

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

3.1.1.1 Bakterienstämme

Bezeichnung	Genetischer Marker	Herkunft
<i>E. coli</i> DH10 β	F' mcrA Δ -(mrr hsdRMS-mcrBC) ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara,leu)7697 galUgalK λ rpsL end A1 nupG	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

3.1.1.2 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Genetischer Marker	Herkunft
COS.M6	African Green Monkey Kidney cells, SV40 transformiert	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig, Deutschland
HEK293	Human Embryonic Kidney cells, Adenovirus Typ 5 transformiert	ECACC, Salisbury, UK

3.1.2 Chemikalien

Reagenz	Bezugsquelle
¹²⁵ I-konjugiertes anti-Kaninchen IgG (28-111 Bq/mmol)	Amersham, Braunschweig, Deutschland
10 Kilobasen DNA Leiter	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
[³ H]Arginin-Vasopressin (68,5 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Braunschweig, Deutschland
[³ H]cAMP	NEN Life Science Products, Deutschland
[α - ³² P]ATP (30 Ci/mmol)	NEN Life Science Products, Köln, Deutschland
ABI PRISM TM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland
Agar	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Agarose	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, Deutschland
Alkalische Phosphatase-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA
AquaSave	Zinsser Analytic, Deutschland
Arginin-Vasopressin	FMP, Berlin, Deutschland
BaculoGold TM Virus DNA	Pharmingen
Casein	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Coomassie Brillantblau G250	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxide	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Dithiothreitol	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
DNase I, Rnase frei	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Dowex [®] 50W-X8	BioRad Laboratories, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol, z.A.	J.T. Baker, Niederland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Expand TM High Fidelity PCR System	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Fötales Kälberserum	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
GeneClean [®] II Kit	BIO101, Inc., USA
Geneticin	Calbiochem, USA
Glücksklee [®] Magermilchpulver	Nestle Deutschland AG
Glycerin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Glycin	Calbiochem, USA
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
JETstar Plasmid Midiprep Kit	Genomed
Kanamycin (Kanamycin/A) Monosulfat	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Kaninchen anti-GFP-Antiserum	FMP, Berlin, Deutschland
Lipofectamin TM Reagent	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Lipofectin TM Reagent	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat, reinst (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NeutrAvidin TM (immobilisiert)	Pierce, Rockford, IL, USA
Nitrozellulose (OPTITRAN BA-S 85)	Schleicher & Schüll
Oligonukleotide	Biotez, Berlin, Deutschland
Penicillin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Peptid-Endoglycosidase F	New England BioLabs, Schwalbach, Deutschland
Peptone 140	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Poly-L-Lysine	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Ponceau S, reinst	Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QuickChange TM <i>in vitro</i> Mutagenese System	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, Schwalbach, Deutschland
Rotiphorese [®] Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Streptomycin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford, IL, USA
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Seromed, Berlin, Deutschland
Trypsin	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland
Trypsininhibitor Typ I-S, aus Sojabohnen	SIGMA, Deisenhofen, Deutschland

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

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

3.1.3 Desoxyribonukleinsäuren

3.1.3.1 Vektoren

Vektor	Resistenzen	Replikon	Herkunft
pcDNA1.Neo	Kn ^R	Co1E1, SV40, M13	Invitrogen
pcDNA3	Kn ^R , Ap ^R	Co1E1, Sv 40	Invitrogen
PEGFP-N1	Kn ^R , Neo ^R	Sv 40, CMV-IE	Clontech

3.1.3.2 Rekombinante Plasmide

Rekombinantes Plasmid *1	Vektor	Funktioneller Bereich	Herkunft
Plasmide für das HEK 293-Zell-Expressionssystem mit V2R-cDNA			
pRCDN2	pcDNA1.Neo	V2R, Kn ^R	Schülein, R. 1996b
pC112S	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pC112A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pC192S	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pC192A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pC195S	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pC195A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pG185C	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pG185C/C195S	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pG185C/C195A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pR202C	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pR202C/C195S	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pR202C/C195A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pY205C	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pY205C/C195S	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit
pY205C/C195A	pRCDN2	V2R, Kn ^R	Diese Arbeit

Plasmide für das HEK 293-Zell-Expressionssystem mit V2R-GFP-Fusionsproteinen			
pEU367.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Hermosilla,R. 2000
pC112S.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pC112A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pC192S.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pC192A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pC195S.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pC195A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pG185C.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pG185C/C195S.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pG185C/C195A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pR202C.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pR202C/C195S.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pR202C/C195A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pY205C.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pY205C/C195S.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit
pY205C/C195A.GFP	pEGFP-N1	V2R-GFP-Fusion, Kn ^R	Diese Arbeit

^{*1} Die Nummern der Plasmide entsprechen den ausgetauschten Aminosäuren.

3.1.3.3 Oligonukleotide^{*1}

Bezeichnung	Sequenz (5'® 3')	Template	Resultierende Plasmide
C112S-for	GGCCAGATGCCCTGAG TCGGGCCGTG	PRCDN2, pEGFP	pC112S, pC112S.GFP
C112A-for	GGCCAGATGCCCTGGC TCGGGCCGTGAAG	PRCDN2, pEGFP	pC112A, pC112A.GFP
C192S-for	GGGGTCACTGACAGCT GGGCCTGCTTTG	PRCDN2, pEGFP	pC192S, pC192S.GFP
C192A-for	GCGGGGTCACTGACGC CTGGGCCTGCTTTG	PRCDN2, pEGFP	pC192A, pC192A.GFP
C195S-for	GACTGCTGGGCCAGCTT TGCGGAGCC	PRCDN2, pEGFP	pC195S, pC195S.GFP
C195A-for	CTGACTGCTGGGCCGC CTTTGCGGAGCCC	PRCDN2, pEGFP	pC195A, pC195A.GFP
G185C-for	CAGCGCAACGTGGAAT GCGGCAGCGGGGTCAC	PRCDN2, pEGFP PC195S/GFP PC195A/GFP	pG185C, pG185C.GFP pC195S/G185C pC195S/G185C.GFP pC195A/G185C pC195A/G185C.GFP
R202C-for	CGGAGCCCTGGGGCTG TCGCACCTATGTC	PRCDN2, pEGFP PC195S/GFP PC195A/GFP	pR202C, pR202C.GFP pC195S/R202C pC195S/R202C.GFP pC195A/R202C pC195A/R202C.GFP
Y205C-for	GCCGTCGCACCTGCGT	PRCDN2, pEGFP	pY205C, pY205C.GFP

