

2 Material und Methoden

2.1 Methoden

2.1.1 Vorbereitung der Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an Sammlerinnen der Honigbiene *Apis mellifera carnica* vorgenommen. Während eines Versuches, der sich über mehrere Tage erstreckte, wurden Bienen aus unterschiedlichen Stöcken entnommen, um den genetischen Hintergrund möglichst vielfältig zu halten. Für jeden einzelnen Versuchsansatz wurden Bienen aus demselben Stock und zu der selben Tageszeit eingefangen, um Unterschiede zwischen Experimental- und Kontrollgruppen zu vermeiden.

Die Bienen wurden einen Tag vor Beginn der Experimente beim Ausfliegen aus dem Stock in einer Plexiglaspyramide gefangen und auf Eis immobilisiert. Anschließend wurden die Bienen mit Klebestreifen in Metallröhrchen so fixiert, dass Antenne und Rüssel frei beweglich waren. Am Abend wurden die Tiere mit Zuckerwasser bis zur Sättigung gefüttert und bis zum Beginn des Experiments in einem dunklen, feuchten Behälter aufbewahrt.

Alle Verhaltensexperimente wurden in den Sommermonaten durchgeführt. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden Bienen auch in den Wintermonaten aus einem Flugraum einzeln abgefangen.

2.1.1.1 Habituation und Dishabituation

Für die Habituation des sogenannten Rüsselstreckreflexes (PER = Proboscis Extension Response) wurden Bienen im Abstand von 1 s mit einem in Sucroselösung (0,6 M) getauchten Zahnstocher repetitiv an derselben Antenne berührt. Mit steigender Anzahl der applizierter Stimuli nimmt die Reaktion auf die Einzelstimuli ab, bis die PER schließlich völlig unterbleibt und die Biene habituiert ist. Zur statistischen Analyse wurde für jedes Tier die Anzahl der Stimulationen gemessen, die zu einer Habituation des Reflexes führte. Zum statistischen Vergleich von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Nachdem der Rüsselstreckreflexe der Biene habituiert worden war, wurde er dishabituiert, indem die kontralaterale Antenne mit Zuckerwasser berührt wurde. Zeigte die Biene auf diese Behandlung erneut eine PER, so galt sie als dishabituiert.

2.1.1.2 Sensitisierung

Bei der Sensitisierung wurde eine Antenne der Biene mit Zuckerwasserlösung berührt und 30 s später ein Duftstimulus an beide Antennen appliziert. Die Präsentation eines Zuckerwasserreizes bewirkt, dass die Wahrscheinlichkeit einer PER auf einen Duftstimulus für wenige Minuten erhöht ist (Hammer et al., 1994; Menzel et al., 1991). Es wurde der prozentuale Anteil der Tiere bestimmt, die auf den Duftstimulus mit einem Rüsselreflex reagierten. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem zweiseitigen χ^2 -Test.

2.1.1.3 Olfaktorische Konditionierung

Bei dieser Konditionierung wurde ein Duftreiz (CS) mit einem Zuckerwasserreiz (US) gepaart. Für den Duftreiz wurde Nelkenöl (Apotheke) benutzt, welches zunächst auf ein Filterpapier getropft, über eine Plastikspritze an beide Antennen geblasen und über einen Abzug direkt hinter der Biene rasch abgesaugt wurde. Der US (30% Zuckerwasser) wurde mit Hilfe eines sauberen Zahnstochers an eine oder an beide Antennen (Reizdauer 0,5s) gegeben und direkt anschließend an die herausgestreckte Proboscis appliziert.

Der CS wurde für ca. 4 s gegeben, während der US 2 s nach Beginn der CS-Gabe einsetzte und insgesamt ca. 5 s andauerte. Diese Art der Paarung führt erfahrungsgemäß zu der besten Lernleistung (Menzel, 1968; Menzel und Bitterman, 1983; Bitterman et al., 1983). Für eine Konditionierungsprozedur wurden drei CS-US Paarungen mit einem zeitlichen Intervall von zwei Minuten durchgeführt. Exzitatorisches Lernen tritt nur bei der sogenannten Vorwärtspaarung (CS-US) und nicht bei der Rückwärtspaarung (US-CS) auf. Für die Rückwärtspaarung wurde das obige Zeitschema mit Vertauschung von CS und US benutzt. Nach der Konditionierung wurden die Bienen zurück in den dunklen, feuchten Behälter gestellt.

