

4. Material und Methoden

4.1. Analytik von Proteinen

4.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proben sollten je 2 bis 20 µg Protein enthalten und möglichst frei von Detergentien sein. Sie wurden mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und dann mit 500 µl Bradford-Reagenz versetzt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte photometrisch bei 595 nm. Als Standard wurde eine BSA-Lösung der Konzentration 1 mg/ml verwendet.

Bradford-Reagenz:

0,06 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250
3 % (v/v) HClO₄

4.1.2. Eindimensionale diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-Protean II-Kammer (BioRad) durchgeführt. Die Trenngelgele waren von der Dimension 55 x 83 x 0,75 mm oder 55 x 83 x 1,5 mm, ihr Acrylamidanteil betrug 10 % (Sammelgel 3 %).

Die Proben wurden in der gewünschten Menge Laemmli-Probenpuffer gelöst und 5 min auf 95 °C erhitzt.

Laemmli-Probenpuffer:

62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8
3 % (w/v) SDS
5 % (w/v) β-Mercaptoethanol
10 % (v/v) Glycerol
0,025 mg/ml Bromphenolblau

Laufpuffer:

25 mM Tris-Base (pH 8,3)
192 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

Trenngel:

10 % (w/v) AA/Bis (30% Acryl-/0,8% Bisacrylamid)
375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1 % (w/v) SDS
1 µg/ml APS
1 µg/ml TEMED

Sammelgel:

3	%(w/v)	AA/Bis (30% Acryl-/0,8% Bisacrylamid)
375	mM	Tris/HCl pH 6,8
0,1	%(w/v)	SDS
1	µg/ml	APS
1	µg/ml	TEMED

Die Gele wurden nach dem Ende der Elektrophorese entweder geblottet oder 1 h in Coomassie-Färbelösung gefärbt und dann bis zum gewünschten Entfärbungsgrad in Entfärbelösung inkubiert.

Färbelösung:

0,1 % Servablau R250 (Coomassie)
50 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärbelösung:

10 % Methanol
10 % Essigsäure

4.1.3. BAC-SDS-PAGE

Die Methode basiert auf einem Protokoll von Mc Farlane et al. (1983, 1989). Die folgende Vorschrift ist eine Modifikation jenes Protokolls von Hartinger et al. (1996).

Die Proteine werden in der ersten Dimension mittels Benzyldimethyl-n-hexadecylammonium Chlorid (16-BAC) –Gelelektrophorese, in der zweiten Dimension mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Aufgrund der Gegenwart ionischer Detergentien in beiden Dimensionen ist diese Methode besonders gut zur Auftrennung integraler Membranproteine geeignet.

Die Elektrophorese wurde in einer Mini-Protean II-Kammer (BioRad) in der Dimension 55 x 83 x 1,5 mm durchgeführt.

Die Proteine wurden in der gewünschten Menge 1 x - 1,5 x Probenpuffer gelöst, 5-10 min auf 60 °C erhitzt und anschließend in der 1. Dimension über ein 6-10 %-Gradientengel (16-BAC-Gel) aufgetrennt. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 4 %, die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel.

Das resultierende Gel wurde 6 x 10 min in Fixativ (35 % Isopropanol, 10 % Essigsäure in Wasser) inkubiert, dann 1 h in Coomassiebau (0,15 % w/v in Fixativ) gefärbt und über Nacht in Fixativ entfärbt.

Das Gel wird 3 x 10 min in 100 mM Tris/HCl, pH 6,8 äquilibriert. Die Spuren der aufgetrennten Proben wurden ausgeschnitten und die Gelstreifen je auf ein 7,5-15 % Gradienten-

gel (SDS-Gel nach Laemmli) aufgetragen. Danach wurden sie mit 3x Laemmli-Probenpuffer überschichtet und 5 min inkubiert. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 4 %, die Auftrennung der Proteine erfolgte in der 2. Dimension bei einer Stromstärke von 15 mA im Sammelgel und 30 mA im Trenngel.