	CACCTGGATTG	PC195S/GFP PC195A/GFP	pC195S/Y205C pC195S/Y205C.GFP pC195A/Y205C pC195A/Y205C.GFP
C195D-for	GACTGCTGGGCCGACTT TGCGGAGCCC	PRCDN2	pC195D
C195L-for	GACTGCTGGGCCCTCTT TGCGGAGCCC	PRCDN2	pC195L
C195R-for	GACTGCTGGGCCCGCTT TGCGGAGCCC	PRCDN2	pC195R
C195H-for	GACTGCTGGGCCCACTT TGCGGAGCCC	PRCDN2	pC195H

*1 Dargestellt sind nur die forward-Primer (5'→3'). Die entsprechenden reverse-Primer gehen selbstverständlich in die Mutagenesen mit ein.

3.1.4 Geräte

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

	Heraeus Biofuge <i>pico</i> Sorval RC5C Plus (Dupont) Stratagene PicoFuge®
--	--

Geräte in der Zellkultur

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

Geräte für Elektrophoresen und Transfertechniken

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

3.1.4.1 Rechner

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

3.1.5 Medien

3.1.5.1 Flüssigmedien für *E.coli* und Medienzusätze

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

Luria Bertani (LB) - Medium (Typ Lennox)	Peptone 140 Hefeextrakt NaCl H ₂ O	16 g 10 g 5 g ad 1 l
NZY+-Medium für QuikChange™	Siehe LB-Medium Zugabe nach Autoklavieren: MgCl ₂ x 6 H ₂ O MgSO ₄ x 6 H ₂ O Glukose (steril filtriert)	1 M 1 M 2 M

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

3.1.5.2 Flüssigmedien für eukaryontische Zelllinien und Medienzusätze

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

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

3.1.5.3 Agarplatten für Bakterienkultur

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

3.2 Methoden

Sofern keine Literatur angegeben ist, wurden die Methoden dem Handbuch von Sambrook (Sambrook et al., 1989) entnommen oder stellen in der Arbeitsgruppe entwickelte Methoden dar.

3.2.1 Gerichtete Mutagenese

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

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

Alle Reagenzien werden mit dem Kit geliefert.

<i>Pfu Turbo</i> ™ DNA-Polymerase	2,5 Einheiten/µl
10x Reaktionspuffer	100 mM KCl, 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 200 mM Tris-HCl (pH8,8), 20 mM MgSO ₄ , 1% Triton X-100®, 1 mg/ml BSA)
<i>DpnI</i> -Restriktionsendonuklease	10 Einheiten/µl
Kontroll-Oligonukleotid #1	34-mer 10 µM
Kontroll-Oligonukleotid #2	34-mer 10 µM
pWhitescript™ 4,5 kB Kontroll-Plasmid	5 ng/µl
dNTP Gemisch	20 µM
Epicurian Coli® XL1-Blue kompetente Zellen	8 x 200 µl
pUC18 Kontroll-Plasmid	0,1 ng/µl in TE-Puffer
NZY+-Medium für QuikChange™	s. 3.1.5

Durchführung:

Denaturierung, Bindung der Oligonukleotide und Auffüllreaktion:

1. Folgende Reagenzien werden in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben:

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

Kontrolle: 2 µl (10 ng) pWhitescript™ Kontroll-Plasmid (statt der DNA-Matrize)
1,25 µl (125 ng) der entsprechenden Kontroll-Oligonukleotide (statt der Mutagenese-Oligonukleotide #1 und #2)
auffüllen mit H₂O auf 50 µl Endvolumen.

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

3. PCR: initiale Denaturierung 30 sec mit 95°C, 18 Zyklen (30 sec mit 95 °C, 1 min mit

55 °C, 20 min mit 68 °C (2 min pro 1 kb Plasmidlänge))

Verdau der Ausgangs-DNA-Stränge

Zugabe von 1 µl *DpnI*, Inkubation 2 Stunden 37 °C

Transformation der Epicurian Coli® XL1-Blue Zellen

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

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

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

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

Ausplattierung

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

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

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

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

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

Reagenzien

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

Durchführung

1. Zugabe zur zu amplifizierenden DNA (1 µl) je 1 µl Oligonukleotid, 1 µl dNTP's, 5 µl 10x PCR-Puffer, 0,125 µl Taq-DNA-Polymerase und H₂O bis zu einem Endvolumen von 50 µl
2. initiale Denaturierung 5 min bei 95 °C
3. 25 PCR-Zyklen: Denaturieren der Doppelstränge bei 95 °C, 45 sec

Hybridisierung 55 °C, 45 Sekunden

Auffüllen der DNA-Stränge 72 °C, 90 Sekunden

4. Inkubation bei 72 °C (4 min) als terminaler Schritt

3.2.3 Spezifische DNA-Spaltung durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Reagenzien

Stop-Puffer	0,2% (w/v) Bromphenolblau, 1 mM EDTA (pH 8,0), 50% (w/v) Glycerin
RNase-Lösung	200 µg/ml in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 15 mM NaCl
Restriktionsendonuklease	
10x Reaktionspuffer	

Durchführung

Hinsichtlich der Reaktionsbedingungen werden die vom Hersteller geforderten Bedingungen eingehalten und die mit den Restriktionsenzymen gelieferten Puffer verwendet.