Die Auswertung der olfaktorischen Konditionierung erfolgte mit dem Statistikprogramm StatView (Apple Macintosh). Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem zweiseitigen χ^2 -Test auf signifikante Unterschiede geprüft.

2.1.1.4 Injektion der Pharmaka

Alle Pharmaka wurden manuell mit spitz ausgezogenen 5 μ l Kapillaren in den Thorax injiziert, entsprechend den Beschreibungen von Müller und Hildebrandt (1995). Das eingesetzte Volumen betrug für alle Pharmaka 1 μ l, die Lösungen wurden in PBS

angesetzt. Weil das Gewicht einer Biene circa 100 mg beträgt, wurden die eingesetzten Pharmaka im Tier ungefähr auf 1/100 der Ausgangskonzentration verdünnt. Der jeweilige Inhibitor wurde 20 min, bevor er wirken sollte, injiziert.

2.1.2 Immunchemische und immunhistologische Techniken

2.1.2.1 Präparation der Pilzkörper

Für die Präparation wurden Bienen auf Eis immobilisiert, der Kopf mit einer Rasierklinge abgeschnitten und auf einer Wachsschale mit Hilfe eines Lötkolbens befestigt. Die Kopfkapsel wurde durch einen flachen Schnitt frontal geöffnet und die Drüsen, Tracheen und Ocellen entfernt.

Wie in Abbildung 4A dargestellt, wurden die Schnitte an den markierten Stellen (gestrichelte Linien) vorgenommen, um die Pilzkörper von den anderen Hirnbereichen zu trennen. Anschließend wurden die optischen Loben sowie die Antennalloben herauspräpariert und das übrige Neuropil, vornehmlich die Pilzkörper, in DEAE-Puffer (für Phosphorylierung) oder PBS (für ELISA, Westernblot) homogenisiert. In den meisten der Experimente wurde eine schnelle Fraktionierung der gewonnenen Homogenate in eine partikuläre und eine lösliche Fraktion durch Zentrifugation vorgenommen (100.000 U/min, 10 min bei 4°C, Ultrazentrifuge). Es wurden jeweils zwei Proben zusammen zentrifugiert, um eine möglichst schnelle Aufarbeitung der einzelnen Probe zu gewährleisten. Für eine Probe wurde je eine Biene verwendet.

