6.6.8 Gelelektrophoresen für Nukleinsäuren

Für die Elektrophorese von Nukleinsäuren werden Agarose- oder Polyacrylamid-Gelsysteme unter nativen oder denaturierenden Bedingungen verwendet. Die Polyacrylamidgele zeichnen sich gegenüber den Agarosegelen durch ein schärferes Auflösungsvermögen aus, während letztere über einen weit größeren Längenbereich der Nukleinsäuren trennen. Unter den gelelektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen im Rückgrat der Nukleinsäuren ionisiert, und die Poly(desoxy)nukleotide liegen als Polyanionen vor. Sie bewegen sich somit im elektrischen Feld in Abhängigkeit ihrer Größe und Konformation von der Kathode zur Anode. Dabei ist der Logarithmus ihrer Länge bei gleicher Konformation ungefähr der relativen Wanderungstrecke im Gel umgekehrt proportional.

#### 6.6.8.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse sowie zur präparativen Isolierung von doppel- oder einzelsträngigen DNA-Fragmenten sowie Plasmid-DNA mit einer Länge von mehr als 0,5 kb Länge werden native Agarosegele eingesetzt. Je nach Länge der zu erwartenden Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen zwischen 0,7% und 1,5% gewählt. Die Agarose

wurde durch Kochen in 1× TAE-Puffer gelöst, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in den Gelträger einer Gelelektrophoresekammer gegossen. Die DNA-Proben wurden vor dem Laden mit ungefähr 1/3 Probenvolumen DNA-Ladepuffer versetzt. Als Längenmarker wurden 200-500 ng einer 1-kb-Leiter verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1× TAE-Puffer bei 20-150 V durchgeführt. Durch Ethidiumbromid, das in doppelsträngige DNA interkaliert, konnten die DNA-Fragmente im Transilluminator mit UV-Licht durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

### 6.6.8.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird meist für die Trennung von DNA-Fragmenten <1000 bp eingesetzt und dient zur Analyse von Restriktionsfragmenten, deren Isolierung, sowie zur Trennung der Produkte zur DNA-Sequenzierung. Durch Variation der Acrylamidkonzentration kann der Trennbereich für die unterschiedlichen Fragmentlängen optimiert werden. Zur Trennung doppelsträngiger DNA-Moleküle werden native und für die Analyse einzelsträngiger DNA-Moleküle denaturierende Gelsysteme eingesetzt. Die Laufstrecke zweier gleich langer DNA-Fragmente im nativen Gelsystem kann bis zu 10% differieren. Es wurden 6-8%ige Polyacrylamidgele verwendet. Das Volumen betrug für ein 0,75 mm dickes Gel 25 ml. Dafür wurde eine Gellösung mit 6,7 ml 30% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8), 5 ml 10× TBE und 15,3 ml hochreinem Wasser angesetzt. Die Polymerisation wurde mit 500 µl 10% (w/v) APS und 15 µl TEMED eingeleitet und die Lösung sofort zwischen die gereinigten Glasplatten der Elektrophoresekammer gegossen. Zur vollständigen Polymerisation wurde das Gel 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Taschen des Polyacrylamidgels wurden mit 1× TBE gespült und die Proben in DNA-Ladepuffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 600 V, 25 W und 400 mA für 1,5-4 h (je nach Größe der trennenden PCR-Produkte). Als Laufpuffer diente 1× TBE. Die Färbung der Gele erfolgte mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid.

### 6.6.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das UltraClean DNA Purification Kit diente der Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Hierbei wird die Agarose geschmolzen, die DNA an eine Silika-Matrix gebunden und nach mehreren Waschschritten von der Matrix eluiert. Die Durchführung der DNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Nach der Elektrophorese in TAE-Puffer wurde die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten, gewogen und die Agarose in 3 Vol gesättigter NaI-Lösung bei 55°C geschmolzen. Anschließend wurden 10 µl Glasmilch, die SiO<sub>2</sub>-haltige Matrix, hinzugefügt und die Suspension 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Matrix durch Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5 s präzipitiert. Der Glasmilch-DNA-Komplex im Pellet wurde dann dreimal mit jeweils 300 µl Waschlösung gewaschen. Das Pellet wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O-bidest. resuspendiert, 5 min bei 55°C inkubiert und 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Ausbeute durch Elektrophorese von 1 µl des Überstandes in einem 0,9%igem Agarosegel überprüft.

### 6.6.10 Ligation von dsDNA

Bei der Ligation werden die zu klonierenden DNA-Moleküle mit der linearisierten Vektor-DNA enzymatisch verknüpft. Dabei sind T4-DNA-Ligase vermittelte Ligationsreaktionen ATP-abhängig und benötigen zudem phosphorylierte 5'-DNA-Enden, welche entweder nach einem Restriktionsverdau vorliegen oder aber beispielsweise bei PCR-Produkten nachträglich generiert werden müssen. Eine Ligationsreaktion wurde bei 14°C für 14 h in einem Volumen von 10 µl in 1× Ligationspuffer, 1 mM ATP und 10 U T4-DNA-Ligase durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA-Enden betrug 1:3.

### 6.6.11 TOPO TA-Klonierung

Die Vektoren pCRII-TOPO, pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO oder pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO liegen linearisiert vor, besitzen einen 3'-Desoxythymidin (T)-Überhang und eine kovalent gebundene Topoisomerase. Da *Taq*-DNA-Polymerase eine Matrizen-unabhängige terminale Transferase-Aktivität besitzt, generiert sie einen 3'-

Desoxyadenin (A)-Überhang des PCR-Produktes und erlaubt somit die effiziente Inserierung des PCR-Produktes in den Vektor. Topoisomerase I aus dem *Vaccinia* Virus bindet dsDNA an spezifischen Sequenzen und bricht das Phosphodiester-Rückgrat nach 5'-CCCTT in einem Strang. Die Energie des gebrochenen Phosphodiester-Rückgrats wird durch die Formierung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphat des geschnittenen Stranges und einem Tyrosin-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I konserviert. Die Phospho-Tyrosin Bindung zwischen DNA und Enzym kann durch die 5'-OH-Gruppe des PCR-Produktes angegriffen werden. Bei dieser reversiblen Reaktion wird die Topoisomerase I wieder frei. Gereinigte PCR-Produkte, die mit *Pfu Turbo* Polymerase amplifiziert worden sind, wurden mit 1 U *Taq*-DNA-Polymerase und 10 nmol dATP in 1× *Taq*-Polymerase-Puffer für 15 min bei 72°C inkubiert, um einen 3'-Desoxyadenosin (A)-Überhang zu erzeugen. Zur Ligation wurden 4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salt-Solution und 1 µl Vektor für 30 min bei RT inkubiert, auf Eis gekühlt und direkt zur Transformation in TOP10-Zellen eingesetzt. Die korrekte Orientierung des DNA-Inserts wurde mittels restriktionsenzymatischer Spaltung (siehe 6.6.7) nachgewiesen und durch DNA-Sequenzierung beider Stränge (siehe 6.6.16) bestätigt.