1. Die erforderliche Menge Restriktionsendonuklease wird zu der gelösten DNA pipettiert.
2. Zugabe des entsprechenden 10x Reaktionspuffers und von 0,2 µg RNase.
3. Es wird mit H₂O auf das gewünschte Endvolumens (meist 20 µl) aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert.
4. Die Reaktion wird mit 1/5 Volumen Stop-Puffer abgebrochen und auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen.

3.2.4 Ethanolfällung

Mit Hilfe dieser Methode können alle Nukleinsäuren gefällt werden.

Reagenzien

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

Durchführung

1. Zu der in wässriger Lösung vorliegenden DNA oder RNA wird 1/9 Volumen 3,3 M NaAc-Lösung pH 4,8 und 2,5 Volumen EtOH p.a. gegeben.
2. Zentrifugation (20000 x g, 4 °C, 15 min).
3. Das DNA-Pellet wird in 70%igem Ethanol gewaschen.
4. Zentrifugation wie oben beschrieben und Trocknung der DNA nach der Entfernung des Überstands.
5. Lösen der DNA in einer entsprechenden Menge H₂O.

3.2.5 Horizontale Agarosegelelektrophorese

Reagenzien

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

Durchführung

Gießen des Gels:	je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wählt man unterschiedliche Agarosekonzentrationen (0,8-2% (w/v)).
1 %-iges:	Die Agarose wird in 200 ml 1 x TAE-Puffer suspendiert und durch Aufkochen in der Mikrowelle in Lösung gebracht. Die auf ca. 50°C abgekühlte Lösung wird in eine horizontale Kammer gegossen und nach Erstarren mit TAE-Puffer überschichtet.
Probenauftrennung:	Auftragen der mit Stoppuffer versetzten Proben Trennung bei 80-120 V vom Minus- zum Pluspol
Auswertung:	nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel 15 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt Die Auswertung erfolgt auf dem Transilluminator.

3.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten

mit Hilfe des Gene Clean Kits (Dianova)

Reagenzien

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

Durchführung

1. Ausschneiden der DNA-Bande bei 365 nm UV-Licht aus dem TAE-Gel und Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß
2. Abwiegen des Agarosestückes und Zugabe der 3-fachen Menge ($\mu\text{l} \cong \text{mg}$) NaI-Lösung
3. Ansatz bei 50°C schütteln, bis sich Agarosestück aufgelöst hat
4. Zugabe von 5 μl Glasmilch, Inkubation 5 min auf Eis
5. Zentrifugation (2000 x g, 20 Sekunden, RT)
6. Waschen des Glasmilch-Pellets 3 x mit 400 μl New-Wash-Puffer
7. Resuspension des Glasmilch-Pellets in 25 μl H₂O
8. Elution 3 min bei 50 °C, kurzes Zentrifugieren und Überführen des Überstandes mit der gelösten DNA in ein neues Reaktionsgefäß

3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Reagenzien

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

Durchführung

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

1. Zugabe einer entsprechende Menge 10 x Ligationspuffer sowie 1 µl T4 DNA-Ligase zur zu ligierenden DNA und Auffüllen mit H₂O auf das gewünschte Endvolumen
2. Inkubation 12-16 Stunden bei 16 °C
3. Transformation (siehe 3.2.8)

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

Reagenzien zur Herstellung kompetenter Zellen

100 mM CaCl₂, 100% Glycerin, LB-Medium (s. 3.1.5.1)

Durchführung

1. Beimpfen von 100 ml LB-Medium mit 1ml einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli* Stammes, Inkubation 37°C bis OD₅₉₀ 0,5
2. Zentrifugation der Suspension (7000 x g, 4°C, 20 min)
3. Resuspension mit 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung und Inkubation mindestens 30 min auf Eis
4. Erneute Zentrifugation, Aufnahme in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung

Die kompetenten Zellen können direkt für die Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 1 ml Glycerin als 200 µl Aliquots bis zu einem Jahr bei -80 °C gelagert werden.

Reagenzien zur Transformation von *E. coli*

LB-Medium (s. 3.1.5.1)

Durchführung

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

3.2.9 Nukleinsäure-Isolierungsmethoden

3.2.9.1 Plasmidisolierung aus *E.coli* im kleinen Maßstab

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

3.2.9.2 Plasmidisolierung aus *E.coli* im großen Maßstab mit Hilfe des JETstar Kits (Genomed)

Reagenzien

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

Durchführung

1. Pelletierung der 100 ml Übernacht-Kultur bei 6000 x g, 10 min
2. Resuspension des Zellpellets in 4 ml E1-Puffer
3. Lysieren der Zellen mit 4 ml E2-Puffer, vorsichtig Schütteln, Inkubation 5 min RT
4. Neutralisation mit 4 ml E3-Puffer, vorsichtig Mischen, Inkubation 5 min RT
5. Zentrifugation der Proteine und Zelltrümmer (20000 x g, 10 min, RT)
6. Lysat wird über äquilibrierte (10 ml E4-Puffer) JETstar-Säule gegeben
7. Säule wird 2 x mit 10 ml E5-Puffer gewaschen
8. Elution der DNA mit 5 ml E6-Puffer
9. DNA-Fällung mit 0,7 Volumen (3,5 ml) Isopropanol, 5 min RT, Zentrifugation (22000 x g, 30 min, 4°C)
10. Pellet wird mit 10 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet
11. Resuspension in 500 µl H₂O

