

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<i>Reagenz</i>	<i>Bezugsquelle</i>
³ H-cAMP (28 Ci/mmol)	NEN, Boston, USA
³² P-ATP (30 Ci/mmol)	NEN, Boston, USA
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, BRD
ABI PRISM Dye Terminator Cycle	Perkin Elmer, Überlingen, BRD
Agar	Invitrogen, Leeds, NL
Agarose	Invitrogen, Leeds, NL
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, BRD
Aprotinin	MERCK Darmstadt, BRD
Bacitracin	MERCK Darmstadt, BRD
Big Dye Terminator Kit	Apl. Biosystems, Weiterstadt, BRD
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth, Karlsruhe, BRD
BQ123 (ET _A -Antagonist)	Alexis Corp., Läfelfingen, CH
BQ788 (ET _B -Antagonist)	Calbiochem, Bad Soden, BRD
Calciumchlorid-2-Hydrat	MERCK Darmstadt, BRD
Cycloheximide	Invitrogen, Leeds, NL
Cyanin3	Pharmacia, Freiburg, BRD
Dimethylsulfoxide	SIGMA, Dreisenhofen, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK Darmstadt, BRD
DiI-Low-Density-Lipoprotein	Molecular Probes, Eugene, OR
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	SIGMA, Deisenhofen, BRD

Endothelin-1	NEN, Boston, USA
¹²⁵ I-ET1 (2200Ci/mmol)	NEN, Boston, USA
Endothelin-3	Calbiochem, Darmstadt, BRD
Essigsäure	MERCK, Darmstadt, BRD
Ethano	J.T. Baker, NL
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, BRD
Fetales Kälberserum	PAN-Systems, Nürnberg, BRD
Fluo	Fulka Feinchemikalien, Ulm, BRD
G418	Calbiochem, Bad Soden, BRD
GeneClean II Kit	BIO101, Inc., USA
Gelatine	SIGMA, Dreisenhofen, BRD
Glücksklee Magermilchpulver	Nestlé, Frankfurt, BRD
Glyzerin	SIGMA, Dreisenhofen, BRD
Ham's F12 Medium	Invitrogen, Leeds, NL
Hefeextrakt	Invitrogen, Leeds, NL
Hoe33258	Molecular Probes, Eugene, OR
Immu-Mount	Shandon, Pittsburg, PA
Isopropanol	MERCK, Darmstadt, BRD
JETstar Plasmid Midiprep Kit	GENOMED, St.Louis, USA
Kaliumchlorid	MERCK, Darmstadt, BRD
Kaliumdihydrogensulfat	J.T. Baker, NL
Kanamycin A Monosulfat	SIGMA, Dreisenhofen, BRD
Lipofectin	Invitrogen, Leeds, NL
Lipofectamin	Invitrogen, Leeds, NL
Magnesiumchlorid 6-hydrat	J.T. Baker, NL
Methanol	J.T. Baker, NL
Natriumchlorid	J.T. Baker, NL
Natriumdodecylsulfat, reinst (SDS)	Roth, Karlsruhe, BRD
NeutrAvidin (immobilisiert)	Pierce, Rockford, IL, USA
Oligonukleotide	Biotez, BRD
Ovalbumin	SIGMA, Dreisenhofen, BRD
PD145065	Calbiochem, Bad Soden, BRD
pEGFP-N1	Clontech, Bad Soden, BRD

Penicillin/Streptomycin	SIGMA, Dreisenhofen, BRD
Peptone 140	Invitrogen, Leeds, NL
Poly L-Lysin	SIGMA, Dreisenhofen, BRD
QuickChange Mutagenese	Stratagene, Heidelberg, BRD
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Restriktionsenzyme PstI, XmaI, BamHI, EcoRI	New England BioLabs Inc., UK
¹²⁵ I-Streptavidin	Amersham, Buckinghamshire, UK
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce, Rockford, IL, USA
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe, BRD
Tetramethylrhodamin Isothiocyanat- (TRITC)-konjugiertes Transferrin	Molecular Probes, Eugene, OR
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, BRD
Trypsin	SIGMA, Dreisenhofen, BRD

2.1.2 Geräte und Rechner

2.1.2.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Autoklaven	Varioklav
DNS Sequenzierautomat, ABI 373A	Perkin Elmer, Überlingen, USA
Brutschränke	Heraeus, Hanau, BRD
Durchlichtmikroskop, TELAVAL	Zeiss, Oberkochen, BRD
Elektrophoresekammern	Roth, Karlsruhe, BRD
FACS Calibur	BD, Heidelberg, BRD
Fluoreszenz-Mikroskop, Leica DMLB	Leitz, Wetzlar, BRD
Geigerzähler, FHT 111M	Contamat
Heizblock, Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, BRD
Homogenisator, POTTER S	Braun Biotech International
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 410	Zeiss, Oberkochen, BRD
Lumi Imager F1	Boehringer Mannheim, BRD
Magnetrührer	IKA, Staufen, BRD
Netzgeräte	Bio-Rad, München, BRD