1. Dimension (16-BAC):

Probenpuffer (2x):		Laufpuffer:	
10 % (w/v)	16-BAC	150 mM	Glycin
50 % (w/v)	Harnstoff	2,5 mM	16-BAC
10 % (v/v)	Glycerol	50 mM	H ₃ PO ₄
75 mM	DTT		
0,05 % (w/v)	Pyronin Y		
Zum Lösen auf 60 °C erhitzen			

Trenngel 6 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %	
6 % (w/v)	10 % (w/v)	4 % (w/v)	AA/Bis (30% Acryl-/0,8% Bisacrylamid)
75 mM	75 mM	-	Phosphatpuffer, pH 2,1
-	-	125 mM	Phosphatpuffer, pH 4,1
18 % (w/v)	18 % (w/v)	10 % (w/v)	Harnstoff
0,048 % (w/v)	0,079 % (w/v)	0,23 % (w/v)	Bisacrylamid
1 % (w/v)	1 % (w/v)	0,7 % (w/v)	16-BAC
4 mM	4 mM	4,16 mM	Ascorbinsäure
8 µM	8 µM	5,5 µM	FeSO ₄
0,0012 % (w/v)	0,0012 % (w/v)	0,002 % (w/v)	H ₂ O ₂

2. Dimension (SDS-PAGE):

Laemmli-Probenpuffer:	Laufpuffer:
s. 4.1.2	s. 4.1.2

Trenngel 7,5 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %	
7,5 % (w/v)	15 % (w/v)	4 % (w/v)	AA/Bis (30 % Acryl-/ 0,8 % Bisacrylamid)
375 mM	375 mM	-	Tris/HCl, pH 8,8
-	-	375 mM	Tris/HCl, pH 6,8
0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)	SDS
1 µg/ml	0,35 µg/ml	1 µg/ml	APS
1,2 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	TEMED

4.1.4. Blotting von Proteinen nach dem „Semidry“-Verfahren

Um die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu übertragen wurde ein „Sandwich“ aus Filterpapier (3 Lagen) / Membran / Gel / Filterpapier (3 Lagen auf die anodische Carbonglasplatte gelegt).

Vor dem Zusammenbau der Apparatur wurden Filterpapier und Membran auf die Größe des Geles zugeschnitten und ausgiebig in Blotpuffer inkubiert.

Nach dem Aufsetzen der kathodischen Platte wurde diese beschwert und der Blotvorgang gestartet.

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte unabhängig von der Dicke des Gels bei 1 mA / cm² Gelfläche. 0,75 mm starke Gele wurden 1,5 h geblottet, bei 1,5 mm starken Gelen wurde die Zeit auf 2 h verlängert.

Filterpapier: Blotting-Papiere GB 002 (Schleicher & Schüll)

Nitrozellulosemembran: Hybond (Amersham)

Blotpuffer:

48	mM	Trisbase
39	mM	Glycin
20	%	Methanol
0,037	%	SDS

4.1.5. Ponceaufärbung von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran

Die Blotmembran wird 5 min in Ponceau-Rot-Färbelösung inkubiert. Die Färbung ist reversibel, die Entfärbung erfolgte in mehreren Waschschritten in deionisiertem Wasser.

Färbelösung:

0,2 %	Ponceau S
3 %	Essigsäure

Entfärbelösung:

Wasser (deionisiert)

4.1.6. SYPRO-Färbung von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran

Vorteil der Färbung der Proteine auf Blotmembran mit SYPRO Ruby (Molecular Probes) gegenüber der Ponceaufärbung ist eine erheblich höhere Empfindlichkeit, nachteilig hingegen ist der erheblich höhere Zeitaufwand.

Zunächst wurde die Membran 15 min in 7% Essig/10% Methanol inkubiert und dann ausgiebig 4 x 5 min in deionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde die Membran 15 min in SYPRO Ruby (Molecular Probes) inkubiert und dann 6 x 1 min in deionisiertem Wasser gewaschen.

Die Detektion der Proteine erfolgte unter UV-Licht.

4.1.7. Nachweis von Proteinen durch Immunoblotting (*Western-Blotting*)

Die Immunoblottechnik dient zum spezifischen Antikörpernachweis eines bestimmten Proteins innerhalb eines Gemisches. Sie umfasst die Auftrennung des Gemisches mittels Gelelektrophorese und das anschließende Blotten der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran.

Die Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Magermilchpulver in TBS-T und anschließend über Nacht in einer Lösung des ersten Antikörpers (in gewünschter Verdünnung in 5 % Milch in TBS-T) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 5 min gründlich mit TBS-T und 1 x 5 min mit TBS gewaschen und dann in einer Lösung des zweiten Antikörpers (in gewünschter Verdünnung in 5 % Magermilchpulver in TBS-T), einem Meerrettichperoxidase-Konjugat, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut 3 x 5 min in TBS-T und 1 x in TBS gewaschen.

Die Detektion erfolgte durch Zugabe der Luminol- bzw. Phenolhaltigen Lösungen des ECL-Kits (PIERCE) nach Vorschrift des Herstellers im Verhältnis 1:1. Die lumineszierende Bande wurde in der Dunkelkammer auf einem ECL-Film (Amersham Pharmacia) abgelichtet. Die Belichtungsdauer ist sehr variabel und stark abhängig von persönlicher Vorliebe und der Stärke der Lumineszenz, in der Regel sind aber wenige Sekunden ausreichend.