### 6.6.12 Gerichtete DNA-Mutagenese

Bei der gerichteten DNA-Mutagenese („site-directed mutagenesis“) werden gezielte Sequenzveränderungen in eine DNA-Sequenz eingefügt. Dies geschieht durch Substitutionen, Insertionen oder Deletionen von einzelnen Nukleotiden oder DNA-Fragmenten variabler Länge durch entsprechende synthetische Oligonukleotide. Beim QuickChange™ XL Site-Directed Mutagenesis Kit wird *Pfu Turbo*-DNA-Polymerase benutzt, um das komplette doppelsträngige zirkuläre Plasmid mit zwei komplementär zum gegenüberliegenden Strang liegenden Primern zu amplifizieren, die an eine beliebige Zielsequenz binden und die gewünschte Mutation tragen. Nach thermaler zyklischer Amplifikation wird das Plasmid mit *DpnI* restriktionsenzymatisch gespalten. *DpnI* ist eine Endonuklease, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA (Zielsequenz: 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3') und somit das Ausgangsplasmid spaltet, wenn es vorher aus einem *dam*<sup>+</sup> *E. coli* Stamm isoliert

wurde. Das mutierte Plasmid wird dann in XL10-Gold ultrakompetente Zellen (Stratagene) transformiert.

Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt und Mutageneseprimer gemäß 6.3.4 verwendet. Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels restriktionsenzymatischer Spaltung (siehe 6.6.7) - wenn durch diese eine Restriktionsschnittstelle neu geschaffen oder entfernt wurde - und Sequenzierung beider Stränge bestätigt (siehe 6.6.16).

### 6.6.13 Kompetente *E. coli*-Zellen<sup>200</sup>

Zum Einschleusen von Fremd-DNA in Bakterienzellen muss die Permeabilität der Bakterienmembran erhöht werden. Dazu wurde eine Einzelkolonie des interessierenden *E. coli*-Stammes in 100 ml SOB\*-Medium überimpft und bei 37°C bis  $OD_{600} \approx 0,3$  unter Schütteln (225 rpm) kultiviert. Anschließend wurde die Kultur für 15 min auf Eis inkubiert und dann für 15 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 33,4 ml RF1 resuspendiert und 2 h auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei für 15 min 2000 rpm und 4°C wurde das Pellet in 8 ml RF2 resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Nach vorsichtigem Schwenken wurden jeweils 200 µl transformationskompetente Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

### 6.6.14 Transformation von *E. coli*-Zellen

Unter Transformation versteht man die Veränderung des zellulären Phänotyps durch die Übertragung von DNA in eine Zelle. Kompetente *E. coli* Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. 5 µl des Ligationsansatzes wurden mit 100 µl Zellsuspension gemischt, 1 h auf Eis inkubiert und anschließend im Wasserbad einem Hitzeschock von 42°C für 90 s unterworfen. Dabei werden die Plasmide in die kompetente Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Ansätze 2 min auf Eis gestellt und dann zum Regenerieren bei 37°C in 900 µl SOC-Medium unter Schütteln bei 225 rpm für 1 h inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 50 µl und 200 µl auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank

inkubiert. Der Rest des Ansatzes wurde in der Regel mit LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) auf 5 ml aufgefüllt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

#### 6.6.15 Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA aus Bakterien<sup>201</sup>

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterien und dem Ausfällen der bakteriellen Proteine. Nach Zentrifugation verbleibt die Plasmid-DNA im Überstand und kann über eine Anionenaustauschersäule gebunden, gewaschen und eluiert werden. Die Konzentrierung der Plasmid-DNA erfolgt über Isopropanol- oder Ethanol-Präzipitation.

Nach der Transformation wurden 10 Kolonien in je 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin in Flüssigkultur gebracht und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 225 rpm inkubiert. Aus der Flüssigkultur wurden Stammlösungen zur Lagerung hergestellt, indem 850 µl der jeweiligen Kultur mit 150 µl Glycerin gut vermischt und direkt bei -70°C eingefroren wurden. Aus der verbleibenden Flüssigkultur wurde dann die Plasmid-DNA durch Minipräparation nach Angaben des Herstellers mit dem GFX *Micro* Plasmid Prep Kit isoliert und in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Je 5 µl Plasmid-DNA wurden mit spezifischen Restriktionsendonukleasen verdaut (siehe 6.6.7), um zu bestimmen, ob die Plasmide die zu klonierende DNA-Fragmente aufgenommen haben. Die Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde nach Angaben des Herstellers aus einer 200 ml Kultur mittels Maxi-Präparation mit dem QIAfilter™ Plasmid Maxi Kit isoliert. Für die Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde die Plasmid-DNA mit dem EndoFree™ Plasmid Maxi Kit isoliert.

#### 6.6.16 Sequenzierung von DNA<sup>202</sup>

Die Sequenzierung von DNA erfolgte mit der Kettenabbruch-Methode. Das Verfahren beruht auf der enzymatischen Synthese einer komplementären Kopie des zu sequenzierenden DNA-Stranges, wobei es durch den Einbau von 2',3'-Dideoxynukleosid-5'-Triphosphaten (ddNTP) aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zu einem basenspezifischen Abbruch der DNA-Synthese kommt. Statistisch wird die DNA so in einen Satz aller möglichen Fragmente zerlegt, die

durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Länge aufgetrennt werden. Hierbei lassen sich Fragmente, die sich nur um ein einziges Nukleotid unterscheiden, voneinander trennen.

Alle Sequenzierungen wurden mit dem ABI PRISM™ *BigDye* Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, v 3.1 durchgeführt und die Proben zur Analyse zu der Firma GATC (Konstanz) oder ARGOWA (Berlin) geschickt. In dem Kit liegen die vier ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) unterschiedlich fluoreszenzmarkiert vor und die Reaktion wird durchgeführt mit einem „cycle sequencing“-Verfahren, bei dem sich wiederholende Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Extension durchlaufen werden. Für die Sequenzierung klonierter DNA wurden entweder sequenzspezifische Primer oder Plasmid-Universalprimer verwendet (siehe 6.3.4).

200 ng DNA wurden mit H<sub>2</sub>O-bidest. auf ein Volumen von 5 µl aufgefüllt und mit 2 µl Primer (1,6 µM) und 3 µl Ready Reaction Mix auf Eis versetzt. Die Sequenzreaktion wurde im PCR-Cycler mit folgendem Programm durchgeführt (Ramp = steigende oder sinkende Temperatur-Veränderung mit 1°C/sec).:

Ramp (1°C/sec)	96°C		
	96°C	30 sec	
Ramp (1°C/sec)	96°C		
	96°C	30 sec	25 ×
Ramp (1°C/sec)	50°C		
	50°C	15 sec	
Ramp (1°C/sec)	60°C		
	60°C	4 min	
Ramp (1°C/sec)	4°C		
	4°C	∞	

## 6.7 Zellbiologische Methoden

### 6.7.1 Zellkultur

F11-Zellen (Hybridom-Zelllinie aus N18TG2 Maus-Neuroblastomzellen und Ratten-Hinterwurzelganglienzellen) wurden uns freundlicherweise von Prof. Mark C. Fishman, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in Ham's F-12 Medium mit Glutamax-I (#31765-027, Life Technologies), mit 20% (v/v) FCS (GibcoBRL), 2% HAT-Zusatz (Biochrom KG), 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Penicillin bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>.

HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen) wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (25 mM Hepes, Natriumpyruvat, 1000 mg/l Glucose mit Pyridoxin; #22320-022, Life Technologies) mit 10% (v/v) FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (Biochrom KG), 1% L-Glutamin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Penicillin bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 6.7.2 Transfektion von F11- und HEK293-Zellen

Die Zellen wurden entweder in Kulturschalen (100 oder 140 mm Ø) oder auf 12-mm Deckgläsern (für IF) kultiviert. Bei >60%iger Konfluenz erfolgte die Transfektion mit Lipofectamin Plus<sup>™</sup> Reagenz nach Angaben des Herstellers.