Photometer	Pharmacia, Freiburg, BRD
PCR-Geräte, Trio-Thermoblock	Biometra, BRD
pH-Meter	Hanna Instruments, BRD
Pipetten	Gilson
Roboter für Plasmidisolierung 9600	QIAGEN,
Rotoren Typ TLA-100.4 und 70.1 Ti	Beckman, BRD
Typ JA-14 und JA-25.50	Beckmann, BRD
Typ SS34	Sorwall
Reinstwasseranlage, MilliQ plus	Millipore, Eschborn, BRD
Sensi Cam CCD	Sony, Tokyo, Japan
Transilluminator, UVT-28MP	Herolab
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific Innova 3240
Ultraschallgerät Typ Braun 1000L	Labsonic, BRD
Vortexer, Typ Vibrofix	IKA, Staufen
Waagen Typ L 4205	Sartorius, Göttingen, BRD
Zentrifugen Optima TLX, TLK-100	Beckman, BRD
Typ Biofuge pico	Hereaus, Hanau, BRD
Typ PicoFuge	Stratagene
Zellzählgerät Casy	Schärfe System, BRD

2.1.2.2 Rechner und Programme

Rechner	IBM-kompatibler PC
Programme	Axiovision 2.0, Zeiss, Oberkochen, BRD PRISM 2.01 GraphPad, San Diego, CA RADLIG 4.0, Cambridge, UK Clone Manager 4.1, Excel 95 PowerPoint 97, CorelDraw 8.0
Drucker	Hewlett-Packard LaserJet 5M Hewlett-Packard Deskjet 890C
Scanner	Hewlett-Packard ScanJET II CX

2.1.3 Bakterienstämme und Zelllinien

2.1.3.1 Bakterienstämme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Genetische Marker</i>	<i>Herkunft</i>
<i>E. coli</i> DH10 β	F' mcrA, Δ -(mrr, hsdRMS-mcrBC), φ 80dlacZ, Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara, leu), galU, galK, λ^- , rpsL, endA1, nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> CC180	ara Δ 139 Δ (ara, leu), Δ lacX74, phoA, Δ galE, galK, thi, rpsE, rpoB, recA1	C. Manoil

2.1.3.2 Zelllinien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Merkmale</i>	<i>Herkunft</i>
COS.M6	„African Green Monkey Kidney“-Zellen, SV40 transformiert	F.Fahrenholz, Frankfurt, BRD
HEK293	„Human Embryonic Kidney“-Zellen, Adenovirus Typ 5 transformiert	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, BRD
MDCK II	„Madin-Darby Canine Kidney“-Zellen Typ II	K.Simons, Dresden, BRD
CHO-K1	„Chinese Hamster Ovary“-Zellen Typ K1	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, BRD
Astrozyten	primär kultivierte Astrozyten (Wildtyp), und „spotting lethal“ (sl/sl)-Astrozyt (Nullmutation des ET _B -Rezeptors)	H.Ehrenreich, Göttingen, BRD

2.1.4 Desoxyribonukleotide

2.1.4.1 Rekombinante Plasmide

<i>Plasmide</i>	<i>Funktionelle Bereiche</i>	<i>Herkunft</i>
pcDNA3.ETB	Amp, G418, CMV, SV40, humaner ET _B -Rezeptor	F.Zollman, FU-Berlin
pcDNA3.ETA	Amp, G418, CMV, SV40, humaner ET _A -Rezeptor	M.Müller-Esterl, Uni-Frankfurt
pEGFP.N1	Kn/Neo, G418, CMV, SV40	Clontech, Heidelberg
pcDNA3	Amp, G418, CMV, SV40	Clonetch, Heidelberg

2.1.4.2 Oligonukleotide

<i>Bezeichnung</i>	<i>Sequenz (5'→3')</i>
ET _A forward <i>Pst</i> I Schnittstelle	G ATACTG CAG CCT CAA ATT TGC CTC AAG ATG G
ET _A reverse <i>Xma</i> I Schnittstelle	GC AGC CAT AAG GAC AGC ATG ACC CGG GTA AC
ET _B forward <i>Pst</i> I Schnittstelle	AGA TAC TGC AGC AGG TAG CAG CAT GCA GCC G
ET _B reverse <i>Bam</i> HI Schnittstelle	CCA GTA ATA AAT ACA GCT CAT CGG ATC CATT
ET _B -ATG 5'	GGC CTG TCG CGA AGC TTG GGA ATG GAG AGA GGC TTC
ET _B 3'-GFP	CAA GAT ATT GGG ATC CTT TCG CAT GCA C
ET _B Δ426-GFP	TCA TGG ATC CTG ATC ATT AGC TTT GAA CTT TAA GC
ET _B GYF-GFP	AAA TAG GAT CCG ATG AGC TGT ATT TAT TAC TGG AAC GGG CGT TGT CGG CTG CGT GAT CAT TAG C
GFP-5'	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG TAC GG