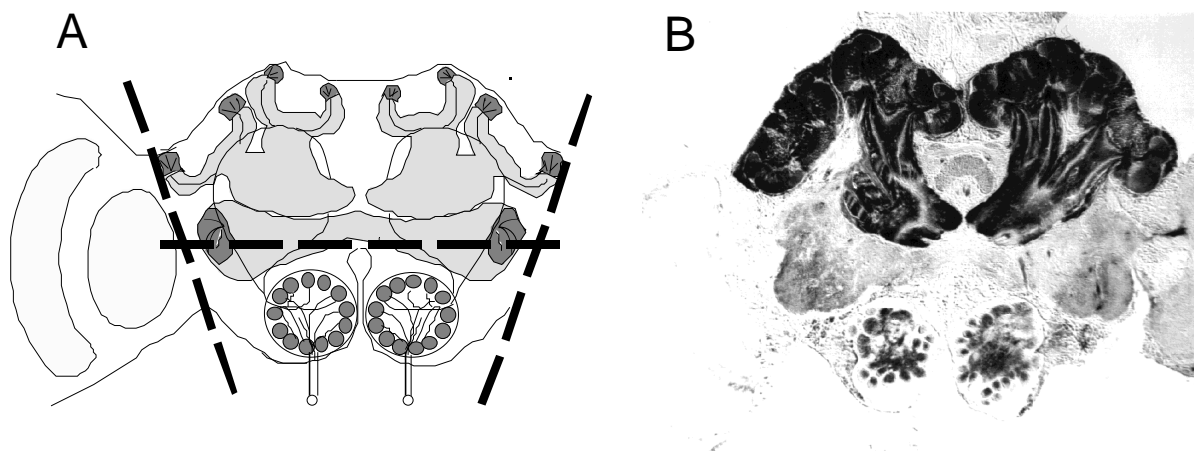


Abbildung 4: A: Schematische Darstellung der Pilzkörperpräparation. Das von Tracheen und Drüsen befreite Gehirn wird an den Stellen, die durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet sind, durchgeschnitten und die Pilzkörper anschließend der Kopfkapsel entnommen. B: Immunhistologischer Nachweis von PKC im Bienenhirn

Abbildung 4B zeigt einen immunhistologischen Nachweis der PKC im Bienenhirn. Die Pedunkel und die Kalyzes der Pilzkörper weisen eine deutliche Färbung auf, ebenso die Somata der Kenyonzellen inner- und außerhalb der Kalyzes. In den Antennalloben sind vor allem die Interneurone angefärbt. Die optischen Loben sind nur sehr schwach angefärbt (nicht gezeigt). PKC wird demzufolge hauptsächlich in zwei Neuropilen, den Antennalloben und den Pilzkörpern, exprimiert. Nach dem Abtrennen der Antennalloben und der optischen Loben können die gemessenen PKC-Signale somit nur aus dem Pilzkörper stammen. Daher war eine relativ grobe, dafür aber sehr schnelle Präparation (< 2 min) möglich.

Homogenisationsvolumina:

Westernblot: Ein Pilzkörper in 400 µl PBS homogenisiert, ohne Zentrifugation

ELISA: Ein Pilzkörper in 400 µl PBS homogenisiert, Zentrifugation
Entnahme des Überstands (cytosolische Fraktion) und Aufnahme der festen Bestandteile in 300 µl PBS (Membranfraktion)

Phosphorylierung: Ein Pilzkörper in 450 µl Puffer A homogenisiert, keine Zentrifugation

2.1.2.2 Immunhistologie

Die Versuchstiere wurden auf Eis gekühlt, die Kopfkapsel abgetrennt, frontal geöffnet und das Gehirn mit 4% Formaldehyd für ca. 5 Minuten vorfixiert. Anschließend wurde das Gehirn frei präpariert und 2 h auf Eis fixiert. Danach wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (50%, 70%, 90%, 99%, 2 x 100% je 10-15 min, anschließend 2-3 min Xylol) und über Nacht in flüssiges Paraffin (56°C) eingebettet. Am nächsten Morgen wurden die Gehirne in frisches Paraffin (56°C) eingebettet, für zwei weitere Stunden bei 56°C inkubiert und in Eiswasser abgeschreckt und ausgehärtet. Für die Mikrotom Paraffinschnitte wurden kleine Paraffinblöcke zurechtgetrimmt und 8 µm dicke Serienschnitte angefertigt, die auf einen mit Poly-D-Lysin beschichteten Objektträger gelegt wurden. Die Schnitte wurden in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und bei 4°C über Nacht mit dem ersten Antikörper (PKC-Antikörper 2A6 Verdünnung 1:100 bzw. RACK1-Antikörper H-187 Verdünnung 1: 50) inkubiert. Nach Abspülen des ersten Antikörpers wurden die Schnitte mit PBS-TX (0,1% Triton X-100, 3 x 10 min) gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper Antimaus IgG bzw. Antirabbit IgG (1:4000) für 2 h bei Raumtem-

peratur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-TX (3 x 10 min) erfolgte eine einstündige Inkubation mit Avidin-Phosphatase (1:10000). Im Anschluss daran wurde nochmals gewaschen (3 x 10 min) und die Färbung im abgedunkelten Reaktionsraum mit gelöstem NBT (Nitroblue-Tetrazolium) und BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat) als Färbelösung durchgeführt. Nach ca. 1 h wurde die Färbung durch Waschen mit PBS-TX gestoppt, die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in dem Einbettmedium Entellan eingebettet.