Zur Pre-Komplexierung wurde die Plasmid-DNA in serumfreiem Medium verdünnt, mit PLUS Reagenz gemixt und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Verdünnung des Lipofectamin Reagenz mit serumfreiem Medium wurden beide Lösungen vereinigt und erneut für 15 min bei RT inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS und Zugabe von frischem serumfreiem Medium, erfolgte die Transfektion mit dem DNA-Lipofectamin-Komplex. Die Zellen wurden dann für 3 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde entweder 1 Volumen frisches Medium mit Serum dazugegeben oder das Medium vollständig durch frisches Medium mit Serum ersetzt. Die Volumina der einzelnen Komponenten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Kulturschale	Plasmid-DNA µg	PLUS µl	Medium zur Verdünnung µl	Lipofectamin µl	Medium zur Transfektion ml	Gesamt- volumen ml
12-well	0.7	5	50	12	0,4	0,5
100 mm Ø	4	20	750	30	5	6,5
140 mm Ø	8	50	1875	75	12,5	16,4

### 6.7.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden F11- oder HEK293-Zellen in Medium wie beschrieben auf 15-Loch-Objekträgern oder Deckgläschen (bei HEK293-Zellen mit Poly-*L*-Lysin beschichtet) für 24 h kultiviert. Je nach Experiment wurden die Zellen dann stimuliert oder mit Plasmid-DNA transfiziert. Die Fixierung erfolgte 48 h nach Transfektion durch 3% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen für 20 min in 0.1 M Glycin in PBS zum Abreagieren eventueller Überreste von PFA inkubiert, bevor sie in 0,4% TX-100 in PBS für 20 min bei RT permeabilisiert wurden. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper durch 5% (v/v) Normal-Ziegen Serum (NGS) in PBS für 30 min bei Raumtemperatur blockiert. Es folgte die Inkubation der Zellen mit primärem Antikörper (jeweilige Verdünnung in 3% (v/v) NGS-PBS) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen mit PBS, erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in 3% (v/v) NGS-PBS) für 30 min. Anschließend wurde erneut viermal mit PBS gewaschen, für 5 min zur Kernfärbung mit DAPI inkubiert, einmal mit PBS und dann mit H<sub>2</sub>O-bidest. gewaschen. Die Versiegelung der trocken gesaugten Objektträger erfolgte mit Fluoromount G und die Analyse der Zellen einen Tag später mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie oder Fluoreszenz-Mikroskopie.

### 6.7.4 Particulate-Präparation aus F11- und HEK293-Zellen

Die Zellen wurden für 2 Tage auf Kulturschalen kultiviert, bei Bedarf transfiziert und nach 48 h mit kaltem PBS gewaschen und in PBS von den Schalen abgeschabt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 500 × g wurde das Zellpellet auf Eis platziert. Die Resuspendierung erfolgte in 0,25 M STM-Puffer mit einer Complete™ Protease-Inhibitor Mini Cocktail Tablette/10 ml, 1 mM PMSF und 10 µl Benzonase/10 ml.

Die Zellen wurden im Glas-Homogenisator durch 40 Züge homogenisiert und danach bei 40.000 rpm im TFT 65.13-Rotor, für 30 min bei 4°C pelletiert (Pellet: Particulate, Membranproteine und membranassoziierte Proteine). Das Particulate wurde in einem geeigneten Volumen 0,25 M STM-Puffer aufgenommen. Das Homogenat und Particulate wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

## **6.8 Proteinchemische Methoden**

### **6.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die zu vermessende Probe, die eine Proteinmenge zwischen 5-20 µg enthalten sollte, wurde mit H<sub>2</sub>O-bidest. auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und mit 500 µl Bradford-Reagenz versetzt. Zur Kalibrierung der Messung wurde eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) zwischen 0-20 µg/Ansatz parallel zu den Proben angesetzt (Doppelwerte). Proben und Standards wurden photometrisch bei  $\lambda=595$  nm vermessen und die Proteinmenge in den Proben mit der Eichreihe korreliert. Die Methode eignet sich nicht für Proben, die Detergenzien oder reduzierende Substanzen enthalten.

### **6.8.2 Vernetzung von Proteinen**

#### **Vernetzung von GluDH mit DMA**

1 mg/ml GluDH in 0,2 M TEA pH 8.5 wurde in einem Volumen von 1 ml mit 2 mg DMA für 1 h bei RT inkubiert und danach bis zum Gebrauch eingefroren. Bei Bedarf wurde die vernetzte GluDH im Verhältnis 3:1 mit 4× Laemmli-Probenpuffer versetzt und diente in der BN-PAGE als Marker.

#### **Vernetzung von solubilisierten Proteinen für 2D-BN-PAGE**

150 µg Zellhomogenat oder Particulat von transient transfizierten F11/TRPV1 oder HEK293/TRPV1 Zellen wurden in der Airfuge für 10 min bei max. Geschwindigkeit und 2,8 psi zentrifugiert. Die Proteine wurden mit 100 µl ACS/BisTris-Puffer gewaschen, wie oben zentrifugiert und in 150 µl ACS/BisTris-Puffer mit 1% Dodecylmaltosid für 30 min bei RT solubilisiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde

der Überstand entweder direkt für die BN-PAGE eingesetzt oder mit 1/10 seines Volumens mit 10 mg/ml Crosslinker (f.c. 1 mg/ml) in entsprechendem Lösungsmittel für 1 h bei RT inkubiert. Als spaltbare Crosslinker wurden verwendet: DTBP in TEA, SPDP in DMSO, DTSSP und Sulfo-LC-SMPT in H<sub>2</sub>O. Nach Vernetzung wurden 30 µl Probe mit 5 µl 4× SDS-Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol und 2 µl BlauG-Probenpuffer versetzt und auf ein BN-PAGE (siehe 6.8.3.2) oder Agarose-PAGE (siehe 6.8.3.3) als erste Dimension aufgetragen.

### 6.8.3 Gelelektrophoretische Trennmethode für Proteine

#### 6.8.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese<sup>203</sup>

Mit dieser Methode können Proteine unter denaturierenden Bedingungen der relativen Molekülmasse nach aufgetrennt werden. Die Gelmatrix besteht aus Polyacrylamid nach einer Radikalketten-Polymerisation von Acrylamid/Bisacrylamid, wobei die Porenweite des Gels über das Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid und deren Konzentration relativ zu den anderen Komponenten der Gellösung gesteuert werden kann. Die radikalische Reaktion wird durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) unter Stabilisierung der Radikale durch N',N',N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED) gestartet. Die Denaturierung der Proteine erfolgt über die Reduktion von Disulfidbrücken durch β-Mercaptoethanol sowie durch Anlagerung von SDS an die Proteine, wobei angenommen wird, dass ca. 1,4 g SDS an 1 g Protein binden. Unter der Annahme vollständiger Entfaltung, erhalten die Proteine negative Ladungen, die annähernd proportional zu ihrer Molekülmasse sind. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein Sammelgel mit niedrigerem pH über das Trenngel geschichtet. Im Sammelgel besitzen die Chloridionen aus dem Laufpuffer eine erheblich höhere Mobilität als das ebenfalls enthaltene Glycin, wodurch es hinter der Chloridionen-Front zu einer Verarmung an Ladungsträgern und dadurch zu einer Verstärkung des elektrischen Feldes kommt. Die Proteine werden quasi zwischen Chloridionen und Glycin "eingeklemmt" und laufen daher als scharfe Front in das Trenngel ein.

Die Proben werden mit SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 min gekocht und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung erfolgt bei 10 mA im Sammelgel

und 25 mA im Trenngel statt. Die Gelelektrophorese ist beendet, wenn die Lauffront des Bromphenolblaus das untere Ende des Gels erreicht hat.