GFP-3'	CTT GTG GCC GTT TAC GTC GCC GTC CAG
--------	--

2.1.5 Medien und Agarplatten für *E. coli*

Alle Flüssigmedien werden für 20 Min. bei 120°C autoklaviert. Je nach Bedarf können Antibiotika (Kanamycin 30 µg/ml) zugegeben werden. Bei Medien mit Agar muss darauf geachtet werden, daß die Lösung vor Zugabe des Antibiotikums auf ca. 42°C abgekühlt ist.

LB-Medium	Peptone 140 Hefeextrakt NaCl H ₂ O	16 g 10 g 5 g ad 1 l
LB-Medium für QuickChange Mutagenese	Wie LB-Medium: nach dem Autoklavieren werden folgende Chemikalien hinzugefügt:	
	1 M MgCl ₂	12,5 ml
	1 M MgSO ₄	12,5 ml
	2 M Glukose	10 ml
LB-Agarplatten	Wie LB-Medium: vor dem Autoklavieren werden noch 12,5 g Agar hinzugefügen	

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur Aufreinigung von DNS

2.2.1.1 Plasmidisolierung im kleinen Maßstab, Minipräp nach Quiagen

Verwendete Lösungen und Durchführung:

Lösung I:	50 mM Glucose	
	25 mM Tris HCl (pH 8,0)	
	10 mM EDTA (pH 8,0)	
Lösung II:	0,2 N NaOH	
	1 % SDS	
Lösung III:	5 M Kalium-Acetat	60 ml
	Essigsäure (99 %)	11,5 ml
	H ₂ O	28,5 ml

1,5 ml *E. coli* Übernachtskulturen werden in einem Reaktionsgefäß abzentrifugiert (6000×g, RT, 3 Min.). Das Pellet wird in 100 µl Lösung I resuspendiert und 2 Min. bei RT inkubiert. Danach werden 200 µl Lösung II hinzugegeben und die Proben für 5 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wird mit 20.000×g für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNS mit Ethanol für 30 Min. bei -20°C gefällt, zentrifugiert (20.000×g, 10 Min.) und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wird in 50 µl H₂O resuspendiert.

2.2.1.2 Plasmidisolierung mit dem „JET Star Kit“ von Genomed

Verwendete Lösungen und Durchführung:

E1-Puffer:	Tris-HCL (pH 8,0)	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
E2-Puffer:	NaOH	200 mM
	SDS (w/v)	1 %
E3-Puffer:	K-Acetat (pH 5,5)	3,1 M
E4-Puffer:	NaCl	600 mM
	NaAc (pH 5,0)	100 mM

	Triton X-100	0,15 % (w/v)
E5-Puffer:	NaCl	800 mM
	NaAc (pH 5,0)	100 mM
E6-Puffer:	NaCl	1,25 M
	Tris-HCL (pH 8,5)	100 mM

50 ml *E. coli* Übernachtskultur werden bei 4°C und 6000×g für 10 Min. zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 4 ml Lösung E1 resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren werden 4 ml Lösung E2 zugegeben und nach vorsichtigem Mischen für 5 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml Neutralisations-Lösung E3 wird 15 Min. bei 15.000×g und 20°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit müssen die verwendeten Säulen mit 10 ml Lösung E4 equilibriert werden. Der Überstand, der die gelöste Plasmid-DNS enthält, wird dann auf die equilibrierte Säule aufgetragen. Anschließend wird die Säule zweimal mit 10 ml Lösung E5 gewaschen und die Plasmid-DNS mit 5 ml Lösung E6 eluiert. Die DNS wird mit 0,7 Volumen Isopropanol (3,5 ml) gefällt, abzentrifugiert (15.000×g, 4°C, 30 Min.) und mit 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wird in 250 µl H₂O gelöst. Reinheit und Konzentration werden photometrisch bestimmt.