3.2.10 DNA Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

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

3.2.11 DNA-Sequenzierung nach der Dideoxymethode

Reagenzien

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit:

Terminator Ready

Reaction Mix (Big Dye)	ddATP-/ddCTP-/ddGTP-/ddTTP-Dye Terminator, dTTP, dATP, dTTP, dCTP, Tris-HCl (pH 9,0), MgCl ₂ Thermostabile Pyrophosphatase, AmpliTaq DNA-Polymerase, FS
10x TBE-Laufpuffer	108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,32 g EDTA, ad 1 l → pH 8,3H ₂ O
Polyacrylamid-Gel (6%)	22,5 g Harnstoff, 4,5 ml 10x TBE, 6,75 ml Acrylamid/ N,N- Methylenbisacrylamid (37,5%/2,5% (w/v)), 150 µl APS-Lösung, ad 45 ml H ₂ O

Sonstiges: 50 mM EDTA (pH 8,0), Formamid deion., Ethanol z.A., Ethanol 70% (v/v),
3 M NaAc (pH 4,6), APS-Lösung 10% (w/v).

Durchführung

Zyklische Sequenzierungsreaktion:

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

Beim Thermocycler wird folgendes Programm eingestellt (35 Zyklen):

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

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

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

3.2.12 Säugerzellkultur

3.2.12.1 Kultivierung von Säugerzellen

Reagenzien

500 x Penicillin/Streptomycin 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

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

Durchführung

COS M6- und HEK 293-Zellen werden in Zellkulturmedium mit Penicillin/Streptomycin in Zellkulturschalen in einem H₂O-gesättigten 5 %-CO₂/95 %-Luftgemisch bei 37 °C kultiviert. Die Zelllinien werden bei Konfluenz je nach Bedarf 1:5-1:15 gesplittet. Zweimal in der Woche wird das Medium gewechselt.

Aussaat

1. Zellen in Zellkulturmedium (37 °C) aufnehmen
2. Nach Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer werden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät (5 x 10⁵ Zellen/60er Schale; 1 x 10⁵ Zellen/35er Schale; 0,5 x 10⁵ Zellen/Well bei einer 24-Well-Platte).
3. Die Inkubation erfolgt über Nacht im CO₂-begasteten Brutschrank bei 37 °C.

3.2.12.2 Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Säugerzellen

Reagenzien

Einfriermedium 10% (v/v) DMSO in Wachstumsmedium

Durchführung

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

Nach zügigem Auftauen bei 37°C werden die Zellen:

1. sofort mit 2 ml Wachstumsmedium mit 20% FKS versetzt und abzentrifugiert (1000 x g, 10 min, Raumtemperatur)
2. Resuspension in Wachstumsmedium und auf Zellkulturschalen ausgesät.
3. Nach 12 h erfolgt der erste vollständige Mediumwechsel.

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

Durchführung

1. Waschen (3x) der Zellen mit eiskaltem PBS und Abschaben mit 1 ml PBSI
2. Lysieren 2 x 2sec mit dem Ultraschallgerät
3. Trennung membrangebundener von löslichen Proteinen durch Ultrazentrifugation (100000 x g, 4 °C, 1 Stunde).
4. Überstand verwerfen, Membranpellet in 1 ml PBSI resuspendieren und erneut zentrifugieren (100000 x g, 4 °C, 1 Stunde)
5. Resuspension des Pellets in 50 – 100 µl PBSI
6. Zum Verdau der DNA in den Proben werden zu 200 µl Membranpräparation 2 µl DNase gegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Reagenzien für die Proteinbestimmung

Coomassie-Proteinreagenz

Brillantblau G250-Lösung (CBB) 100 mg/l CBB, 4,25% (v/v) Ethanol 95 Vol.%,
8,5% (v/v) H₃PO₄ 85%

Ovalbumin 0,1 mg/ml und 1 mg/ml

NaOH 2 N

H₂O

Durchführung

1. Aufnahme einer Eichkurve mit bekannten Ovalbuminkonzentrationen (0, 1, 2, 5, 10, 20 und 40 µg in 50 µl H₂O). Je 5 µl der Proteinprobe werden mit 45 µl H₂O verdünnt.
2. Zugabe von 50 µl NaOH-Lösung, Inkubation 10 min bei 60 °C
3. Zugabe von 1 ml CBB und Messen der Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer

3.2.15 Nachweise der Funktionalität des Rezeptors

3.2.15.1 Bestimmung der Rezeptorzahl an intakten Zellen

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

Reagenzien

Waschpuffer (DPBS) 0,133 g/l CaCl₂·2H₂O, 0,1 g/l MgCl₂·6H₂O, 0,2 g/l KCl,
0,2 g/l KH₂PO₄, 8 g/l NaCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄ ad 1 l H₂O
→ pH 7,4

Bindungspuffer 0,195 - 100 nM [³H]AVP (68,5 Ci/mmol) in DPBS

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

Durchführung

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

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

1. Aussaat und Transfektion der Zellen in 24-well Platten (siehe 3.2.13), Bindungsversuch 48 Stunden nach Transfektion
2. Waschen der Zellen mit eiskaltem Waschpuffer (2 ml) bei 4°C
3. Bestimmung der totalen Bindung durch Zugabe von 450 µl Bindungspuffer der entsprechenden Verdünnung [³H]AVP in jedes well
4. Bestimmung der unspezifischen Bindung durch Zugabe von 450 µl Verdrängungspuffer der entsprechenden Verdünnung in jedes well
5. Inkubation 2 Stunden bei 4 °C
6. Waschen der Zellen 3x mit Waschpuffer (je 2 ml)
7. Lyse der Zellen mit 500 µl Lysis-Puffer
8. Überführen des Lysates in ein 5 ml Szintillationsgefäß und vermischen mit 4 ml Aquasafe 300 Plus
9. Messung der Radioaktivität mit Hilfe eines β-Counters.