TBS:		TBS-T:			
20	mM	Tris/HCl, pH 7,4	20	mM	Tris/HCl, pH 7,4
150	mM	NaCl	150	mM	NaCl
			0,1	%	Tween-20

Verdünnungen der verwendeten Antikörper (sofern nicht anders angegeben):

<i>Antikörper:</i>	<i>Verdünnung:</i>
Anti-PSF (polyklonal, Kaninchen, Pineda Antikörperservice, Berlin)	1:5000
Anti-PKC α (polyklonal, Kaninchen, Santa Cruz)	1:1000
Esel anti Kaninchen IgG (Meerrettichperoxidase gekoppelt, Dianova)	1:2500

4.1.8. "Strippen" der Blotmembran

Sofern der Nachweis beim Immunoblotting über einen Meerrettichperoxidase gekoppelten 2. Antikörper erfolgte, ließen sich sowohl 1. als auch 2. Antikörper wieder von der Blotmembran entfernen, so daß dieselbe Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern behandelt werden konnte.

Die Membran wurde 30 min bei 50 °C und unter leichtem Schwenken in „Stripping“-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min gründlich mit TBS-T gewaschen, danach konnten erneut die unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T geblockt und der nächste Antikörpertest durchgeführt werden.

„Stripping“-Puffer: 62,5 mM Tris pH6,7
 2 % SDS
 100 mM Mercaptoethanol

4.1.9. Immunpräzipitation

Diese Methode dient der spezifischen Fällung eines Proteins aus einem Proteingemisch.

Die Proben wurden mit mehrfach konzentriertem NP-40- oder RIPA-Puffer auf die unten angegebenen Bedingungen eingestellt und nach Zugabe der gewünschten Menge des Antikörpers 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde jeder Ansatz mit 25 µl Protein-G-Sepharose versetzt und 1 h bei 4 °C geschüttelt. Danach wurden die „beads“ sanft und kurz herunterzentrifugiert und der jeweilige Überstand vorsichtig mit einer feinen Kanüle abgenommen und verworfen, bzw. zur Kontrolle aufbewahrt.

Die Pellets wurden dreimal mit eiskaltem 1 x Nonidet P-40 (NP-40)- bzw. RIPA-Puffer gewaschen, anschließend in einer geeigneten Menge Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C inkubiert. Schließlich wurden die Sepharose-„beads“ herunterzentrifugiert und der Überstand über SDS-PAGE analysiert.

NP-40-Puffer:
150 mM NaCl
1 % NP-40
50 mM Tris/HCl (pH 8,0)

RIPA-Puffer:
150 mM NaCl
1 % NP-40
50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
0,5 % Desoxycholat (DOC)
0,1 % SDS

Laemmli-Probenpuffer:
s. 4.1.2

4.1.10. Bindungstest („Pull down assay“)

Je 100 µg Nucleoplasma wurden mit 1 µg GST-PKC α , 50 µl Glutathionagarose-Suspension (Pharmacia Biotech) und den Effektoren in einem Endvolumen von 400 µl Bindungspuffer für 90 min bei 4 °C und unter permanentem Schütteln inkubiert.

Anschließend wurde die Mischung bei 2000 x g für 20 min zentrifugiert und 30 µl des Überstandes, der die ungebundenen Proteine enthielt, abgenommen und zur weiteren Analyse aufbewahrt. Der Rest des Überstandes wurde entfernt und die pelletierten Agarose-, „beads“ 4 x mit 0,5 ml Bindungspuffer gewaschen. Schließlich wurden 50 µl Laemmli-Probenpuffer auf das Pellet des letzten Waschschruttes gegeben und die Probe 5 min auf 95 °C erhitzt.

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert.

Bindungspuffer:	Laemmli-Probenpuffer:
20mM Tris/HCl (pH 7,4)	s. 4.1.2
100mM NaCl	
2mM MgAc	
2mM DTE	
0,1% Tween 20	
0,1% Casaminoacids	
Protease-Hemmer	

4.1.11. Phosphorylierung von Proteinen (*in vitro*)

Es wurde auf Eis folgender Reaktionsansatz zusammenpipettiert:

Reaktionsansatz:	70 µg Probe (Kernmembran/Nucleoplasma)
	44 ng PKC α (Calbiochem/GST-PKC α [s 4.2.13 & 4.3.5])
	10 µl ATP/ATP*-Mix
	10 µl 10x Reaktionsmix
	0,3 µl PMA (100 ng /ml)
	ad 100 µl H ₂ O

Durch die Zugabe des ATP/ATP*-Mix wurde die Reaktion gestartet und der Reaktionsansatz 2 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion unter Eiskühlung durch die Zugabe von 20 µl 60% TCA gestoppt und die Proteine gefällt. Nach weiteren 30 min In-

kubation auf Eis wurden die Proben sanft zentrifugiert und das Pellet einmal gründlich mit Aceton gewaschen, um überschüssige Radioaktivität zu entfernen.