2.2.2 Amplifizierung von DNS durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird in einem Zyklus von Denaturierung, Hybridisierung und DNS-Synthese die DNS durch die hitzestabile Taq-Polymerase (aus *Thermophilus aquaticus*) spezifisch amplifiziert. Die Primer sollten im allgemeinen zwischen 16 und 35 bp lang sein, Guanin- oder Cytosin-Nukleotide an den Enden tragen und einen ähnlichen Schmelzpunkt aufweisen. Ein PCR Ansatz besteht aus 50 ng DNS, 1 µl deoxy-NTPs (10 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1 µl Forward Primer (10 µM), 1 µl Reverse Primer (10 µM), 3 µl MgCl₂(25 mM), 5 µl 10 x PCR Puffer, 0,25 µl Taq-Polymerase und 37,75 µl H₂O. Wenn nicht anders erwähnt, wird folgendes Standard-Programm (siehe Tabelle 2.8) benutzt.

<i>Temp.</i>	<i>min</i>	<i>Zyklus</i>
94°	3	
94°	0,5	35 ×
58°	0,5	
72°	1,5	
72°	7	
4°	∞	

Tabelle 2.8: Standard PCR-Programm

2.2.3 Spezifische Spaltung von DNS durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Verwendete Lösungen und Durchführung:

Stop Puffer:	Bromphenolblau	50 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	Glycerin	50 % (w/v)

Eine Einheit (U) Restriktionsenzym verdaut in einer Stunde 1 µg DNS bei 37°C. Ein Reaktionsansatz enthält 1 µg DNS, 2 µl 10 × Puffer und 5 U Restriktionsendonuklease. Das Endvolumen beträgt 20 µl und wird mit H₂O aufgefüllt. Nach 1 Std. Inkubation bei 37°C wird der Verdau durch Zugabe von 5 µl Stop-Puffer abgebrochen und auf ein Agarosegel (siehe 2.2.5) aufgetragen.

2.2.4 DNS-Sequenzierung nach der Dideoxymethode

Verwendete Lösungen und Durchführung:

Big Dye:	dideoxy-NTPs-Dye	
	Terminator	
deoxy Nucleotide:	dITP, dATP, dTTP, dCTP	
	Tris-HCl (pH 9,0)	
	MgCl ₂	
	AmpliTaq DNS Polymerase	
10 × TBE-Puffer:	Tris	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA	9,32 g
	H ₂ O	ad 1 l → pH 8,3

Polyacrylamidgel (6%): Harnstoff	22,5 g
10 × TBE	4,5 ml
Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid (37% / 2,5%(w/v))	6,75 ml
APS Lsg. (10%, w/v)	150 µl
H ₂ O	ad 45 ml

Für die zyklische Sequenzierreaktion wird ein Ansatz mit 2 µl Big Dye, 500 ng DNS, 1 µl Primer (4 µM) und H₂O ad 10 µl hergestellt. Die Sequenzierung erfolgt im Thermocycler mit folgendem Program: Denaturierung: 96°C, 16 Sek.; Anlagerung: 52°C, 16 Sek.; DNS-Synthese: 60°C, 4 Min.; 26 Zyklen. Anschließend werden die Proben mit 80 µl H₂O, 10 µl NaAc und 250 µl Ethanol (-70°C) gefällt. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Die Proben werden mit 4,5 µl 50 mM EDTA (pH 8,0)/deion. Formamid resuspendiert und direkt auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNS im Gel erfolgt in TBE-Puffer mit Hilfe des automatischen Sequenzierers ABI 373 A (Perkin Elmer) bei 40 W (1200–1500 V).

2.2.5 Horizontale Gelelektrophorese

Verwendete Lösungen und Durchführung:

20 × TAE-Puffer:	Tris	484,4 g
	Essigsäure	114 ml
	EDTA	372 g
	H ₂ O	ad 5 l → pH 7,8

Abhängig von der Größe der zu trennenden DNS-Fragmente wählt man unterschiedliche Agarose Konzentrationen (0,8–2% (w/v) in TAE-Puffer). Die Agarose wird durch Aufkochen in Lösung gebracht und nach Abkühlen auf ca. 50°C in eine horizontale Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet und die mit Stoppuffer versetzten DNS-Proben aufgetragen. Die Trennung erfolgt im elektrischen Feld bei 80–120 V. Zur Färbung der Banden wird das Gel 15 Min. in eine Ethidiumbromid Lösung gelegt und anschließend unter dem Transilluminator ausgewertet.

2.2.6 Eluierung von DNS Fragmenten aus Agarose-Gelen mit dem Gene Clean II Kit

Die entsprechende Bande wird mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und abgewogen. Das Gel wird dann in einem Reaktionsgefäß durch Zugabe von 3 Volumen NaI ($\mu\text{g} = \mu\text{l}$) bei 55°C für 5 Min. gelöst. Danach werden 5 μl Glasmilch (vor Benutzung sorgfältig vortexen) zugegeben und die Lösung 5 Min. bei RT inkubiert. In dieser Zeit kann sich die DNS an die Glasmilch anlagern und anschließend durch Zentrifugieren ($20.000\times\text{g}$, 20 Sek.) pelletiert werden. Das Pellet wird 3 mal mit 300 μl „New Wash“-Puffer gewaschen. Danach wird nochmals mit $20.000\times\text{g}$ für 1 Min. zentrifugiert und das Pellet in 10 μl H_2O gelöst. Die DNS wird für 3 Min. bei 55°C eluiert. In dieser Zeit kann sich die DNS von der Glasmilch ablösen und in Lösung gehen. Die Glasmilch wird durch zentrifugieren (3 Min., $20.000\times\text{g}$) entfernt. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.