### **6.8.3.2 Klassische zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE)<sup>126,127</sup>**

Die 2DE ist ein hochauflösendes Trennsystem für Proteine. Der SDS-PAGE-Trennung nach dem Molekulargewicht der Proteine ist eine Trennung nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP), also ihrer Ladung, vorgeschaltet. Diese Ladungstrennung, die isoelektrische Fokussierung (IEF), erfolgt durch die elektrophoretische Wanderung von zuvor vollständig denaturierten Proteinen in einer mit einem pH-Gradienten versehenen Gelmatrix. Wird bei der Wanderung der IP erreicht, sind die Proteine nach außen neutral und wandern demzufolge nicht mehr im elektrischen Feld, womit sie fokussiert sind. Die so in der 1. Dimension aufgetrennten und fokussierten Proteine werden dann mittels normaler SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Ergebnis erhält man zweidimensional getrennte Proteine im Gel als definierte Spots (Punkte). Die IEF erfolgt mit Hilfe von kommerziell erhältlichen, mit einem linearen oder nichtlinearen pH-Gradienten (3-10) versehenen 13 cm langen Gelstreifen unter Verwendung eines IPGphor IEF-Systems als Spannungsquelle.

Zur Probenvorbereitung wurden 100-200 µg Gewebehomogenat oder Synaptosomenmembranen in 50 µl 2D-Lysepuffer, der mit frischem DTT (Endkonzentration 65 mM) versetzt wurde, 1 h lang bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl mit frischem DTT versetzten 2D-Rehydratisierungspuffer zugegeben und die Lösung in die Nut eines mit Elektroden versehenen Keramikschieffchens pipettiert. Danach wurde der für die IEF vorgesehene IEF-Gelstreifen luftblasenfrei in die Probe eingelassen und zur Verhinderung von Verdunstung mit einem Spezialöl überschichtet. Die Keramikelektrode wurde im Spannungsgeber ausgerichtet und die Fokussierung mit folgenden Parametern durchgeführt: Rehydratisierung: 15 h bei 20°C, 500 Vhrs, 1000 Vhrs, 16000 Vhrs. Im Anschluss an die IEF wurde das IEF-Gel für 20 min in 10 ml 2D-Äquilibriumspuffer, dem frisches DTT (Endkonzentration 10 mg/ml) zugesetzt wurde, inkubiert. Nach kurzem eintauchen des IEF-Gels in SDS-Laufpuffer wurde es luftblasenfrei horizontal in die Tasche eines 10%igen SDS-Polyacrylamidgels (Maße: 20 × 20 × 0,1 cm) gelegt und mit 2D-

Versiegelungslösung fixiert. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 20 mA/Gel, dann für ca. 5 h bei 30 mA/Gel unter Kühlung bei 15°C. Die Gele wurden anschließend fixiert und mittels Coomassie- oder Silberfärbung gefärbt.

### **6.8.3.3 Zweidimensionale BAC-Gelelektrophorese<sup>124</sup>**

Die Trennleistung dieser Methode ist erheblich höher als in einer eindimensionalen Trennung. Die 16-BAC-Gelelektrophorese (16-BAC: Benzyldimethyl-Hexadecyl-Ammoniumchlorid) ist die erste Dimension eines zweidimensionalen Gelsystems, das sich besonders für Membranproteine eignet. In der zweiten Dimension werden die Proteine mit der herkömmlichen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Anlagerung des kationischen Detergenz 16-BAC unter Verwendung eines sauren Puffersystems werden die Proteine in umgekehrter Polarität wie in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Ergebnis einer Trennung in beiden Dimensionen ist ein halbmondförmiges Proteinmuster, in dem die Proteine nach Färbung näherungsweise punktförmig erscheinen. Da ionische Detergenzien in beiden Dimensionen verwendet werden, ist das System besonders für die Auftrennung von Membranproteine geeignet.

Verwendet wurde für die erste Dimension ein 6-10% (w/v) Polyacrylamid-Gradientengel. Das Trenngel wurde auf pH 2,1 gepuffert, das 4%-Sammelgel auf pH 4,1. Die Proben wurden in 2× BAC-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min. bei 60°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 mA bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel, danach bei 25 mA konstanten Stroms.

Für die zweite Dimension wurden Laemmli-SDS-Gradientengele mit 7,5-15% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) und einem 4% (w/v) Sammelgel verwendet. Das Gel aus der ersten Dimension wurde nach der Coomassie-Färbung/Entfärbung über Nacht in 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 auf die Bedingungen für das Sammelgel der zweiten Dimension äquilibriert. Jeweils eine Gelspur aus der ersten Dimension wurde horizontal auf das Sammelgel der zweiten Dimension gelegt und mit 2× Laemmli-Probenpuffer überschichtet. Nach zehn Minuten Inkubation wurde die Elektrophorese (10 mA im Sammelgel, 25 mA im Trenngel) gestartet.

#### **6.8.3.4 Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese** <sup>204,205</sup>

Die Blaue Native Elektrophorese (BN-PAGE) ist ein Trennsystem für native Proteinkomplexe, bei der auf denaturierende ionische Detergenzien wie SDS im Gel oder im Laufpuffer verzichtet wird. Die Triebkraft für die gerichtete Migration der Proteinkomplexe zur Anode wird durch den Zusatz des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 zum Proben- und Laufpuffer bereitgestellt. Der negativ geladene Farbstoff lagert sich an basische Aminosäurereste an, jedoch ohne Protein-Protein-Interaktionen zu brechen.

Für die Auftrennung von Membranproteinen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 4%-16% (Acrylamid/Bisacrylamid 30:0,8) Gradientengele verwendet.

Um Membranproteine aus Zellhomogenat oder Particulate von transient transfizierten F11/TRPV1 oder HEK293/TRPV1 Zellen nativ aufzutragen, wurden je 20 µg in der Airfuge für 10 min bei max. Geschwindigkeit und 2,8 psi zentrifugiert. Die Proteine wurden in einem Endvolumen von 30 µl auf 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM BisTris, 0,5 oder 1% Dodecylmaltosid eingestellt. Um Protein-Interaktionen unter stringenteren Bedingungen zu untersuchen, wurde den Proben entweder 8 M Harnstoff mit 75 mM DTT oder 0,1% - 1,5% (w/v) SDS hinzugefügt. Die Proben wurden für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, für 15 min bei 14.000 × g und 4°C zentrifugiert und die Überstände mit 7,5 µl BlauG-Puffer versetzt. Die Elektrophorese von Proben auf Minigelen wurde für 1,5-2 h bei 180 V durchgeführt.

#### **6.8.3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese von Membrankomplexen**

##### **Blue Native PAGE/SDS-PAGE**

Diese Methode diente der Auftrennung von (TRPV1-)Membrankomplexen nach Vernetzung mit spaltbaren Crosslinkern. In der ersten Dimension werden die vernetzten Komplexe nativ nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. In der zweiten Dimension wird der Vernetzer durch β-Mercaptoethanol im Probenpuffer gespalten und somit der Komplex, der sich an einer bestimmten Position im BN-PAGE befindet, in seine Komponenten zerlegt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Ergebnis einer Trennung in beiden Dimensionen ist ein punktförmiges Proteinmuster. Als erste Dimension diente eine normale BN-PAGE (siehe 6.8.3.2).

Nach der Elektrophorese wurden die einzelnen Gelstreifen ausgeschnitten und für 15 min bei RT in 3× SDS-Probenpuffer inkubiert. Danach wurde ein einzelner Gelstreifen horizontal auf das 4% Sammelgel über einem 10%igen SDS-Trenngel gelegt und die Elektrophorese wie beschrieben durchgeführt (siehe 6.8.3.1).