2.1.2.3 Proteinquantifizierung mittels ELISA-Technik (Enzyme linked immuno sorbent assay)

Die zu testenden Proben wurden in die erste Spalte der verwendeten Mikrotiterplatten pipettiert und mit Hilfe einer Multikanall-Eppendorfpipette eine Verdünnungsreihe angefertigt, so dass jede Probe in 5 verschiedenen Verdünnungsschritten aufgetragen wurde. Anschließend wurden alle Reaktionsvertiefungen mit jeweils 100 µl Homogenisationspuffer aufgefüllt. Die so behandelten Messplatten wurden 1-2 h im Kühlschrank inkubiert, währenddessen die in den Proben enthaltenen Proteine an den Kammerwänden binden konnten. Im Anschluss daran wurde der ungebundene Inhalt verworfen, und zum Blockieren jede Vertiefung mit 300 µl 0,5% BSA-Lösung gefüllt und für weitere 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blocken wurden 50 µl primärer Antikörper (2A6) gegen Proteinkinase C in einer Verdünnung von 1:100 (in Blockpuffer) in jede Vertiefung gegeben und über Nacht bei +4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde nach dem Waschen mit PBS (3 x 5 min) 100 µl des zweiten Antikörpers (Antimaus-IgG biotinyliert, 1: 4000 in Blockpuffer) in jede Vertiefung pipettiert und für eine Stunde inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS (3 x 5 min) erfolgte die Inkubation von 100 µl Avidin-gekoppelten Alkalischen Phosphatase (1:10.000 in Blockpuffer) für 45 min bei Raumtemperatur. Nach der letzten Spülung mit PBS (3 x 5 min) wurde die Färbung unter Zugabe des Substrats Ortho-Nitrophenyl-Phosphat (ONPP) durchgeführt. Die Avidin-Phosphatase setzt ONPP als Substrat um, was zu einer Gelbfärbung führt. Dazu wurde jede Vertiefung der ELISA-Platten mit 200 µl des Substrats (1 mM in RxN-Puffer) bestückt und im Dunkeln über Nacht bei 4°C gefärbt. Die Extinktionen der Proben wurden im ELISA-Reader bei 405 nm gegen 620 nm Referenz gemessen.

Mit Hilfe eines Statistik-Programms (StatView, Apple Macintosh) wurden die Korrelationen und die Steigungen der Geraden der Verdünnungsreihen der Membranfraktio-

nen sowie der zytosolischen Fraktionen berechnet. Die Steigung der Geraden ist proportional der Menge PKC in der cytosolischen und der Membranfraktion.

Die Färbung der einzelnen Platten waren wegen unterschiedlicher Raumtemperatur, Inkubationszeiten und unterschiedlicher Antikörper nicht immer gleich. Da jede Platte jeweils Proben aus allen untersuchten Gruppen enthielt, konnten die Ergebnisse normiert werden. Dabei wurde auf die durchschnittliche Färbung normiert, indem alle Werte einer Platte durch die durchschnittliche Färbung aller behandelten Tiere (Vorwärts- bzw. Rückwärtsparung) dieser Platte dividiert wurden. Somit wurden die Messergebnisse aller Platten untereinander vergleichbar. Die Steigungswerte der Geraden innerhalb einer Messgruppe waren normal verteilt und konnten daher mit Hilfe des ungepaarten t-Tests auf Signifikanz geprüft werden.

Behandlung mit Harnstoff bzw. Trypsin

Für die Untersuchungen mit Harnstoff wurden die präparierten Pilzkörper zunächst in der Hälfte der sonst üblichen Menge PBS homogenisiert. Nach der Zentrifugation und Fraktionierung der Homogenate in eine partikuläre und eine lösliche Fraktion wurde jede Fraktion zweigeteilt und mit der gleichen Menge Harnstoff (8M) oder PBS aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurden die Proben auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen und die PKC-Menge im ELISA quantifiziert.

Bei den ELISA Untersuchungen mit Trypsin wurde die zytosolische Fraktion sowie die Membranfraktion jeder Probe fünfmal auf die ELISA-Platte aufgetragen. Nach dem Erstellen einer Verdünnungsreihe und dem Auffüllen jeder Vertiefung mit 100 µl Homogenisationspuffer wurde zu jeder Fraktion 10 µl PBS (Kontrolle) bzw. 10 µl Trypsin in jeweils verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Die so behandelten Proben wurden 1-2 h im Kühlschrank inkubiert. Vor dem Blocken mit 0,5 % BSA erfolgte dann ein dreimaliges Waschen mit PBS. Somit wurde die Menge der PKC jeder Probe mit und ohne Trypsin im ELISA quantifiziert.