2.2.7 Ligation von DNS Fragmenten

Verwendete Lösungen und Durchführung:

20 \times Ligationspuffer:	Tris-HCl (pH 7,5)	500 mM
	MgCl ₂	100 mM
	dATP	10 mM
	DTT	100 mM
	BSA	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$
T4 DNS-Ligase:	1 U/ μl	

Um ideale Ligationsbedingungen zu haben, sollten Insert und Vektor in einem Verhältnis von 3:1 vorliegen. Ein Ligationsansatz besteht aus 2 μl 10 \times Puffer, 1 μl Ligase, den zu ligierenden DNS's und H_2O ad 20 μl . Die Ligation erfolgt für 12–16 Std. bei 16°C . Danach kann die DNS direkt für die Transformation verwendet werden.

2.2.8 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

2.2.8.1 Herstellung kompetenter Zellen

100 ml LB-Medium werden mit 1 ml einer Übernachtskultur des betreffenden *E. coli* Stamms beimpft und bei 37°C inkubiert. In der exponentiellen Wachstumsphase (O.D.600=0,3 - 0,5) wird die Zellsuspension zentrifugiert (7000×g, 4°C, 20 Min.), mit 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) resuspendiert und mindestens 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut zentrifugiert und in 2 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen werden direkt für die Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 1 ml Glycerin(100%) als 200 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.8.2 Transformation von Plasmiden

200 µl frische oder aufgetaute kompetente Zellen werden in einem Reaktionsgefäß mit 0,1–1 µg Plasmid-DNS versetzt und für mindestens 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock für 90 Sek. bei 42°C im Wasserbad wird 1 ml LB-Medium zugegeben und für 1 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. 100 µl dieses Transformationsansatzes werden auf Agarplatten ausgestrichen, die über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

2.2.9 Zellkultur

2.2.9.1 Kultivierung von COS M6-, CHO- und MDCK-Zellen

Antibiotika:	500x Penicillin/Streptomycin	
	100 IE/ml Penicillin,	
	100 µg/ml Streptomycin	
Zellkulturmedium:	DMEM (pH 7,4)	
	10% (v/v) FKS	
	50U Penicillin / 50 µg Streptomycin	
PBS:	NaCl	80 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,44 g/l
	KH ₂ PO ₄ pH 7,4	0,2 g/l
Trypsin/EDTA-Lösung:	Trypsin	0,05% (w/v)

EDTA	0,02% (w/v)
ad 100 ml PBS	

Die Zellen werden im Zellkulturmedium mit Penicillin/Streptomycin in Zellkulturschalen in einem H₂O-gesättigten 5%-CO₂/95%-Luftgemisch bei 37°C kultiviert. Bei Konfluenz werden die Zellen im Verhältnis von 1:3 - 1:15 passagiert. Hierzu werden die Zellen mit PBS (3 ml, 37°C) gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (37°C) ca. 5 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Abrundung der Zellen wird die Trypsin/EDTA-Lösung zu 80% abgesaugt und die Zellen für weitere 10 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Resuspension in vorgewärmtem Zellkulturmedium werden die Zellen mit Hilfe eines Zellzählgeräts ausgezählt und in der gewünschten Dichte ausgesät (5 x 10⁵ Zellen/60er Schale; 1 x 10⁵ Zellen/35er Schale; 0,5 x 10⁵ Zellen/Loch bei 24-Lochplatte). Die Inkubation erfolgte über Nacht im CO₂-begasteten Brutschrank bei 37°C.

2.2.9.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren werden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert (1000×g, 10 Min., RT) in Medium + 10% DMSO-Lösung resuspendiert und zu 1 ml in Kryoröhrchen portioniert. Nach schrittweisem Einfrieren (2 Std. bei -20°C, über Nacht bei -70°C) werden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen werden die Kryoröhrchen 5 Min. auf 37°C erwärmt, anschließend mit 2 ml FKS versetzt, zentrifugiert (1000×g, 10 Min., RT) in DMEM-Zellkulturmedium resuspendiert und auf Zellkulturschalen ausgesät.