### **Gemischte Agarose-PAGE/SDS-PAGE<sup>206</sup>**

Als erste Dimension fungiert hier ein gemischtes Gel aus 2% Polyacrylamid und 0,7% Agarose. Somit ist es möglich, die Konzentration an Polyacrylamid zu reduzieren und Membrankomplexe höheren Molekulargewichts aufzutrennen, allerdings mit geringerer Auflösung als mit der BN-PAGE. Als zweite Dimension diente wieder die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli.

Für 20 ml Gellösung wurden 123 mg Agarose in der Mikrowelle in 15,14 ml H<sub>2</sub>O geschmolzen und kurz zum Kochen gebracht. Die Agarose-Lösung wurde im Wasserbad bei 60°C flüssig gehalten und mit 3,53 ml A/PAGE-Tris-Puffer versetzt. Nach Zugabe von 1,33 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) wurde die Mischung mit 30 µl TEMED und 30 µl APS versetzt und zwischen die Glasplatten einer auf 60°C vorgewärmten Gelkammer gegossen. Nach Polymerisation des Gels und Auftrag der vernetzten Membranproteine in SDS-Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol wurde die Elektrophorese in A/PAGE-Elektrodenpuffer für 1 h bei 25 mA durchgeführt. Die Durchführung der zweiten Dimension entsprach jener der BN-PAGE/SDS-PAGE.

## **6.8.4 Immunchemische Methoden**

### **6.8.4.1 Westernblot**

Die Semidry-Methode in einer Carbonglas-Blotkammer diente dem Transfer der in einer SDS-PAGE oder BN-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran, um weitere Untersuchungen im Immunoblot durchzuführen. Bei der Semidry-Methode wurden drei Lagen mit Blot-Puffer getränkten Filterpapiers auf die anodische Carbonglasplatte gelegt. Auf das Filterpapier wurde die zuvor in Methanol (PVDF) oder H<sub>2</sub>O (Nitrozellulose) eingelegte Transfermembran aufgelegt und darauf das ungefärbte Gel. Drei weitere Lagen in Transferpuffer getränkten Filterpapiers folgten und die Apparatur mit

einem Deckel, in den die kathodische Carbonglasplatte integriert war, verschlossen. Der Deckel wurde mit ca. 2 kg beschwert. Der Transfer erfolgte bei  $1 \text{ mA/cm}^2$  Transfermembran für 2 h.

#### **6.8.4.2 Antikörper-Inkubation**

Die Blotmembran wurde nach dem Transfer der Proteine für 2 h bei RT oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit 5% (w/v) Magermilch in TBS-T (Blotto) blockiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit dem primären Antikörper in Blotto inkubiert. Erneut wurde dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 oder 1:2000, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP) oder alkalische Phosphatase (AP) in Blotto inkubiert. Im Falle von gekoppelter HRP darf dem Blotto kein Natriumazid zugefügt sein. Die Blotmembran wurde nochmals dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor eine Entwicklungsreaktion durchgeführt wurde.

#### **6.8.4.3 Detektionssystem alkalische Phosphatase**

Nach der Inkubation der Blotmembran mit dem sekundären Antikörper gekoppelt an AP wurde dreimal für 10 min mit TBS-T und anschließend einmal 10 min mit TSM gewaschen. Danach wurde für ca. 5 min in der Substratlösung für die alkalische Phosphatase (NBT/BCIP-Färbelösung) inkubiert bis die spezifischen Proteinbanden deutlich als violette Banden zu erkennen sind.

#### **6.8.4.4 ECL-Blot**

Hierbei ist der sekundäre Antikörper an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Mit einem geeigneten Substrat wird eine Chemolumineszenz hervorgerufen, deren Position auf der Blotmembran durch Schwärzung eines lichtempfindlichen Films während der Exposition in einer Autoradiographiekassette detektiert wurde.

Die gewaschene Blotmembran wurde für 1 min in  $125 \mu\text{l/cm}^2$  einer 1:1 Mischung der Detektionsreagenzien (SuperSignal, Pierce) inkubiert und die Blotmembran

sofort nach dem Abtropfen gegen einen ECL-Hyperfilm exponiert. Die Entwicklung erfolgte mit dem Optimax Typ TR Filmentwickler.

#### **6.8.4.5 Immunpräzipitation**

In einem Volumen von 4 ml wurde ca. 1 mg F11- oder F11/TRPV1-Particulate-Fraktion in 0.25 M STM-Puffer (siehe 6.8.7) auf IP-Puffer-Bedingungen eingestellt und für 30 min bei RT unter Schütteln solubilisiert. Die Proben wurden dann für 20 min in der Ultrazentrifuge bei 40.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zu je 1 ml der Überstände wurden 5 µg Antikörper gegeben und 30 min unter Schütteln (> 14.000 rpm) bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle wurde 50 µg des Immunisierungspeptides vor Antikörperzugabe eingesetzt. 20 µl in IP-Puffer vorinkubiertes Protein G-Sepharose-Konjugat wurden hinzugefügt und die Proben über Nacht unter Schütteln (> 14.000 rpm) bei 4°C inkubiert. Die Antigen-Antikörper Komplexe (IP-Pellet) sedimentierten danach durch Schwerkraft und wurden dreimal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen. 200 µl des IP-Überstandes wurden für eine Aceton-Fällung (+ 400 µl Aceton, 30 min auf Eis, 20 min zentrifugiert) abgenommen. Die Proteine im IP-Pellet wurden dann mit 25 µl 2× SDS-Probenpuffer von der Protein G-Sepharose eluiert. Der Erfolg der Immunpräzipitation wurde nach SDS-PAGE im Western Blot nachgewiesen.

### **6.8.5 Färbetechniken für Proteine**

#### **6.8.5.1 Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE**

Das zu färbende Gel wurde direkt nach Ende der Elektrophorese für 1 h in die Coomassie-Färbelösung überführt und mild geschüttelt. Die Entfärbung erfolgte in Coomassie-Entfärbelösung über Nacht.

#### **6.8.5.2 Silberfärbung nach SDS-PAGE<sup>196</sup>**

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine im Gel durch Inkubation in Fixierlösung für mindestens 30 min oder über Nacht bei RT fixiert. Um für die nachfolgende Silberfärbung das notwendige neutrale pH-Millieu zu schaffen, wurden die Gele für 2 h in der Glutaraldehydlösung inkubiert, dreimal für 20 min in einem großem Überschuss an H<sub>2</sub>O-bidest. gewaschen und die Inkubation in Färbelösung für 30 min

gestartet. Danach wurden die Gele für 30 sec mit H<sub>2</sub>O-bidest. gewaschen und die gefärbten Proteinbanden für 5-20 min entwickelt. Um eine Überfärbung zu vermeiden, wurde die Färbereaktion mit EDTA abgestoppt. Die gefärbten Gele können in dieser Lösung für mehrere Tage bei 4°C aufbewahrt werden.

#### **6.8.5.3 Silberfärbung für MALDI-MS<sup>197</sup>**

Bei dieser Variante der Silberfärbung von Proteinen im Gel wird auf einen Fixierungsschritt mit Glutaraldehyd verzichtet. Dadurch können interessierende Proteine später tryptisch im Gel gespalten werden und sind somit der Analyse mittels MALDI-MS zugänglich. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele zunächst für 20 min fixiert, danach für 10 min in 50% (v/v) Methanol und für weitere 10 min in H<sub>2</sub>O (HPLC-Grad) inkubiert. Die Sensibilisierung erfolgte für 1 min. Nach zweimaligem Spülen für je 1 min mit H<sub>2</sub>O (HPLC-Grad) wurden die Gele für 20 min bei 4 °C im Dunkeln mit der Färbelösung inkubiert. Nachfolgend wurde zweimal für 1 min mit H<sub>2</sub>O (HPLC-Grad) gespült und die Färbung entwickelt. Nach Stoppen der Entwicklung können die Gele bei 4°C in H<sub>2</sub>O (HPLC-Grad) gelagert werden.