Die Konzentrationen des zugefügten Trypsins wurden so gewählt, dass im Endvolumen die Wirkung der Trypsinkonzentrationen von 100 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml und 0,001 ng/ml untersucht wurden.

2.1.2.4 Westernblot

Beim Westernblot werden Protein von einem SDS-Gel elektrophoretisch auf eine Membran übertragen. Um die PKC im Westernblot zu untersuchen, wurde zunächst

ein Bienehirn in 400 µl PBS homogenisiert, mit 30 µl Probenpuffer versetzt und in einem SDS-Gel aufgetrennt (s.u.). In einer semi-dry Fastblot-Kammer wurde das Gel dann auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und mit jeweils drei Lagen Whatman-Papier über- und unterschichtet. Der Transfer der Proteine vom Gel in die Membran erfolgte bei 22 V und 0,4 mA in 40 min. Anschließend wurde die Membran 90 min bei Raumtemperatur in BSA, slim fast (Mahlzeit für eine gewichtskontrollierende Ernährung aus Sojaprotein, Milcheiweiß etc.) oder Milchpulver inkubiert. Diese Lösungen dienten als Blocker, welche die restlichen Proteinbindungsstellen der Blotmembran absättigen. Der Blot wurde dann über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Antikörper 2A6 bzw. H-187 (1:100 in Blockpuffer mit 0,05% Tween) inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (3 x 5 min) wurde der Blot für 1 h mit dem zweiten Antikörper (Anti-Maus-Peroxidase) behandelt. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysieren die Oxidation von Luminol und lösen damit Chemilumineszenz aus. Nach abschließendem Waschen mit PBS (3 x 5 min) erfolgte eine Inkubation des Blots mit dem Chemilumineszenz- und Oxidations-Reagenz (1:1) im Dunkeln für 20 s bis 5 min. Danach wurde der Blot in Klarsichtfolie gelegt und auf einem Röntgenfilm für 10 s bis 5 min exponiert. Anschließend wurden die Röntgenfilme entwickelt und auf einem UMAX-Scanner gescannt.

Behandlung mit Glutaraldehyd

Für die Behandlung mit Glutaraldehyd wurde jede Probe nach dem Homogenisieren in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wurde mit Glutaraldehyd, der andere als Negativkontrolle mit PBS versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine im SDS-Gel und der Nachweis der PKC im Westernblot. Die zugefügte Menge an Glutaraldehyd betrug immer 1/10 vom Homogenat und wurde in der Konzentration so gewählt, dass die Wirkung der Glutaraldehydkonzentrationen von 10 mM, 1 mM, 0,5 mM und 0,1 mM untersucht wurden.

2.1.2.5 Immunpräzipitation

Zwei Pilzkörper wurden in 400 µl Immunpräzipitations-Puffer homogenisiert. Die so gewonnene Probe wurde in 4 Ansätze zu je 50 µl Homogenat aufgetrennt. Je zwei Ansätze wurden mit 1 mM EGTA, die anderen beiden mit 2 mM Ca^{2+} , 2,4 µg Phosphatidylserin und 0,08 µg 1,2-Dioctanyl-sn-Glycerol versetzt. Zu jeweils einem Ansatz mit EGTA und einem Ansatz mit Ca^{2+} , PS und DAG wurden zwei Minuten später 2,5

µl RACK 1 (H187) und 5 µl 10 % Slim fast zugegeben und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die beiden übrigen Ansätze erhielten keinen primären Antikörper (RACK 1(H187)) und dienten als Negativkontrolle.