2.2.9.3 Transfektion mit Lipofektin™ oder Lipofektamin™

Die transiente Transfektion der Zellen mit Plasmiden erfolgt mit Hilfe von kationischen Lipiden (Lipofektin™, Lipofektamin™). Diese binden an die negativ geladene DNS und können als Liposomen-Nukleinsäure-Komplex mit der Plasmamembran der Zelle fusionieren.

Einen Tag nach der Aussaat werden die Zellen mit Plasmid-DNS transfiziert 2.9. Die DNS und das Lipofektin werden im Medium verdünnt, beide Ansätze gemischt und für mindestens 20 Min. bei RT inkubiert. Es wird serumfreies Medium (2 ml/60er Schale; 800 ml/35er Schale; 250 µl/Loch in 24-Lochplatten)

<i>Schale</i>	<i>DNS</i>	<i>Lipofektin™</i>
60er(21 cm ²)	3,5 µg in 250 µl Medium	26,25 µl in 250 µl Medium
35er(9 cm ²)	1 µg in 100 µl Medium	7,5 µl in 100 µl Medium
24-Lochplatte(2 cm ²)	0,25 µg in 25 µl Medium	1,875 µl in 25 µl Medium

Tabelle 2.9: Transfektionsansätze für verschiedene Kulturschalen

zugegeben, die Zellen zweimal mit Serum- und Antibiotikum-freiem Medium gewaschen, mit dem Transfektionsansatz überschichtet und über Nacht im CO₂-begasteten Brutschrank bei 37°C (ca. 18 Std.) inkubiert. Daraufgehend wird das serumfreie Medium durch Medium mit 10% FKS und Antibiotika ersetzt (60er Schale=5 ml, 35er Schale=2 ml, 24er =1 ml/Loch).

Bei der Transfektion mit Lipofectamin bleibt das Transfektionsgemisch 6 Std. auf den Zellen.

2.2.10 [¹²⁵I]-Endothelin-1 Bindung und Verdrängung an Gesamtmembranen

Verwendete Lösungen und Durchführung:

Tris-ME:	Tris	50 mM
	EGTA	2 mM
	MgCl ₂	10 mM
	→ pH 7,2	
Bacitracin Lsg.:	Bacitracin	2,13 g
	H ₂ O	ad 10 ml (1 Std. bei 70°C)
Aprotinin Lsg.:	Aprotinin	0,15 g
	H ₂ O	ad 10 ml
Tris-Bame:	Tris-ME	500 ml
	Bacitracin Lsg.	500 µl
	Aprotinin Lsg.	500 µl
	H ₂ O	ad 1 l → pH 7,2

2.2.10.1 Membranpräparation

Eine 100er Schale konfluenter, transient transfizierter COS.M6 Zellen wird 2× mit 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen werden mit einem Zellschaber vom Boden

abgelöst und in 2 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wird abzentrifugiert ($400\times g$, 5 Min., $4^{\circ}C$), das Pellet in 2 ml Tris-Bame aufgenommen und im Dounce Homogenisator mit 10 Impulsen bei 800 Upm lysiert. Anschließend wird die Suspension bei $26.000\times g$ für 35 Min. bei $4^{\circ}C$ zentrifugiert und das Pellet in 300 μl Tris-Bame resuspendiert. Danach werden $2\times 5 \mu l$ für die Bestimmung der Proteinkonzentration abgenommen.

2.2.10.2 Bindungsassay

Die Membranen werden in einer Konzentration von 10 $\mu g/ml$ in Tris-Bame eingesetzt. Es werden zwei ^{125}I -ET1 Verdünnungsreihen hergestellt, eine für die totale und eine für die nicht-spezifische Bindung. Die Konzentrationen sind 1000 pM, 500 pM, 250 pM, 125 pM, 62,5 pM, 31,25 pM, und 15,625 pM ^{125}I -ET1 in Tris-Bame. Bei der Verdünnungsreihe für die nicht spezifische Bindung enthält jede Stufe zusätzlich noch 2 μM nicht markiertes ET1. Danach werden 100 μl der Membranlösung mit 100 μl der jeweiligen Verdünnungsreihe vermischt ¹ und 2 Std. bei $25^{\circ}C$ im Wasserbad inkubiert. Der Versuch wird in Duplikaten durchgeführt. Anschließend werden die Proben mittels eines Harvesters durch einen in Polyetylenimin vorbehandelten Whatman Filter gesaugt. Die Membranen binden dabei an den Filter. Die Filter werden $3\times$ mit PBS gewaschen und die Radioaktivität bestimmt. Die Auswertung der cpm erfolgt mit Hilfe der Programme Radlig, und Prism. Die B_{max} wird auf fmol/mg Protein umgerechnet.

Aliquots der Verdünnungsreihe zur Messung der eingesetzten Radioaktivität.

