

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Materialien und Reagenzien**

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammen, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Darmstadt; Carl Roth, Karlsruhe; Sigma, Deisenhofen und J.T. Baker, Deventin, Niederlande. Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad z. A.

#### **2.1.2 *Primer* für PCR und Sequenzierungen**

*Primer* wurden von der Firma Metabion, Martinsried, und von der Firma Biotex, Berlin, bezogen.

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Molekularbiologische Techniken**

Die Anwendung von molekularbiologischen Standardtechniken wie z. B. PCR, Transformation, Ligation, Kultivierung von Bakterien, Klonierungen, Restriktionsanalysen und weitere Techniken erfolgten, falls nicht anders angegeben, nach Sambrook und Russel (2001).

##### **2.2.1.1 Plasmid-DNA-Isolierungen**

Plasmid-DNA-Isolation im Minipräparationsmasstab erfolgten mit Hilfe des Qiagen Biorobot 9600 (Qiagen, Hilden). Dabei wurden die Reagenzien und Säulen des gleichen Herstellers benutzt.

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden Midipräparationen mittels des Qiagen *Midi Kit* durchgeführt. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll von Qiagen.

### 2.2.1.2 DNA-Spaltung mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Für die Überprüfung der Größen von *inserts* in Plasmiden, Umklonierungen von DNA-Fragmenten und zum Linearisieren von Plasmiden wurden die Plasmide mit Restriktionsenzymen verdaut (New England Biolabs, Schwalbalch). Die Reaktionen wurden entsprechend den Vorgaben des Herstellers angesetzt.

### 2.2.1.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen wurde mit Hilfe des *GeneClean II Kit* (Dianova, Hamburg) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Das Ausschneiden der Bande aus dem Gel auf dem UV-Transilluminator wurde so schnell wie möglich durchgeführt, da UV-Licht die DNA schädigt und sie somit für spätere Klonierungen und für die Expression unbrauchbar macht.

### 2.2.1.4 Sequenzierung von DNA

Für den Sequenzierungsansatz wurde das ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction *Kit* benutzt (Perkin Elmer, Weiterstadt). Dabei wurde das Protokoll des Herstellers angewendet.

### 2.2.1.5 Datenbankrecherche

DNA-Sequenzen wurden mittels Programmen, die im Internet verfügbar sind, auf Homologien zu bekannten Proteinen überprüft. Dazu wurden die Programme des *Baylor College of Medicine (BCM)-Search-Launchers* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>) und des *National institute of Health* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) benutzt.

### 2.2.1.6 Northern Blot

Die Hybridisierung und das anschließende Waschen eines *multiple tissue* Northern Blot (BD Biosciences, Heidelberg) wurde mit der Hybridisierungs- und Waschlösung des Herstellers durchgeführt. Als Sonde wurde ein cDNA-Fragment aus der AKAP18 $\delta$ -cDNA (siehe Anhang) mit dem *forward* Primer 32-GSP1 (5'-TCT CCA GGT CCC CCG TCC CTT C; bp 20- 41 der AKAP18 $\delta$ -cDNA) und dem *revers* Primer 15-per-rev (5'- TGC CAG AGA ACC TAC AGG GCT GGT CTC CAG; bp 164-135 der AKAP18 $\delta$ -cDNA) mittels PCR amplifiziert. Das cDNA-Fragment wurde in einer Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend

aus dem Agarosegel extrahiert (2.2.1.3). Das cDNA-Fragment wurde mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP radioaktiv markiert. Die Markierung wurde mit dem Megaprime DNA Kit (Amersham-Pharmacia-Biotech, Freiburg) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über die Fraktionierung mittels einer Sephadex G50-Säulen (Amersham-Pharmacia-Biotech) abgetrennt. Die Membran wurde auf einer Phosphoimager-Platte exponiert und die Signale wurden anschließend am Phosphorimager (Molecular Dynamics Storm 860 Phosphoimager, Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert.

Die AKAP18 $\delta$ -cDNA-Sonde wurde nach den Vorgaben von BD Biosciences entfernt und mit einer  $\beta$ -Actin-Sonde (BD Biosciences) hybridisiert. Die radioaktive Markierung, Hybridisierung und die Detektion der Signale erfolgte wie bei der AKAP18 $\delta$ -cDNA (s. o.)