Anschließend wurden 10 µl 10% Protein A zu jedem Ansatz gegeben und weitere 90 Minuten bei 4°C inkubiert. Protein A wurde kommerziell erworben und vor der Benutzung drei mal zentrifugiert (1 min bei 10000 U/min) und mit Immunpräzipitations-Puffer gewaschen. Nach der Inkubation mit Protein A wurde jeder Ansatz drei mal hintereinander mit 400 µl Immunpräzipitations-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 15 µl DEAE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die PKC-Aktivität von jedem Ansatz durch die Phosphorylierung von MARCKS Protein (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) gemessen. Durch die Subtraktion der PKC-Aktivität der Ansätze ohne den RACK-Antikörper (Negativkontrolle) von den jeweils dazugehörigen Ansätzen mit dem RACK-Antikörper, konnte die Aktivität von unspezifischer präzipitierter PKC in der Auswertung ausgeschlossen werden.

2.1.3 Bestimmung der Proteinkinase-Aktivität

Die Aktivität der PKC bzw. der PKM wurde *in vitro* durch die Phosphorylierung von MARCKS Protein (myristoylated alanine-rich C kinase substrate) gemessen, welches ein spezifisches Substrat für PKC aus der Honigbiene ist (Müller, 1997). Bei der Phosphorylierung ist die Kinaseaktivität proportional zur Menge des radioaktiv markierten Phosphors (^{32}P), welches in das MARCKS Protein eingebaut wird. In Anwesenheit von Ca^{2+} und DAG ist die zeitabhängige MARCKS-Phosphorylierung für mindestens 200 s linear (Grünbaum 1997). Das Hitze stabile MARCKS Protein aus Rinderhirn wurde für 2 min gekocht, um vorhandene enzymatische Aktivitäten zu zerstören und anschließend für die Phosphorylierung verwendet.

Die Phosphorylierungsansätze enthielten in 20 µl Gesamtvolumen 10 µl Homogenat sowie 10 µl eines Phosphorylierungsmixes. Die Pilzkörper wurden für die Phosphorylierung in DEAE Puffer homogenisiert und die PKC-Aktivität direkt nach der Präparation bestimmt. Für die Messung der PKM-Aktivität wurde zunächst die Bildung der PKM *in vitro* induziert. Dabei wurde Pilzkörperhomogenat mit 1 mM Ca^{2+} versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Phosphorylierung wurde in allen Fällen durch die Zugabe des Homogenats zum Phosphorylierungsmix gestartet. Diese Phosphorylierungsmixe waren so gewählt, dass sie nach Zugabe des Homogenates folgende Endkonzentrationen erreichten:

Zur Bestimmung der PKC-Aktivität:

1 μCi	$(\gamma^{32}\text{P})$ ATP
10 mM	MgCl ₂
10 μM	ATP
6 μg	MARCKS
50 mM	Tris-HCl, pH 7,7
10 mM	Mercaptoethanol
2 mM	CaCl ₂
0,8 μg	Phosphatidylserin
0,02 μg	1,2-Dioctanyl-sn-Glycerol

Zur Bestimmung der PKM-Aktivität:

1 μCi	$(\gamma^{32}\text{P})$ ATP
10 mM	MgCl ₂
10 μM	ATP
6 μg	MARCKS
50 mM	Tris-HCl, pH 7,7
10 mM	Mercaptoethanol
2 mM	EGTA

Als Negativkontrolle diente ein Phosphorylierungsansatz ohne das MARCKS Protein. Die PKC Phosphorylierung wurde nach 50 Sekunden Inkubation des Homognats mit dem Phosphorylierungsmix mit 2,5 μl Probenpuffer gestoppt. Die PKM Phosphorylierung wurde nach 3 min beendet.

Die Aktivität der PKA wurde durch die Phosphorylierung des Phosphatase-Inhibitors 1 gemessen. Die Phosphorylierungszeit betrug 50 s und der Phosphorylierungsmix (Endkonzentration) hierfür bestand aus:

1 μCi	$(\gamma^{32}\text{P})$ ATP
10 mM	MgCl ₂
10 μM	ATP
2 μM	Phosphatase-Inhibitor 1
50 mM	Tris-HCl, pH 7
10 mM	Mercaptoethanol
1 mM	EGTA
5 μM	cAMP

Direkt nach der Phosphorylierung wurden die Proteine der einzelnen Phosphorylierungsansätze in der diskontinuierlichen Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach fünf Minuten Inkubation in einer Fixierlösung und 30 min Wässerung wurde das Gel auf einem Stück Whatman-Papier in einem Vakuum-Geltrockner (LKB, 2003) 30 min getrocknet.