Zur korrekten Bestimmung der Rezeptorzahl pro Zelle sowie der Rezeptorzahl pro mg Protein wurde von jedem Bindungsversuch aus zwei wells Zellzahl (siehe 3.2.12.1) und aus zwei wells die Proteinmenge (siehe 3.2.14) ermittelt.

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

Berechnung der K_D und B_{max} nach Scatchard

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

Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen pro Zelle

Anhand der Werte von B_{max} (Mol/l), Zellzahl pro well (n), Inkubationsvolumen in ml (V) und Proteinkonzentration in mg/l (P) wird die Anzahl der Bindungsstellen pro Zelle (N) und pro mg Protein (N_p) (fmol/mg Prot.) berechnet.

$$N = \frac{B_{MAX} \times n}{(1000 / V) \times 6,23E+23} \qquad N_p = \frac{B_{MAX}}{P \times 1E+15}$$

3.2.15.1 Einfluß von Dithiotreithol (DTT) auf die Bindungsfähigkeit der Rezeptoren an intakten Zellen

In diesem Versuch soll der Einfluß des reduzierend wirkenden DTT auf die Bindungsfähigkeit der sich an der Zelloberfläche befindlichen V2-Rezeptoren untersucht werden.

Der Bindungsversuch wird wie unter 3.2.15.1 beschrieben angesetzt und durchgeführt. Die Zellen werden in der 24 well Platte vor dem Waschen mit dem eiskalten Waschlösungspuffer mit DTT behandelt.

Reagenzien

Dithiotreithol-Stammlösung 500 mM DTT in a. dest.

Durchführung

1. Zugabe von DTT-Verdünnungen (Endkonzentration 400 μ M - 3,625 μ M) in das Medium der transfizierten Zellen 1 Stunde vor dem Bindungsversuch.
2. Inkubation 1 Stunde bei 37°C
3. 3-4 maliges vorsichtiges Waschen mit eiskalter Waschlösung vor Zugabe des Bindungspuffers.

3.2.15.2 [³H]AVP-Bindung an Gesamtmembranen

Bei diesem Versuch werden die Zellen vor dem Bindungsversuch aufgeschlossen, wodurch die AVP-Bindung auch an intrazellulären Rezeptoren untersucht werden kann. In dieser Arbeit wurde nur die [³H]AVP-Bindung im Sättigungsbereich (10 nM [³H]AVP) bestimmt.

Reagenzien

PBS	siehe 3.2.12.1
Tris-ME	50 mM Tris HCl, 2 mM EGTA, 10 mM MgCl ₂ → pH 7,2
Bacitracin-Stocklösung	2,13 g Bacitracin ad 10 ml H ₂ O (Thermische Behandlung: 1 Stunde bei 70 °C)
Aprotinin-Stocklösung	0,15 g Aprotinin, ad 10 ml H ₂ O
Tris-BAME Puffer	500 ml Tris-ME, 500 μ l Bacitracin-Stocklösung, 500 μ l Aprotinin-Stocklösung
[³ H]AVP-Lösung	10 nM [³ H]AVP in Tris-BAME (pH 7,4)
AVP-Lösung	0,4 mM AVP in Tris-BAME (pH 7,4)
Polyethylenimin-Puffer	0,1% (w/v) Polyethylenimin
Aquasafe 300 Plus	Szintillator

Durchführung

Präparation der Membranen

1. Waschen einer mit transient transfizierten COS.M6-Zellen konfluent bewachsenen 60er Schale (s. 3.2.13) 2 x mit je 2 ml eiskaltem PBS
2. Ablösen der Zellen mit einem Schaber in 1 ml PBS

3. Zentrifugation 400 x g, 5 min, 4 °C und Aufnahme des Pellets in 1 ml Tris-BAME
4. Aufschließen der Zellen im Homogenisator mit 10 Impulsen bei 800 rpm
5. Zentrifugieren der Suspension bei 26000 x g für 35 min bei 4 °C

Resuspension des Pellets in 500 µl Tris-BAME (10 µl der Membransuspension werden für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen.)

6. Einstellen der Proteinkonzentration auf 0,5 µg Protein/µl mit Tris-BAME (Membran-Stocklösung)
7. Mischen von 100 µl Membran-Stocklösung mit 50 µl [³H]AVP-Lösung und 50 µl Tris-BAME (für die totale Bindung)
8. Mischen von 100 µl Membran-Stocklösung mit 50 µl [³H]AVP-Lösung und 50 µl AVP-Lösung (für die nichtspezifische Bindung)
9. Inkubation aller Ansätze 2 Stunden bei 25 °C im Schüttelwasserbad.

Im Anschluss daran werden die Proben durch ein in Polyethylenimin-Puffer präinkubiertes Wathman Filterpapier in eine Harvester-Anlage gesaugt. Die Membranen binden dabei an die Filter. Die Filter werden 2 x mit PBS gewaschen, ausgeschnitten und in einem 5 ml Szintillationsgefäß mit 4 ml Aquasafe 300 Plus versetzt. Die Proben werden im β-Counter gemessen und mit Hilfe des GraphPad Prism[®] Programms (Version 3.00) ausgewertet. Die spezifische Bindung ergibt sich aus der Differenz von totaler und nichtspezifischer Bindung.