#### **6.8.5.4 Ponceau-Färbung von Proteinen auf der Blotmembran**

Die Blotmembran (Nitrozellulose oder PVDF) wurde nach dem Transfer der Proteine in Ponceau-S-Lösung überführt und für 5 min gefärbt. Anschließend wurde die Färbelösung mit H<sub>2</sub>O-bidest. abgespült und die Proteine erschienen als rötlich gefärbte Banden.

#### **6.8.6 Analyse N-glycosylierter Proteine**

In N-verknüpften Oligosacchariden ist GlcNAc unveränderlich β-glykosidisch an das Amidstickstoffatom eines Asn-Restes in der Proteinsequenz Asn-X-Ser/Thr gebunden, wobei X jede Aminosäure außer Pro oder Asp sein kann. PNGase F (Peptid-N-glycosidase F, Peptid-N<sup>4</sup>-(Acetyl-β-Glucosaminy)-Asparagin-Amidase) spaltet Typen Asparagin-gebundener N-Glycanketten, vorausgesetzt, dass sowohl die NH<sub>2</sub>- als auch die COOH-Gruppe in peptidischer Bindung vorliegen.

Der Reaktionsmechanismus unterscheidet sich von dem der Endo H (Endoglycosidase H, Endo- $\beta$ -N-Acetylglucosamidase H), welche die glycosidische Bindung zwischen den beiden GlcNAc-Molekülen spaltet. Mit Hilfe der PNGase F lassen sich also N-glycosylierte Proteine erkennen, während Endoglycosidase H Aufschluss über die Existenz von Glycosylierungen des „high mannose“-Typs und „hybrid“-Typs gibt. Glycosylierung vom „complex“-Typ wird nicht gespalten.

Für einen PNGase F-Verdau wurden 60-100  $\mu$ g Zellhomogenat und zur Kontrolle 30  $\mu$ g einer AChR-Präparation nach Angaben des Herstellers in einem Volumen von 30  $\mu$ l in 0,5% SDS und 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol für 10 min bei 70°C denaturiert. Die Deglycosylierung erfolgte dann in einem Volumen von 50  $\mu$ l in 50 mM  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ , pH 7,5, 1% NP-40 mit 3  $\mu$ l PNGase F (1500 U) für 1 h bei 37°C. Der Verdau mit Endo H erfolgte ohne Denaturierung in einem Volumen von 50  $\mu$ l mit 50 mM  $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ , pH 6,5, < 0,1% SDS und 1  $\mu$ l Endo H (5 mU) für 1 h bei 37°C. Als Kontrollen dienten Proben ohne Enzym. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 1 Vol 4 $\times$  SDS-Probenpuffer versetzt und nach SDS-PAGE/Westernblot nach Unterschieden im Molekulargewicht des interessierenden Proteins geschaut.

### 6.8.7 Subzelluläre Fraktionierung von neuronalen Gewebeproben

Frisches oder in Stickstoff eingefrorenes Gewebe (Rattenhirn, Rückenmark oder DRG) wurde in 10 ml/g Gewebe Homogenisierungspuffer (Solution A) + PI (1 Protease Inhibitor Cocktail Tablette/50 ml, 2 mM PMSF) mit 12 Zügen bei 900 rpm im Teflondouncer auf Eis homogenisiert (**Homogenat**) und 10 min bei 1.000  $\times$  g zentrifugiert. Das resultierende Pellet **P1** wurde erneut mit 10 ml/g Gewebe Solution A wie oben homogenisiert und zentrifugiert. Das Pellet **P1'**, welches Zelltrümmer und Kerne enthält wurde verworfen. Die Überstände beider Zentrifugationen (**S1** und **S1'**) wurden vereinigt und 15 min bei 12.000  $\times$  g zentrifugiert. Der Überstand **S2** enthält den löslichen Proteinextrakt des Gewebes und wurde unter anderem für die Suche nach TRPV1-Interaktionspartnern benutzt. Das resultierende Pellet **P2** (**crude membrane fraction**) wurde mit 10 ml/g Gewebe Solution A gewaschen und nach 6 Zügen bei 900 rpm im Teflondouncer für 20 min bei 12.000  $\times$  g zentrifugiert. Das **P2'** Pellet wurde dann in 1,5 ml/g Gewebe Solution B + PI resuspendiert und auf einen Stufengradient mit 0.85/1.0/1.2 M Sucrose aufgetragen (je Stufe 9,3 ml, Probe:

2,5 ml). Die Zentrifugation erfolgte für 2 h bei  $85.000 \times g$ . **Synaptosomen** konnten an der 1.0/1.2 M Phasengrenze geerntet werden. Diese wurden mit 5 Vol. Tris/HCl 1 mM, pH 8.1 bei  $0^\circ\text{C}$  für 30 min gerührt (osmotischer Schock) und danach für 30 min bei  $33.000 \times g$  zentrifugiert. Das Pellet P3 enthielt die **Synaptosomenmembranen** aus denen nach manueller Resuspension mit 1,5 ml/g Gewebe 5 mM Tris/HCl und einem erneuten Stufengradienten an der 1.0/1.2 M Phasengrenze die **Synaptic junctions** geerntet werden. Diese wurden mit 60 ml/10 g Gewebe mit Solution B + PI und 60 ml/10 g Gewebe Solution C + PI für 15 min bei  $0^\circ\text{C}$  unter Rühren inkubiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei  $32.000 \times g$  erhielt man das Pellet **P4 (PSD, Triton I)** und nach Wiederholung der Prozedur **P5 (PSD, Triton II)**. Im letzten Schritt wurde P5 in 2,5 ml Solution B resuspendiert, auf 9,5 ml 1,5 M Sucrose in einem 12 ml-Röhrchen aufgetragen und für 2 h bei  $201.800 \times g$  (SW-40, 34.300 rpm) zentrifugiert. Das letzte Pellet **P6 (final PSD)** wurde in 2 ml 50 mM HEPES pH 7.2 manuell homogenisiert und portioniert eingefroren. Dieser Schritt ist sehr schwierig, da das Pellet sehr klebrig ist und sehr gerne an die Plastik-Pipettenspitzen adsorbiert.

#### 6.8.7.1 Harnstoff/Carbonat-Extraktion von Synaptosomenmembranen

Für das Waschen mit Harnstoff/Carbonat wurden 200  $\mu\text{g}$  Synaptosomenmembranen mit Waschpuffer (4 M Harnstoff / 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) in 1 ml 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Nach 20 min Ultrazentrifugation bei 50.000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  wurde das Pellet 5 min lang im Ultraschall-Bad in  $1\times$  BAC-SB resuspendiert und für zwei Ansätze verwendet. Der Überstand wurde mit TCA gefällt und auf die 1. Dimension (16-BAC-Gel) aufgetragen. Zur Kontrolle wurden 100  $\mu\text{g}$  Synaptosomenmembranen aus Rattenrückenmark 30 min bei  $14.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und das Pellet in  $1\times$  BAC-SB aufgenommen.