2.2.11 Internalisierungsexperimente

2.2.11.1 Mit Fluorochrom-markiertem Liganden

PFA-Puffer:	Paraformaldehyd	2,5%
	Na-Cacodylat	100 mM
	Sucrose	100 mM
	auf pH 7,5 einstellen	

Auf Deckgläsern (DG) kultivierte, stabil transfizierte CHO-Zellen werden einmal mit PBS gewaschen und in kaltem HEPES-F12 Medium mit Cy3-ET1 (50 nM)

¹Daraus resultiert eine ^{125}I -ET1 Verdünnung von 500 pM, 250 pM, 125 pM, 62,5 pM, 31,25 pM, 15,625 pM, 7,81 pM

30 Min. bei 4°C inkubiert. Unspezifische Bindungen des markierten Liganden werden durch Zusatz von Bacitracin (Endkonzentration 213 µg/ml) minimiert. Die Zellen werden mit kaltem PBS gewaschen und mit 37°C warmen HEPES-F12 Medium die Internalisierung des Ligand/Rezeptor Komplexes gestartet. Nach verschiedenen Zeitabschnitten werden die Zellen in PFA-Puffer 15 Min. bei Raumtemperatur fixiert, mit PBS gewaschen und mit Immu-Mount zur mikroskopischen Auswertung auf Objektträgern eingebettet.

2.2.12 Inhibition der Clathrin-abhängigen Internalisierung

Von Daukas und Zigmond (1985) wurde gezeigt, daß die Clathrin-abhängige Internalisierung in hypertonem Medium reversibel inhibiert werden kann. CHO-Zellen, die den ET_B-Rezeptor stabil exprimierenden, werden mit Fluorochrommarkiertem Liganden, bzw. in Sucrose-Medium (0,2 M; 0,45 M) für 60 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend fixiert. Zur Kontrolle der Zellvitalität wird nach der 60 Min. Inkubationszeit das Sucrose-Medium durch zweimaliges Waschen mit HEPES-F12 Medium entfernt und darin vor der Fixierung für weitere 60 Min. bei 37°C inkubiert.

2.2.13 Kolokalisation von Fluo-ET1 mit DiI-LDL oder TRITC-Transferrin

TRITC-Transferrin (TRITC-Tfr) und DiI-LDL sind bekannte Marker Moleküle zur Untersuchung von intrazellulären Transportprozessen Ghosh und Maxfield (1995). CHO-Zellen, die stabil den ET_B-Rezeptor exprimieren, werden 24 Std. entweder in serumfreiem Medium kokultiviert. Unter diesen Bedingungen wird die Expression von LDL- und Transferrin-Rezeptoren an der Zelloberfläche heraufreguliert Mattia et al. (1984). Zur Untersuchung einer Kolokalisation werden die Zellen mit Fluo-ET1 zusammen mit TRITC-Tfr oder DiI-LDL bei 18°C für 1 Std. inkubiert. Bei dieser niedrigen Temperatur kann eine Internalisierung von Rezeptor/Ligand Komplexen nur in frühe Endosomen erfolgen Dunn et al. (1980). Nach dem Waschen mit eiskaltem PBS erfolgt ein rascher Temperaturshift, indem die Deckgläser auf eine 37°C warme Heizplatte gelegt und die Zellen mit vorgewärmtem HEPES-F12 Medium überschichtet werden. Nach 2 Min., 5 Min., 15 Min. und 30 Min. werden die Zellen dann fixiert.

2.2.14 Konfokale- bzw. Epifluoreszenz-Mikroskopie

Die fixierten Zellen werden mit dem Leica DMLB Epifluoreszenzmikroskop, ausgestattet mit Plan-Fluotar 40×1.00 und Plan-Apo 100×1.40 Ölimmersion Objektiven und verschiedenen Filtereinsätzen untersucht. Mit einer Kamera werden die Bilder dokumentiert und mit der Axio-Vision 2.0 Software bearbeitet. Zusätzlich können die Zellen mit der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) analysiert werden. Querschnitte (z-scans) der MDCK-Zellen werden mit dem Laser Scanning Mikroskop (Argon/Krypton und Argon-Ion laser) aufgenommen. Bei Anregung mit einer Wellenlänge von $\lambda_{exc}=488$ nm läßt sich eine Fluoreszenz zwischen 500 und 580 nm, mit einem Maximum bei etwa $\lambda_{em}=520$ nm beobachten.