3.2.16 Adenylylzyklase-Versuch

Reagenzien

Homogenisierungspuffer (HP)	27% (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA, 20 mM HEPES, ad 500 ml H ₂ O → pH 7,8
Rehomogenisierungspuffer (RP)	1 mM EDTA, 20 mM HEPES, 2% (w/v) BSA, ad 500 ml H ₂ O → pH 7,8
AVP Verdünnungsreihe	0-10000 nM AVP, ad 120 µl RP/2% BSA
Forskolin-Lösung	1 mM Forskolin, ad 60 µl RP/2% BSA
ReaMix	166,66 mM Tris-HCl, 13,33 mM MgCl ₂ , 6,66 mM EDTA, 3,33 mM IBMX, 3,33 mM cAMP, 0,33 mM ATP, 0,03 mM GTP, 3,33 mM DTT, 51 mg Creatin Phosphokinase, 13,2 mg Phosphocreatin, 60 mg BSA, 0,75 µCi pro Säule [α ³² P]ATP, ad 3 ml H ₂ O
PBS	(s. 3.2.13)
Stop-Lösung	4 mM ATP, 1,4 mM cAMP, 2% (w/v) SDS, 0,0125 µCi pro Säule [³ H]cAMP, ad 250 ml H ₂ O
Imidazol Puffer	0,1 M Imidazol → pH 7,4

Durchführung

Präparation der Membranen

1. Waschen der mit transient transfizierten HEK293-Zellen konfluent bewachsenen 60er Schale (s. 3.2.13) 2 x mit je 3 ml eiskaltem PBS
2. Ablösen der Zellen mit einem Schaber (in 1 ml PBS)
3. Zentrifugation 400 x g, 5 min, 4 °C und Aufnahme des Pellets in 1 ml HP-Puffer
4. Aufschließen der Zellen im Homogenisator mit 10 Impulsen bei 750 rpm
5. Zentrifugieren der Suspension bei 20000 x g für 10 min bei 4 °C
6. Resuspension des Pellets in 500 µl RP (ohne BSA), 10 µl der Membransuspension werden für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen (s. 3.2.14), der Rest wird frisch eingesetzt oder bei -80 °C bis zum Versuch gelagert.

AC-Assay

1. Einstellen der frischen oder aufgetauten Membranen kurz vor dem Versuch auf eine Konzentration von 40 µg Protein/20 µl mit RP/2% BSA und Lagerung bei 4°C
2. 10 µl der AVP Verdünnungsreihe (0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 1000; 10000; 100000 nM) werden in 5 ml Plastikröhrchen bei 4 °C vorgelegt (Negativkontrolle 10 µl RP/2% BSA, Positivkontrolle 10 µl Forskolin-Lösung)
3. Erwärmung der Röhrchen in einem Wasserbad auf 32 °C
4. Zugabe von 70 µl ReaMix in jedes Röhrchen und dann im 15 Sekunden Abstand jeweils 20 µl Membransuspension
5. Abbruch der Reaktion nach 20 min mit 500 µl Stop-Lösung
6. Pipettierung der fertigen Reaktionsgemische (600 µl) auf Dowex-Säulen
7. Spülen der Röhrchen mit 1000 und danach mit 1800 µl H₂O und Gabe auf Dowex-Säulen
8. Nach Trockenlaufen der Säulen, werden die Dowex-Säulen auf Alox-Säulen umgesetzt und mit 5 ml H₂O gespült.
9. Nachdem die Flüssigkeit durch die Alox-Säulen getropft ist, werden diese mit 2 ml Imidazol-Puffer pro Säule gespült.
10. Elution mit 3 ml Imidazol-Puffer in 20 ml Szintillationsgefäße
11. Zugabe von 13 ml Szintillator zum Eluat

Die Messung erfolgt im β-Counter. Die [³H]- und [³²P]-Aktivitäten werden mit Hilfe des Microsoft Excel Programms ausgewertet. Das gebildete cAMP in (pmol) × (mg Protein)⁻¹ × (min)⁻¹ wird mit folgender Formel berechnet:

$$[\text{cAMP}] = \frac{[^{32}\text{P}] \times \text{EST} \times 10000}{[^{3}\text{H}] \times \text{ESP} \times \text{Prot} \times 20 \text{ min}}$$

Dabei ist [³²P] die gemessene [³²P]-Aktivität in cpm, EST der Tritium-Einsatz pro Säule in cpm, [³H] die gemessene [³H]-Aktivität in cpm, ESP der [³²P]-Einsatz pro Säule in cpm und Prot die eingesetzte Proteinmenge pro Säule in mg.

Anschließend werden die Daten mit Hilfe des GraphPad Prism[®] Programms (Version 3.00) analysiert und der EC₅₀ Wert über eine nicht lineare Regression ermittelt. Die Daten werden in einer Verlaufskurve dargestellt.

3.2.17 Mikroskopie an lebenden Zellen

Für diese Studien werden transient transfizierte COS.M6- und HEK293-Zellen verwendet, die GFP-Fusionsproteine exprimieren.

Die Zellen werden auf Deckgläser (\varnothing 33 mm) ausgesät (s. 3.2.12.1) und transient mit Lipofectamin™ oder Lipofektin™ transfiziert (s. 3.2.13). Je nach Zelldichte werden die Zellen nach 1 oder 2 Tagen für den Versuch verwendet.

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

3.2.17.1 Trypanblau-Färbung

Mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau und dessen Eigenfluoreszenz kann man die Zellbegrenzungen intakter Zellen lokalisieren und die Funktionalität der Plasmamembran nachweisen.

Nach Aufnahme der GFP-Fluoreszenzen werden unter dem Mikroskop 50 μ l Trypanblau (0,05% (w/v)) zu den Zellen pipettiert. Die Trypanblaufluoreszenz wird nach ca. 1 min Inkubation bei der Wellenlängen $\lambda_{\text{exc}} = 543$ nm und $\lambda_{\text{em}} \geq 690$ nm aufgenommen.