#### 6.8.8 Nachweis von Protein-Protein Interaktionen (TRPV1/TRPV2)

Mit Hilfe des pMAL™ Protein Fusion and Purification System wurde die cDNA des zu exprimierenden Protein hinter das *malE*-Gen des pMAL-Vektors inseriert. Das *malE*-Gen codiert für das Maltose-bindende Protein (MBP). Das Resultat einer

bakteriellen Expression ist ein MBP-Fusionsprotein, das nach Zellaufschluss und Zentrifugation in löslicher Form vorliegen sollte. Das System benutzt den starken Ptac Promoter und das Initiationssignal für die Translation von MBP, um das Fusionsprotein mit hoher Ausbeute zu exprimieren. Dieses wird dann über einen Affinitätsreinigungsschritt (Amylose-Säule) für MBP von bakteriellen Proteinen abgetrennt und kann für Interaktionsexperimente verwendet werden. Zur Expression von MBP-Fusionsproteinen mit den cytoplasmatischen Termini von TRPV1 oder TRPV2 wurden die folgenden Vektorkonstrukte hergestellt: pMALc2x/TRPV1<sub>(1-431aa)</sub> (NT), pMALc2x/TRPV1<sub>(686-838aa)</sub> (CT) und pMALc2x/TRPV2<sub>(645-761aa)</sub> (CT). Der Vektor pMALc2x/MBPstop, der die alleinige Expression von MBP ermöglicht wurde, von C. Goswami hergestellt.

### 6.8.8.1 Proteinexpression in *E. coli* und Zellaufschluss

#### Proteinexpression in BL21(DE3)

Für die induzierbare Expression in *E. coli* wurde der Stamm BL21(DE3) verwendet, der den lacI-Repressor (lacI<sup>q</sup>) konstitutiv exprimiert. Nach Transformation mit den entsprechenden Plasmiden wurden die Bakterien in 5 ml LB/Glucose-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 30°C oder 37°C über Nacht inkubiert. Die Glucose dient hierbei als Kohlenhydratquelle, so dass der lacI-Repressor den Zugang zum T7-Promotor für die RNA-Polymerase blockiert. Die Kultur wurde dann im Verhältnis 1:10 in LB/Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt und bis zu einer optischen Dichte  $OD_{550nm} = 0,5$  kultiviert. Die Induktion der Expression über das lac-Operon erfolgte mit 0,3 mM IPTG, gleichzeitig wurde eine Protease Inhibitor Cocktail Mini Tablette zugegeben und die Expression nach 1-2 h beendet. Danach erfolgte eine weitere Inkubation der Kultur für 20 min bei 4°C. Als Kontrollen wurden von der Kultur 1 ml vor und 0,5 ml nach Induktion entnommen ( $T_0$ ,  $T_{1h}$ ,  $T_{2h}$ ), die Bakterien abzentrifugiert und mit SDS-Probenpuffer versetzt.

#### Bakterieller Zellaufschluss

Nach Zentrifugation wurde das Pellet der restlichen Kultur in 10 ml Bakterien-Lysepuffer aufgenommen ( $S_{Lyse}$  = Überstand Lyse) und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 7 ml Amylose-Säulenpuffer

aufgenommen und die Zellen mittels dreimaligem Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen bei 30°C im Wasserbad aufgebrochen („freeze and thaw“). Der Aufschluss wurde mit 40 µl Benzonase versetzt und 30 min auf Eis inkubiert, danach für 15 min bei  $12.000 \times g$ , 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser Überstand ( $S_{\text{Einf./Auf.}}$ ) enthält neben bakteriellen Proteinen auch das rekombinant exprimierte Fusionsprotein und wird zur Affinitätschromatographie eingesetzt. Als Kontrollen wurden Proben der beiden Überstände mit SDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet ( $P_{\text{Einf./Auf.}}$ ) wurde zur Feststellung der Löslichkeit des Fusionsproteins mit 0,5% NP-40 resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand mit SDS-Probenpuffer versetzt. Alle Kontroll-Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

### **6.8.8.2 Affinitätschromatographie zur Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern**

Für die Affinitätschromatographie wurde das Fusionsprotein auf einer Amylose-Säule immobilisiert und Proteinproben im Batch-Verfahren zugegeben. Potentielle Interaktionspartner können binden und werden mit dem Fusionsprotein eluiert.

Für die Suche nach Interaktionspartnern wurden als lösliche Proteinproben für das TRPV2-Fusionsprotein der lösliche Überstand einer F11-Particulate-Präparation (siehe 6.7.4) in Amylose-Säulenpuffer (F11 soluble) und für die TRPV1-Fusionsproteine zusätzlich der Überstand S2 einer Gewebepräparation aus Ratten-Rückenmark (siehe 6.8.7) verwendet. Als unlösliche Proteinproben für das TRPV2-Fusionsprotein wurde das Pellet einer F11-Particulate-Präparation in 1% NP-40 oder 1% Na-Cholat für 1 h bei 4°C solubilisiert und die Detergenz-Konzentration auf 0,1% zur Affinitätschromatographie verdünnt (F11  $P_{0,1\% \text{ NP-40}}$ , F11  $P_{0,1\% \text{ Na-Cholat}}$ ).

In einem Standardansatz wurden 30 µl des Amylosesäulen-Materials zweimal mit Säulenpuffer equilibriert. 150 µg Fusionsprotein des Zellaufschluss-Überstandes eines bakteriellen Expressionsansatzes sowie MBP als Kontrolle (20 µg) wurden für 1 h bei RT unter Schwenken an die Säule gebunden. Nach Absetzen des Säulenmaterials wurde die Überstände ( $S_1$ ) vorsichtig abgenommen, die Säule zweimal mit 1 ml Säulenpuffer gewaschen und die Waschüberstände abgenommen ( $W_1$ ,  $W_2$ ). Nach den Waschschrritten wurde zur Beurteilung der Bindung das

Fusionsprotein durch direkte Elution mit SDS-Probenpuffer überprüft (E). Zur Suche nach potentiellen Bindungspartnern von TRPV1 oder TRPV2 wurde die zu untersuchende Probe in einem Volumen von 1 ml und einer Konzentration von 1 mg/ml zum Säulenmaterial mit gebundenem Fusionsprotein gegeben. Unter Schwenken erfolgte die Inkubation für 1,5 h bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit 1 ml Säulenpuffer wurden die Proteine durch entweder direkte Gabe von SDS-Probenpuffer zum Säulenmaterial oder mit Amylose-Elutionspuffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und Proteinbanden potentieller Interaktoren mittels MALDI-MS analysiert.

### 6.8.9 Identifizierung von Proteinen mittels MALDI-MS

#### **Prinzip von MALDI-MS**

Die Matrix-unterstützte Laserdesorption/ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ist eine der wichtigsten massenspektrometrischen Methoden in der Proteinanalytik<sup>143</sup>. Proteine können anhand ihres Peptidmassen-Fingerprints in Kombination mit geeigneten Computerprogrammen wie PeptideSearch, Mascot oder ProFound im Subpicomolbereich identifiziert werden. Die zu untersuchende Probe wird mit einer Laser-absorbierenden Matrixsubstanz kokristallisiert und aus der festen Phase durch Laserbeschuss ionisiert (Laserdesorption). Die Analytionen befinden sich in der Gasphase und werden durch ein elektrostatisches Feld beschleunigt. Die Beschleunigung findet erst verzögert nach der Desorption statt („delayed extraction“), was eine höhere Messgenauigkeit zur Folge hat<sup>207,208</sup>. Die Massenanalyse erfolgt bei der MALDI-MS in der Regel durch Flugzeitmessung („time of flight“, TOF) nach der Beschleunigung der Analytionen bis zum Auftreffen auf den Detektor. Daraus lässt sich das m/z-Verhältnis eines Analytions berechnen.