#### 2.2.1.7 RACE-PCR

Um den Klon 9.1 zu vervollständigen, wurde eine RACE-PCR durchgeführt. Da in einem Northern Blot im Herzen die meisten (sechs) und stärksten Signale vorhanden waren, wurde bei der RACE-PCR Ratten-Herz *Marathon-Ready* cDNA-Bibliothek und der *Advantage cDNA polymerase Mix* (BD Biosciences) entsprechend den Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Auch die genspezifischen (GSP) Primer und das PCR Programm wurden nach den Vorgaben von BD Biosciences gewählt. Als *reverse* Primer wurde bei der ersten RACE-PCR der Primer AK18-GSP1 (5'-GCA AGG TGA TGT GAA AGG AGC CGT; bp 462-438 der AKAP18 $\delta$ -cDNA) mit dem forward Primer AP1 und bei der *nested* PCR der Primer AK18-NGSP (5'-CGC CGA CCA TGG CTT TGG TCA ATC G; bp 438-414 der AKAP18 $\delta$ -cDNA) mit dem Primer AP2 eingesetzt. Der Erfolg der PCR wurde in einer Agarose Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte direkt in den TA-cloning Vector pGEM-T Easy (Promega, Mannheim) nach dem Protokoll und mit den Reagenzien von Promega kloniert, in kompetente JM109 *E. coli* Bakterien (Promega) transformiert und auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Nach einer Plasmid-DNA-Minipräparation wurde die isolierte DNA mit dem Enzym EcoRI gespalten, um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen. Die Klone mit einem *insert* wurden mit den Primern T7 und Sp6 sequenziert.

In einem weiteren Ansatz wurde eine RACE-PCR mit cDNA aus IMCD-Zellen durchgeführt. Dazu wurde das 5'-RACE-System Version 2.0 (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Als erstes wurde aus IMCD-Zellen mit dem Reagenz TRIZOL (Invitrogen) nach den Vorgaben des Herstellers Gesamt-RNA isoliert. Mit dem Primer RII-GSP (bp 995-969 auf der AKAP18 $\delta$ -cDNA) wurde mittels RT-PCR cDNA nach den Vorgaben und mit den Reagenzien aus dem 5'-RACE-System Version 2.0 hergestellt. An die cDNA wurde ein poly-C-Überhang ebenfalls nach den Vorgaben von Invitrogen angehängt. Die so behandelte cDNA wurde in einer RACE-PCR eingesetzt. Dabei wurde bei der ersten RACE-PCR der Primer AK18-GSP1 (s. o.) und der Primer AAP aus dem dem 5'-RACE-System Version 2.0 und bei der *nested* RACE-PCR der Primer AK18-NGSP (s. o.) und der Primer UAP aus dem 5' RACE System Version 2.0 eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden wie oben beschrieben behandelt.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Herstellung von Glutathion S-Transferase-Fusionsproteinen**

Der kodierende Bereich von AKAP18 $\delta$  wurde mit dem *forward* Primer 18D-EcoRI (5'-CGT GGA TCC CCG AAT TCC ATG GAG CGC CCC GCC GCG GGA GAA; bp 57-80 der AKAP18 $\delta$  cDNA, mit einer EcoRI Schnittstelle) und dem *reverse* Primer 18D-rev-XhoI (5'-GAT GCG GCC GCT CGA GTC TCA CTT CCG GTT GTT ATC ACT GCC; bp 1118-1095 der AKAP18 $\delta$  cDNA, mit einer XhoI Schnittstelle) mittels PCR amplifiziert. Das Amplifikat und der Vektor pGEX-4T3 wurden mit den Enzymen EcoRI und XhoI verdaut und anschließend mittels der T4-Ligase (New England Biolabs) ligiert. Die Reinigung erfolgte nach der *Batch-Method* mit dem *Glutathione S-transferase (GST) Gene Fusion System* (Amersham-Pharmacia-Biotech). Für Western Blot Analysen und für RII-Overlays wurde AKAP18 $\delta$  mit Thrombin (New England Biolabs), nach den Vorgaben des Herstellers, vom GST abgespalten.

### **2.2.3 Herstellung von Zellfraktionen aus IMCD-Zellen**

Die IMCD-Zellen wurden kultiviert wie beschrieben (Maric et al., 1998; Storm et al., 2002). Gegebenenfalls wurden diese vor der weiteren Behandlung mit

AVP (100  $\mu$ M, 30 min bei 37°C) inkubiert. Für die Detektion von AKAP18 $\delta$  in IMCD-Zellen wurden neben Homogenaten auch lösliche und partikuläre Fraktionen und Fraktionen, die für Membranen bzw. intrazelluläre Vesikel angereichert sind, wie beschrieben hergestellt (Mandon et al., 1996; Marples et al., 1995).

Mit einem Peptid, das der Aminosäuresequenz 60-76 von AKAP18 $\delta$  entspricht, wurden Kaninchen für das Antiserum A18 $\delta$ 3 immunisiert. Die Immunisierung und die Herstellung des Antiserums wurde von der Firma Biogenes (Berlin) durchgeführt. Die das Epitop spezifisch erkennenden Antikörper wurden durch Affinitätsreinigung über das an eine Thiopropyl-Sepharose 6B Säule gekoppelte Peptid gewonnen (Klussmann et. al., 2001a).