2.2.15 Biotinilierung von Oberflächenproteinen

Puffer A:	Tris-HCL pH 8,0	50 mM
	NaCl,	150 mM
	Na ₂ -EDTA pH 8,0	1 mM
	Triton-X-100	1%
	SDS	0,1%
Lysis-Puffer:	Puffer A	
	PMSF	150 μ l
	Mix	80 μ l
PBS-CM:	PBS	
	MgCl ₂	1 mM
	CaCl ₂	0,1 mM
Sulfo-NHS-Biotin™:	Sulfo-NHS-Biotin	0,5 mg/ml
	in PBS-CM	
Stop-Lsg.:	PBS-CM	
	NH ₄ Cl	50 mM
NeutrAvidin™:	Neutravidin-Sepharose	100 μ l
Waschpuffer 1:	Tris-HCL pH 8,0	50 mM
	NaCl,	500 mM
	Na ₂ -EDTA pH 8,0	1 mM
	Triton X-100	0,5%
	SDS	0,1%

Waschpuffer 2:	Tris-HCL pH 8.0	50 mM
	Na ₂ -EDTA pH 8,0	1 mM
	Triton X-100	0,5%
	SDS	0,1 %

Die MDCK-Zellen werden in 12 Lochplatten mit Filtereinsätzen ausgesät und 3-4 Tage kultiviert. Am Versuchstag werden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-CM gewaschen und für 30 Min. bei 4°C auf dem Schüttler mit Biotin-Lsg. (apikal 0,7 ml basal 1,5 ml) inkubiert. Die Biotin-Lsg. wird abgesaugt, 1 ml Stop-Lsg. zugegeben und für 10 Min. bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit eiskaltem PBS-CM werden die Filter ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Eine Membranprotein-Extraktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml Lysis-Puffer 1 Std. im Rotator bei 4°C. Die Überstände werden zentrifugiert (47.000×g, 20 Min., 4°C), 10 µl für die Proteinbestimmung entnommen und im neuen Reaktionsgefäß bei -20°C aufbewahrt.

2.2.16 Inositolphosphat Assay

Waschpuffer:	LiCl	10 mM
	HEPES	10 mM
	BSA	0,2%
Stimulations-Medium:	LiCl 10 mM, HEPES 10 mM, BSA 0,2%	
	ET1	10 nM
Auftragspuffer:	Natrium-Tetraborat	5 mM
	EDTA	0,5 mM

Stabil transfizierte MDCK-Zellen werden auf 12 Loch Transwellplatten über 3-5 Tage bis zur vollkommenen Konfluenz (mit täglichem Mediumwechsel) kultiviert, zweimal mit serumhaltigem DMEM gewaschen und anschließend mit ³H-Inositol für 12 Std. bei 37°C inkubiert. Um den Abbau von gebildeten Inositolphosphat während der Stimulation zu hemmen wird dem Medium 10 mM LiCl zugegeben. Die Zellen werden mit 1000 µl Waschpuffer einmal gewaschen und mit 500 µl Stimulations-Medium apikal oder basal für 30 Min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Zellextraktion wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 150 µl 0,1 N NaOH, 5 Min. auf dem Schüttler aufgelöst, mit 50 µl 0,2 M Ameisensäure neutralisiert und zusammen mit 500 µl Auftragspuffer vollständig in ein

Reaktionsgefäß überführt. Die Proben werden bei -20°C aufbewahrt. Vor der Ionenaustauschchromatographie werden die Proben im Kühlschrank aufgetaut, zentrifugiert ($23.000\times g$, 20 Min., 4°C) und der Überstand auf Dowex Säulen aufgetragen. Die Säulen wurden mit 10 ml H_2O gewaschen und anschließend mit 2 ml 2 M Ammoniumformiat (pH 5,2) eluiert. Nach Zugabe von 6 ml Szintillationsflüssigkeit konnte Radioaktivität im Szintillations-Zähler gemessen.

2.2.17 cAMP-Radioimmunoassay (RIA)

Auf Transwell Filtereinsätzen, 100% konfluent gewachsene stabil transfizierte MDCK-Zellen (s.o.), werden mit 1 ml 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)-Medium (Inhibitor der cAMP phosphodiesterase) gewaschen und mit ET1 bzw. Forskolin 30 Min. bei 37°C im CO_2 Brutschrank inkubiert. Zur Extraktion werden 700 μl eiskalte 0,1%ige Trifluoroacetat Lsg. zugegeben und 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach dem Überführen in ein Reaktionsgefäß wird 10 Min. bei 95°C im Heizblock geschüttelt und die Zellen bis auf weiteres bei -20°C aufbewahrt. Die cAMP Konzentration wird im RIA mit ^{125}I -cAMP und einem Antiserum gegen cAMP bestimmt. Zur Erreichung des Reaktionsgleichgewichts werden die Proben über 24 Std. bei 4°C inkubiert. Anschließend wird ungebundenes cAMP nach erfolgter Zentrifugation ($4500\times g$, 15 Min.) abgesaugt und die Radioaktivität des Sediments gemessen. Die Konzentration von nicht radioaktivem cAMP wird aus der Interpolation einer Standardkurve ermittelt.