Durch computergestützte Überlagerung der GFP- (bei uns grün dargestellt und nur bei erfolgreich transfizierten Zellen sichtbar) und der Trypanblau-Fluoreszenz (bei uns rot dargestellt und bei allen Zellen sichtbar) ein und derselben Zelle, kann der Rezeptor in dieser genau lokalisiert werden. Rezeptoren, die bis an die Zelloberfläche transportiert werden, sind durch die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen gelb sichtbar.

3.2.18 Nachweis der Transportfähigkeit des Rezeptors über Biotinylierung

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

Reagenzien

PBS-CM	PBS (siehe 3.2.13), 1 mM MgCl_2 , 0,1 mM CaCl_2
Sulfo-NHS-Biotin™	1 mg/ml Sulfo-NHS-Biotin in PBS-CM
Ammoniumchlorid	50 mM NH_4Cl
Puffer A	50 mM Tris-HCL pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$
	pH 8,0, 1% Triton-X-100, 0,1% SDS
Immobilized NeutrAvidin™	100 μ l Neutravidin-Sepharose

Waschpuffer 1	50 mM Tris-HCL pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM Na ₂ -EDTA pH 8,0 ,0,5% Triton-X-100, 0,1% SDS
Waschpuffer 2	50 mM Tris-HCL pH 8,0, 1 mM Na ₂ -EDTA pH 8,0 ,0,5% Triton-X-100, 0,1% SDS
Lämmli-Puffer	siehe 3.2.20.1

Durchführung

1. Waschen der mit transient transfizierten HEK293-Zellen konfluent bewachsenen 60er Schale (s. 3.2.13) 3 x mit je 3 ml eiskaltem PBS-CM
2. Zugabe von 1,5 ml Sulfo-NHS-Biotin Lösung, Inkubation 30 min, 4°C schütteln
3. zum Abstoppen der Reaktion Zugabe von 1 ml 50 mM NH₄CL, Schütteln 10 min 4°C
4. Schalen 3 x waschen mit PBS-CM
5. Zugabe von 1 ml PufferA, Inkubation schüttelnd 1 Stunde 4°C
6. Überstand mit gelösten und lysierten Zellen in ein Eppi überführen, Abnahme von 10 µl für Proteinbestimmung (siehe 3.2.14)
7. Reinigung des Überstandes durch Zentrifugieren bei 20 min, 47.000 x g, 4°C
8. zum Überstand Zugabe von 100 µl immobilisiertem NeutrAvidinTM, Inkubation rotierend 1,5 - 2 Stunden bei 4°C
9. Zentrifugation 3 min, 16.500 x g
10. Waschen der Sepharose 3 x mit Waschpuffer 1 und 1 x mit Waschpuffer 2
11. Sepharose-Pellet in 50-60 µl Lämmli lösen, Inkubation 5 min bei 95°C
12. Zentrifugation 16.500 x g, 5 min
13. Überstand mit Hamilton-Spritze abnehmen und elektrophoretisch auftrennen.

3.2.19 Analyse des Glykosylierungsstatus von Membranproteinen

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

3.2.19.1 Verdau der mannosereichen Glykosylierung mit *EndoH*

Reagenzien

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

Durchführung

1. Entnahme von 30,6 µl der Membranfraktion einer 60er Schale, die nach Zellfraktionierung (siehe 3.2.14) in ≥ 100 µl H₂O aufgenommen wurde

2. Zugabe von 4,05 µl H₂O sowie 3,85 µl 10x Denaturierungspuffer
3. Denaturieren 10 min bei 95 °C
4. Abkühlung auf RT, Zugabe von 4,5 µl G5-Puffer und 2 µl *EndoH*
5. Inkubation mindestens 1 Stunde bei 37 °C

3.2.19.2 Verdau der komplexen Glykosylierung mit *PNGaseF*

Reagenzien

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

Durchführung

1. Entnahme von 30,6 µl der Membranfraktion einer 60er Schale, die nach Zellfraktionierung (siehe 3.2.14) in ≥ 100 µl H₂O aufgenommen wurde
2. Zugabe von 3,4 µl 10x Denaturierungspuffer
3. Denaturieren 10 min bei 95 °C
4. Abkühlung auf RT, Zugabe von 4,5 µl NP-40, 4,5 µl G7-Puffer und 2 µl *PNGaseF*
5. Inkubation mindestens 1 Stunde bei 37 °C

3.2.20 Nachweis der Fusionsproteine

3.2.20.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

Reagenzien

4x Laemmli-Probenpuffer	2 ml Glycerin, 1,5 ml 10% SDS (w/v), 1 ml 2M Tris-HCl (pH 6,8), 375 µl 2-Mercaptoethanol, 5 mg Bromphenolblau
Rotiphorese [®] Gel 30	gebrauchsfertige, gasstabilisierte, wässrige, 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid
Trenngelpuffer	0,75 M Tris-HCl (pH 8,8)
Sammelgelpuffer	0,625 M Tris-HCl (pH 6,8)
SDS-Lösung	20% (w/v) SDS
TEMED	unverdünnt
Ammoniumpersulfat-Lösung	10 % w/v
Laufpuffer	3 g Tris, 14,4 g Glyzin, 1 g SDS ad 1 l → pH 8,3-8,4

Trenngel 3,75 ml Acrylamidstammlösung, 5,625 ml Trenngelpuffer, 56,5 µl SDS-Lösung, 5,65 µl TEMED, H₂O 1,75 ml, 79 µl APS-Lösung

Durchführung

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

Sammelgel 835 μ l Acrylamidstammlösung, 625 μ l Sammelgelpuffer, 25 μ l SDS-Lösung,
5 μ l TEMED, 3,5 ml H₂O, 25 μ l APS-Lösung

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

Die mit 4 x Laemmli-Probenpuffer versetzten Proben (z.B. Membranfraktionen) werden 5 min bei 95°C gekocht, kurz abzentrifugiert und mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde der „High Molecular Weight,-Größenstandard (10 kDa Protein Ladder) verwendet.