#### **2.2.4 Western Blot**

Mit Hilfe der SDS-PAGE (Laemmli et al. 1970) wurden Proteine entsprechend ihrer Größe getrennt. Die Proteine wurden mittels Elektrotransfer im *Semi-dry*-Verfahren mit Hilfe des Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, München) auf eine PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach) transferiert. Der Transfer erfolgte nach den Vorgaben von BioRad. Die Immundetektion von Proteinen erfolgte wie beschrieben (Klussmann et al., 2001a). Für die Detektion von immunreaktiven Proteinen wurde der Antikörper A18 $\delta$ 3 in einer Verdünnung von 1:500, als Zweitantikörper Meerrettichperoxidase-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen F(ab)<sub>2</sub> Fragmente (Dianova) in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die PVDF-Membran wurde anschließend mit Lumi-Light Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) inkubiert. Signale wurden am Lumi-Imager F1<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics) detektiert.

#### **2.2.5 Immunpräzipitation und cAMP-Agarose Präzipitation**

Für Immunpräzipitationen wurden renale innere Medullen aus der Ratte in Lysispuffer (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 0.2 % Deoxycholate, 1 mM Benzamidine, 0.5 mM Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF), 3.2  $\mu$ g/ml Trypsin Inhibitor I-S, 1.4  $\mu$ g/ml Aprotinin) homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend zentrifugiert (30000 x g, 30 min). Der Überstand wurde mit dem Antikörper A18 $\delta$ -3 (40  $\mu$ g) bzw. mit

dem entsprechenden Präimmunserum in Gegenwart von Protein A-Sepharose (Sigma) über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Die Protein A-Sepharose wurde anschließend dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden in Laemmli-Puffer eluiert (5 min, 95 °C), in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (2.2.4). Die PVDF-Membran wurde anschließend in einem RII-Overlay-Experiment (s. u.) eingesetzt.

Für cAMP-Agarose-Präzipitationen wurde neben der inneren Medulla auch restliches Nierengewebe eingesetzt. Die Homogenate wurden wie oben beschrieben hergestellt, allerdings wurden diese nicht mit einem Antikörper sondern mit cAMP-Agarose bzw. cAMP-Agarose und löslichem cAMP (50 nm) inkubiert (4°C, 3 h rotierend). Gebundene Proteine wurden mit Laemmli-Puffer eluiert (5 min, 95 °C) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde anschließend in einem RII-Overlay-Experiment (s. u.) oder in einem Western Blot (2.2.4) eingesetzt.

### **2.2.6 RII-Overlay**

Mit der RII-Overlay-Methode wurde geprüft, ob bei der Immunpräzipitation mit dem Antikörper A18δ3 und bei der cAMP-Agarose-Präzipitation RII-bindende Proteine in den Präzipitaten vorhanden sind. Der RII-Overlay wurde durchgeführt wie beschrieben (Carr und Scott, 1992).

### **2.2.7 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik**

Bei der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Technik (FRET-Technik) handelt es sich um eine Methode, mit der Protein-Protein Interaktionen in lebenden Zellen untersucht werden können. FRET entsteht, wenn der Abstand zwischen einem fluoreszierenden Donor und einem fluoreszierenden Akzeptor kleiner als 100 Å ist und die Emissionsspektren der beiden Chromophore überlappen. Die Anregung des Donor mit dessen spezifischer Wellenlänge, führt zu einem Energietransfer (FRET) zum Akzeptor. Dies führt zu einer geringeren Fluoreszenz bei der Emissionswellenlänge des Donors und zu einer Erhöhung der Fluoreszenz des Akzeptors. In lebenden Zellen kann die Fluoreszenz des Donors bzw. des Akzeptors untersucht werden. Bewährt hat sich der Ansatz als Chromophore Derivate des *Green Fluorescent Protein* (GFP), das *Cyan Fluorescent Protein* (CFP) als Donor