Um die MARCKS-Phosphorylierung quantifizieren zu können, wurde jedes SDS-Gel über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert. Anschließend wurden die Röntgenfilme entwickelt und auf einem UMAX-Scanner digitalisiert. Die Schwärzung der MARCKS-Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Die Schwärzung jeder MARCKS-Bande wurde jeweils auf die Gesamtschwärzung der betroffenen Gelspur normiert.

2.1.4 Diskontinuierliche Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Gelen. Die Seife SDS (Sodiumdodecylsulfat) bindet Proteine zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis.

Zwei Glasplatten (10 x 10 cm), zwischen denen sich an den seitlichen Rändern und dem unteren Rand als Abstandhalter 0,5 mm dicke Teflonstreifen befanden, wurden mit Buchhalterklammern zusammengepreßt und die Ränder mit erhitzter Agarose (0,5 %) abgedichtet. Bei der angewandten diskontinuierliche Gelelektrophorese (nach Lämmli 1970) wurde ein Trenngel mit 10% Acrylamid von einem Sammelgel mit 4% Acrylamid überschichtet. Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von ca. 3 cm eingefüllt und mit n-Butanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels wurde das n-Butanol ausgespült und das Spülwasser mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel eingefüllt und ein Kamm mit 10 bzw. 12 Taschen eingesetzt. Nach dem Ende der Polymerisation wurden Buchhalterklammern, der Kamm und der untere Teflonstreifen entfernt, die Taschen mit Laufpuffer gespült und das Gel in eine Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur und konstanter Stromstärke (22 mA).

2.2. Material

2.2.1 Puffer und Lösungen:

PBS:	137	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	10,1	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,8	mM	KH ₂ PO ₄
Blockpuffer: (für ELISA)	0,5	%	BSA in PBS
Blockpuffer (für Westernblot)			
PKC-Nachweis:	2	%	slim fast (Schoko Royale) in PBS
oder	0,5	%	BSA in PBS
RACK1-Nachweis:	5	%	Milchpulver in PBS
RxN-Puffer:	0,1	M	Tris-HCl, pH 8,7
	1	mM	MgCl ₂
Färbelösung für ELISA :	1	mM	ONPP (Ortho Nitrophenyl-Phosphat) in RxN-Puffer
Färbelösung für Immunhistologie:	1	mg	NBT (Nitroblue-Tetrazolium) und
	2	mg	BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- phosphat vorgelöst in 20 µl DMSO in RxN-Puffer
	10	ml	
Immunpräzipitations- Puffer:	150	mM	NaCl
	10	mM	Tris, pH 7,4
	1	mM	EDTA
	0,1	%	NP 40

DEAE-Puffer:	50	mM	Tris, pH 7.8
	1	mM	EDTA
	1	mM	EGTA
	10	mM	Mercaptoethanol
Puffer A:	50	mM	Tris, pH 7.8
	10	mM	Mercaptoethanol
Probenpuffer:	0,5	M	Tris-HCl, pH 6,8
	5	%	SDS
	5	%	Mercaptoethanol
	20	%	Glycerin
	4	%	Bromphenolblau
Laufpuffer: für SDS-Gele	2,5	mM	Tris
	19,2	mM	Glycin
	0,1	%	SDS
Fixierlösung: für SDS-Gele	30	%	Methanol
	10	%	Essigsäure
Trenngel:	10	%	Acrylamid
	0,3	%	Bisacrylamid
	0,375	M	Tris-HCl, pH 8,3
	0,1	%	SDS
	0,05	%	Ammoniumpersulfat
	0,25	%	TEMED
Sammelgel:	4	%	Acrylamid
	0,12	%	Bisacrylamid
	0,166	M	Tris-HCl, pH 6,8
	0,1	%	SDS
	0,05	%	Ammoniumpersulfat
	0,25	%	TEMED

Blotpuffer:	20	%	Methanol
	50	mM	Tris
	40	mM	Glycin
	0,14	M	SDS
Prestained Marker	0,5	mg	Myosin
	0,5	mg	β -Galaktosidase
	0,5	mg	Phosphorylase B
	25	mg	BSA
	25	mg	Albumin
	5	mg	Carboxy Anhydrase

Chemikalien von Fa. Sigma, Deisenhofen; Fa. AppliChem, Darmstadt; Fa. Merck, Darmstadt und Fa. Roth, Karlsruhe.