#### **Peptidsequenzierung mit MALDI-MS**

Für die Sequenzierung von Peptiden mittels MALDI-MS wird der metastabile Zerfall („post source decay“, PSD) eines Teils der Analytionen nach der Beschleunigung ausgenutzt<sup>209,210</sup>. Dabei erfolgen insbesondere Bindungsbrüche entlang des Peptidrückgrats. Es entstehen N-terminale A-, B- und C-Ionen sowie C-terminale X-, Y-, und Z-Ionen. Durch den Bruch der Peptidbindung entstehen am häufigsten B-

und Y-Ionen. Im linearen Detektionsmodus wird dieser Zerfall nicht detektiert. Im Reflektormodus jedoch erfolgt eine Abbremsung und erneute Beschleunigung der Analytionen sowie ihrer Fragmente. Wird die Reflektorspannung schrittweise abgesenkt, so treffen auch die Fragmente am Reflektor-Detektor auf. In einem bestimmtem Zeitfenster kann so auf der Grundlage des Fragmentationenspektrums einer bekannten Substanz ein Gesamt-Fragmentationenspektrum mit den Fragmenten des gesuchten Peptides zusammengesetzt werden. Aus diesem Spektrum kann die Peptidsequenz abgeleitet werden.

### **6.8.9.1 Tryptischer Verdau von Proteinen in Polyacrylamidgelen**

#### **Entfernung von Farbstoff und SDS**

Proteinbanden oder -spots wurden aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten, zerkleinert und in Schwellpuffer (bei Banden 50 µl, bei Spots 20 µl) 15 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Dann wurde 100% Acetonitril im Verhältnis 1:1 dazugegeben und erneut 15 min unter Schütteln inkubiert. Beim Schrumpfen der Gelstücke tritt Farbstoff aus. Die Überstände wurden entfernt und durch 100% Acetonitril ersetzt. Es wurde so lange inkubiert, bis die Gelstücke milchig weiß erschienen. Die Überstände wurden entfernt und die Gelstücke erneut schrittweise in Schwellpuffer bis 100% Acetonitril wie oben inkubiert. Die Prozedur muss so lange wiederholt werden, bis die Gelstücke vollständig entfärbt und neutralisiert sind.

#### **Reduktion/Carbamidomethylierung**

Nach Abnahme der letzten Überstände und Lyophilisieren wurden die Proben in Reduktionslösung für 30 min unter Schütteln bei 56°C inkubiert. Die Überstände wurden danach entfernt und die Gelstücke in 100% Acetonitril geschrumpft. Danach erfolgte die Inkubation der Stücke für 20 min im Dunkeln mit Iodacetamidlösung. Die Lösung wurde erst durch Schwellpuffer und nach 15 min unter Schütteln durch 100% Acetonitril ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min unter Schütteln wurden die Proben nach Abnahme der Überstände lyophilisiert.

#### **Tryptische Spaltung**

Die Rehydratation der Gelstücke erfolgte in der Trypsinlösung für 30 min auf Eis. Die überschüssige Trypsinlösung wurde dann durch so viel Verdauopuffer ersetzt, dass die Gelstücke gerade bedeckt werden. Die Verdau-Reaktion wurde für 24 h bei 37°C

unter mildem Schütteln durchgeführt. Nach 12 h wurden jeweils 1 µl der Verdauüberstände entnommen und unter Verwendung der FENC-Matrixpräparation (fast evaporation/nitrocellulose) mit MALDI-MS vermessen.

### **Elution der Peptide**

Zu jedem Ansatz wurde das 5-fache Volumen Verdaupuffer hinzugefügt und nach 15 min Inkubation unter Schütteln das gleiche Volumen an 100% Acetonitril dazu pipettiert. Nach erneuter Inkubation wurden die Überstände in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und die Gelstücke in 100% Acetonitril geschrumpft. Die Überstände wurden mit dem ersten Elutionsschritt vereinigt und die Gelstücke für 15 min in 5% Ameisensäure rehydratisiert. Nachdem noch mal 100% Acetonitril dazugegeben und 15 min inkubiert wurde, wurden die Überstände jeweils mit den vorangegangenen Elutionsschritten vereinigt, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

### **Entsalzen der Peptide über ZipTips**

Es wurden ZipTips C18 (tip size P10) von Millipore zur Entsalzung von Verdauemischen verwendet. Hierbei wird die Probe an ein Umkehrphasen-Säulenmaterial (Reversed Phase HPLC, 0,5 µl Bettvolumen) in der Spitze gebunden. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Elution der Peptide schrittweise mit 30% und 50% (v/v) Methanol mit 5% (v/v) Ameisensäure oder schrittweise mit 30%, 50% und 80% (v/v) Acetonitril mit 5% (v/v) Trifluoressigsäure. Zur Messung der Proben mit MALDI-MS wurde sie mit der Matrix-Doppelschichtpräparation vorbereitet.

## **6.8.9.2 Vorbereitung der Proben für die MALDI-MS**

### **Matrix-Dünnschichtpräparation für Verdauüberstände<sup>197</sup>**

Die FENC-Matrixpräparation eignet sich für die schnelle Messung von Verdauüberständen, die Proben sind allerdings nicht sehr homogen (durch Waschen laufen sie zum Rand des Trägers) und die Matrix nicht so stabil. Es wird eine gesättigte Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in Aceton (CCA) im Verhältnis 4:1 mit Nitrocellulose (10 mg/ml in Aceton:Isopropanol 1:1) gemischt. 0,4 µl dieser FENC-Lösung werden auf den MALDI-Probenträger aufgetragen und bilden nach dem Verdampfen des Lösungsmittels einen dünnen Matrixfilm. Vorgelegt werden dann 0,5 µl 10% (v/v) Ameisensäure und 0,4 µl des

Verdauüberstandes dazugemischt. Nach dem Trocknen werden die Auftragspunkte einmal mit 5 µl 5% (v/v) Ameisensäure und einmal mit 5 µl H<sub>2</sub>O gewaschen.

### **Matrix-Doppelschichtpräparation für entsalzte Peptide**

Diese Methode dient der Messung von Peptiden nach Reinigung über ZipTips. Die Proben sind homogener, die Matrix stabiler, es kann länger mit dem Laser auf eine Stelle geschossen werden. (Standard-Matrixpräparation). 0,4 µl der FENC-Lösung werden auf den MALDI-Probenträger vorgelegt und bilden nach dem Verdampfen des Lösungsmittels einen dünnen Matrixfilm. 0,5 µl CCA in 30% (v/v) Acetonitril/ 0,1% (v/v) TFA werden mit 0,5 µl der Probe gemischt und dieser 1 µl aufgetragen. Sobald die Proben getrocknet sind, werden je 5 µl dH<sub>2</sub>O aufgespottet und mit Pressluft wieder entfernt.

### **6.8.9.3 Auswertung massenspektrometrischer Daten**

Die Datenbanksuche zur Identifizierung von Proteinen anhand massenspektrometrischer Daten erfolgt nach proteolytischem Verdau des zu analysierenden Proteins anhand des Abgleichs gemessener Peptidmassen mit theoretisch vorhergesagten Peptidmassen von Proteinen in Protein-Datenbanken (z.B. SwissProt, EMBL-Datenbank, NCBI). Zuvor erfolgt die interne Kalibrierung der Spektren der Software BRUKER Xtof 5.0.1. Der Abgleich erfolgt dann unter Zuhilfenahme der Software BRUKER DataAnalysis und zugänglichen Analyseprogrammen im Internet. Hierbei werden Proteine als beste Treffer bewerten, die die größte Anzahl von Übereinstimmungen zwischen gemessenen und vorhergesagten Peptidmassen aufweisen. Ähnlich kann mit Fragmentionenmassen aus Fragmentierungionenspektren zur Gewinnung von Sequenzinformation verfahren werden. Die Stringenz der Suche (z.B. die tolerierte Abweichung der gemessenen Massen von den theoretischen Massen) bestimmt der Anwender.

Mascot: <http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/home.html>

ProFound: <http://www.proteometrics.com>