und *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) als Akzeptor, einzusetzen. Die Proteine, deren Interaktion untersucht werden sollen, werden als CFP- bzw. YFP-Fusionsproteine in den Zellen exprimiert. Um die Interaktion der PKA mit AKAP18 $\delta$  in lebenden Zellen zu untersuchen, wurde AKAP18 $\delta$  als CFP- und RII $\alpha$  als YFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen exprimiert. Dazu wurde die cDNA von AKAP18 $\delta$  mittels PCR mit dem *forward* Primer 18D-CFP-FW (5'-CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG ATG GAG CGC CCC GCC GCG GG; bp 57-76 der AKAP18 $\delta$  cDNA, mit einer EcoRI-Schnittstelle), und dem *reverse* Primer 18D-CFP-REV (5'-GGC GAC CGG TGG ATC CCG GGC CCG GTT GTT ATC ACT GCC ATC GCC; bp 1118-1095 der AKAP18 $\delta$  cDNA, mit einer BamHI Schnittstelle) amplifiziert. Das Amplifikat und der Vektor pECFP-N1 (BD Biosciences) wurden mit den Enzymen EcoRI und BamHI geschnitten und anschließend ligiert. Die cDNA der humanen RII $\alpha$ -Untereinheit der PKA wurde von Prof. Kjetil Tasken (University of Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt. Diese wurde mittels PCR mit dem *forward* Primer RII-YFP-FW (5'-TCA GAT CTC GAG CTC AAG CTT CGA ATT CTG ATG AGC CAC ATC CAG ATC CCG; bp 190-210 der RII $\alpha$  cDNA, mit einer XhoI Schnittstelle) und dem *reverse* Primer RII-YFP-REV (5'-GAC CGG TGG ATC CCG GGC CTG CCC GAG GTT GCC CAG AT; bp 1401-1382 der RII $\alpha$  cDNA, mit einer Schnittstelle für BamHI) amplifiziert. Das Amplifikat und der Vektor pEYFP-N1 (BD Biosciences) wurden mit den Enzymen EcoRI und BamHI verdaut und anschließend miteinander ligiert.

Die Ligationsansätze wurden in kompetente JM109 *E. coli* transformiert und auf Agar-Platten ausgestrichen. Von einigen Kolonien wurde eine Plasmid-DNA-Minipräparation durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde sequenziert, um den Erfolg der Ligation zu überprüfen. Anschließend wurden von AKAP18 $\delta$ -CFP und RII $\alpha$ -YFP Plasmid-DNA Midipräparationen hergestellt.

In der RII-Bindungsdomäne von AKAP18 $\delta$ -CFP (Aminosäuren 301-314) wurde Leuzin 308 durch ein Prolin mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), nach den Vorgaben des Herstellers ausgetauscht. Für die Einführung der Mutation wurde der Primer 18 $\delta$ -P1 (5'-AGT AAG AGG CCG GTG GAG AAC GCC GTG CTC; bp 969-998 der AKAP18 $\delta$  cDNA) und der Primer 18 $\delta$ -P2, mit der revers komplementären Sequenz von 18 $\delta$ -P1

eingesetzt. Die mutierte Form wird im weiteren als AKAP18 $\delta$ -L308P-CFP bezeichnet.

Für die FRET-Untersuchungen wurden HEK293-Zellen (ATCC, Manassas, VA, USA) auf Poly-L-Lysin beschichteten 30 mm Deckgläsern bis zu einer Konfluenz von ca. 50 % kultiviert (DMEM, Invitrogen, Karlsruhe; 10% FKS). Die HEK293-Zellen wurden mit den für AKAP18 $\delta$ -CFP bzw. AKAP18 $\delta$ -L308P-CFP und RII $\alpha$ -YFP kodierenden Vektoren mit LipofectAMINE (Invitrogen) transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte nach den Vorgaben von Invitrogen. FRET-Messungen wurden an einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Axiovert, Carl Zeiss, Göttingen) durchgeführt und mit der Openlab 2.25 Software (Improvision, Coventry, England) aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten innerhalb von 24-48 h nach der Transfektion, da in diesem Zeitraum die Expression von AKAP18 $\delta$ -CFP und RII $\alpha$ -YFP am stärksten war. AKAP18 $\delta$ -CFP und RII $\alpha$ -YFP wurden mit einer Wellenlänge von 425 nm bzw. 488 nm angeregt und die emittierten Fluoreszenzen von AKAP18 $\delta$ -CFP und RII $\alpha$ -YFP bei den Wellenlängen 480 nm bzw. 535 nm aufgezeichnet. Die Hintergrundfluoreszenz wurde in einem Bereich mit nicht transfizierten Zellen bestimmt und von den erhaltenen Werten abgezogen. Für die FRET-Messung wurde AKAP18 $\delta$ -CFP mit einer Wellenlänge von 425 nm angeregt und die Fluoreszenz von RII $\alpha$ -YFP bei einer Wellenlänge von 535 nm bestimmt. Da ein Verhältnis der Werte 535 nm/480 nm von 0.6 dem Grundwert entspricht, der durch die Überlappung der Emissionsspektren von CFP und YFP entsteht, stellte das Verhältnis der Werte 535 nm/480 nm von  $> 0,6$  ein positives FRET-Signal dar. Bei den FRET-Untersuchungen wurde die FRET-Ratio an 5 Bereichen der Zelle und bestimmt und ein Mittelwert gebildet.

Um den Effekt der Peptide Ht31, Ht31-P, S-Ht31 und S-Ht31-P auf die FRET-Messungen zu untersuchen wurden mit den HEK293-Zellen inkubiert (100  $\mu$ m). Die FRET-Ratio wurde vor der Zugabe der Peptide (0 min) nach 90 min Inkubation jeweils berechnet.