2.2.2 Chemikalien:

BSA (Rinder Albumin)	Fa. AppliChem
Bisindolylmaleimide 1, Hydrochloride	Calbiochem
Chelerythrine Chloride	Calbiochem
Calphostin C	Calbiochem
Gö 7874, Hydrochlorid	Calbiochem
Ro -31-8425	Calbiochem
PKC Inhibitor Peptide 19-31	Calbiochem
D(+)-Saccharose	Fa. AppliChem
Nelkenöl	Apotheke
Trypsin	Sigma (Deisenhofen)
Urea	Merck
Glutaraldehyd; 25% Aqueous Solution	Sigma (Deisenhofen)
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus	NEN (Köln); Färbelösung: Chemiluminescence- und Oxidations-Reagenz 1:1, bei RT
MARCKS-Protein	Aus Rindergehirn, Schlachthof Berlin

Phosphatase Inhibitor 1 ($\gamma^{32}\text{P}$) ATP (5000 Ci/mmol)	Aus Rindergehirn, Schlachthof Berlin NEN (Köln)
EGTA	Ethylenglykol-bis (fl-Amino-Ethylether) N'N'- Tetra-Acetic-Acid; 3,804g EGTA mit 50 ml aqua dest auffüllen; mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt
NP 40 (Igepal CA-630)	Octylphenoxypolyethoxyethanol

2.2.3 Antikörper und Enzyme

PKC-Antikörper 1:100 in Blockpuffer	2A6 (Grünbaum/Müller)
RACK1-Antikörper 1:100 in Blockpuffer	H-187 (Santa Cruz Biotechnology)
Antimaus IgG, gekoppelt an Biotin 1:4000 in Blockpuffer	Sigma (Deisenhofen)
Antimaus-IgG Phosphatase 1:4000 in Blockpuffer	Sigma (Deisenhofen)
Antimaus IgG-Peroxidase, 1:10000 in Blockpuffer	Sigma (Deisenhofen)
Antirabbit IgG-Peroxidase, 1:10000 in Blockpuffer	Sigma (Deisenhofen)
Avidin-Phosphatase 1:10.000 in Blockpuffer	Sigma (Deisenhofen)
Protein A	Protein A von <i>Staphylococcus aureus</i> (Sigma)

2.2.4 Verbrauchsmaterial

Röntgenfilme X-ARS	Fa. Kodak, Rochester
Röntgenfilm-Entwickler Agfa G150	Fa. Siemens, Berlin
Röntgenfilm-Fixierer Agfa G350	Fa. Siemens, Berlin
Nitrozellulose-Membran Optitran BA-S 83	Fa. Schleicher und Schuell, Basel
Whatman-Filterpapier	Fa. Schleicher und Schuell, Basel
5 µl Glaskapillare	Fa. Selzer, Waghäusel
ELISA-Platten	Falcon, Becton Dickinson

2.2.5 Geräte

Binokular	Wild, Heerbrugg
Lichtquelle KL 1500 LCD	Fa. Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge RC-5B Refrigerated; Superspeed Centrifuge	Du Pont Sorvall, Bad Homburg
Ultrazentrifuge RCM120Ex	Du Pont Sorvall, Bad Homburg
Biofuge 13	Heraeus Sepatech
ELISA-Reader	SLT Labinstruments, 400 ATX mit Curve-Fit-Software
Elektrophoresekammer	Eigenbau
Fastblotkammer Trans-Blot SD	Fa. BioRad, München
Geltrockner	LKB, 2003
Durchlichtscanner	Fa. UMAX UC 840, Taiwan
Homogenisator	Fa. Roth