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

3.2.20.2 Proteintransfer auf die Nitrozellulose (Tankblotten)

Reagenzien

Blotpuffer 2,4 g Tris, 11,26 g Glyzin, 200 ml Methanol, 750 μ l SDS-Lösung, ad 1 l H₂O → pH 8,3
Ponceau-Rot-Färbelösung 0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) Essigsäure
TBS 6,05 g Tris, 8,76 g NaCl, 0,1 g NaN₃, ad 1 l H₂O → pH 7,2

Durchführung

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

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

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

Um alle Proteinbanden nach dem Blotten sichtbar zu machen, wird die Nitrozellulose in Ponceau-Rot-Färbelösung geschüttelt. Die Markerproteine werden auf der Nitrozellulose mit einem weichen Bleistift gekennzeichnet. Danach wird die Nitrozellulose in TBS entfärbt.

3.2.20.3 Antigen-Antikörperreaktionen

3.2.20.3.1 Immunoblot mit alkalische-Phosphatase-konjugiertem IgG

Reagenzien

Blotto	20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,15 mM NaCl, 1% (w/v) Triton X-100 [®]
Blotto (mit MP)	5% (w/v)Milchpulver in Blotto
Tris-Lösung	10 mM Tris-HCl (pH 9,5)
Färbelösung (20x Stammlösung)	9,16 mg/ml NBT, 4,16 mg/ml BCIP

Durchführung

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

1. Blocken mindestens 1 Stunde in Blotto (mit MP).
2. 1.AK: monoklonaler anti-GFP Antikörper (1:5000) oder polyklonales anti-GFP-Antiserum (1:15000) mindestens 1 Stunde in Blotto (mit MP)
3. Waschen 3 x 15 min mit Blotto
4. 2.AK: alkalische-Phosphatase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:5000) mindestens 1 Stunde in Blotto (mit MP).
5. Waschen 3 x 10 min mit Blotto (mit MP), 2 x 10 min mit Blotto, 1x 5 min mit Tris-Lösung
6. Färben: Je 500 µl NBT und BCIP aus der 20 x Stammlösung mit 9 ml Tris-Lösung verdünnen und Nitrozellulose bis zum Erscheinen immunreaktiver Banden inkubieren; Abbruch der Reaktion durch Spülen mit H₂O.

3.2.20.3.2 Immunoblot mit ¹²⁵I-markiertem IgG

Reagenzien

10x TNA	24,2 g Tris-HCl, 180 g NaCl, ad 2 l H ₂ O → pH 7,2
Blockpuffer	1x TNA, 1% (w/v) Casein, 1% (w/v) Gelatine
TNA + NP40	1x TNA, 0,05% (w/v) NP-40

Durchführung

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

1. Blocken mindestens 2 Stunde in Blockpuffer
2. 1.AK: polyklonales Kaninchen anti-GFP-Antiserum (1:15000) mindestens 2 Stunde in Blockpuffer
3. Waschen 3 x 10 min mit 1 x TNA
4. 2.AK: ¹²⁵I-markiertes Esel-anti-Kaninchen IgG (2 µCi pro Schale) (1:5000) mindestens 2 Stunden in Blockpuffer
5. Waschen 2 x 5 min mit TNA, 1 x 10 min mit TNA + NP-40
6. Färben: Je 500 µl NBT und BCIP aus der 20x Stammlösung mit 9 ml Tris-Lösung verdünnen und Nitrozellulose bis zum Erscheinen immunreaktiver Banden inkubieren; Abbruch der Reaktion durch Spülen mit H₂O.

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

4. Ergebnisse

Der Vasopressin-V2-Rezeptor besitzt extrazellulär drei Cysteine. Zwischen den beiden konservierten Cysteinen C112 und C192 wird höchstwahrscheinlich eine Disulfidbrücke ausgebildet.

In diversen Publikationen wurde auf mögliche strukturstabilisierende und damit funktionell wichtige Eigenschaften dieser konservierten Disulfidbrücken hingewiesen (Maiti et al., 2000; Qu et al., 1999).

Für den V2-Rezeptor sind diverse NDI auslösende Mutationen bekannt, bei denen zusätzliche extrazelluläre Cysteine eingeführt werden. Es wurde von mehreren Gruppen postuliert, daß diese Cysteine die Bildung der konservierten Disulfidbrücke stören könnten und so z.B. für Bindungsdefekte verantwortlich sind (Schulz, A. et al., 2000).

Thema dieser Arbeit war es, diese Hypothese zu überprüfen und den Defekt zu charakterisieren, der durch die zusätzlich eingeführten Cysteine entsteht.

4.1 Bedeutung der konservierten Cysteine für den V2-Rezeptor und Charakterisierung dreier, natürlich vorkommender, mutierter Rezeptoren mit zusätzlichen extrazellulären Cysteinen

4.1.1 Gerichtete Mutagenese der extrazellulären Schleifen

Um klären zu können, ob die zusätzlichen Cysteine der NDI-Mutationen die konservierte Disulfidbrücke zerstören, mußte zunächst mit Hilfe von Rezeptormutanten geklärt werden, welche Bedeutung die konservierte Disulfidbrücke des V2-Rezeptors für die Rezeptorfunktion hat.

Dazu wurden die konservierten Cysteine C112 und C192 mit Hilfe der gerichteten