Die Proteine wurden anschließend in geeignetem Probenpuffer aufgenommen und über SDS-PAGE oder BAC-SDS-PAGE aufgetrennt.

Das Gel wurde schließlich im Vakuum zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet und die Radioaktivität schließlich durch Exposition des Gels mit einem Phosphoimagerscreen oder einem Autoradiographiefilm (Kodak Biomax MS-1 Film) in einer Autoradiographiekassette und anschließender Filmentwicklung bzw. Messung mittels Phosphoimager (Molecular Dynamics Storm 840) detektiert.

10x-ATP/ATP^{*}-Mix: 200 μ M ATP, 2 μ Ci/Reaktionsansatz γ -ATP (NEN)

10x-Rkt-Mix: 200 mM Tris/HCL pH 7,4
 50 mM MgAc
 1 mM CaCl₂
 10 mM DTE
 50 μ g/ μ l Phosphatidylserin (PS)

4.1.12. In Gel-Verdau mit Trypsin

Der Trypsinverdau wurde nach der von Shevchenko et al. (1996) beschriebenen Methode durchgeführt.

Die Bande bzw. der Spot des zu untersuchenden Proteins wurde möglichst präzise aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und mit 7,5 μ l/mm³ Gel Acetonitrilpuffer versetzt. Nach 15 min Inkubation bei RT und 400 rpm, wurde der Überstand entfernt und durch 15 μ l/mm³ Gel Acetonitril ersetzt. Nach einer erneuten 5 min Inkubation wurde das Gelstück 5 min lyophilisiert. Anschließend wurde das Gelstück in 7,5 μ l/mm³ Gel frisch angesetztem DTT-Puffer bei 56 °C und 400 rpm inkubiert, bevor der Überstand erneut entfernt und durch 15 μ l/mm³ Gel ersetzt wurde. Nach etwa 10 min sollte das Gelstück wieder geschrumpft sein und eine milchigweiße Farbe aufweisen. Das Acetonitril wurde nun abgenommen und durch 7,5 μ l/mm³ Gel frisch angesetzten Iodacetamid-Puffer ersetzt, worin das Gelstück 20 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert wurde. Danach wurde der Überstand erneut entfernt, durch 15 μ l/mm³ Gel NH₄HCO₃-Puffer ersetzt und darin 15 min bei RT und 400 rpm inkubiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Gelstück in Acetonitril etwa 10 min inkubiert, bis es wieder die oben beschriebene milchigweiße Färbung aufwies. Anschließend wurde das

Gelstück 5 min lyophilisiert, danach mit 3-4 µl Trypsinpuffer versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden etwaige Reste des Trypsinpuffers von dem Gelstück entfernt und das Gelstück mit 2-3 µl 25 mM NH₄HCO₃-Lösung überschichtet. Die Probe wurde nun über Nacht bei 37 °C und 400 rpm inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Probe kurz zentrifugiert. Nach einer erneuten Inkubation für 20 min bei 37 °C und 400 rpm wurde 1 µl des Verdauüberstandes für die MALDI-Messung abgenommen.

Für den Restverdau wurden 20 µl/mm³ Gel NH₄HCO₃-Puffer zu der Probe hinzugefügt und 15 min bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Der Überstand wurde nun abgenommen aber aufbewahrt, während das Gelstück 10 min in Acetonitril bis zur milchigweißen Färbung inkubiert wurde. Der Überstand wurde wieder abgenommen und mit dem aufbewahrten Überstand des vorangegangenen Schrittes vereinigt. Das Gelstück wurde nun mit 20 µl/mm³ Gel 10 % (v/v) Ameisensäure versetzt und darin 15 min bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Danach wurde das gleiche Volumen Acetonitril hinzugefügt und die Probe erneut 15 min bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Schließlich wurde der Überstand abgenommen und mit den beiden letzten Überständen vereinigt. Die Überstände wurden zum Schluß lyophilisiert und bei -20 °C aufbewahrt.

NH₄HCO₃-Puffer:

100 mM NH₄HCO₃, pH 8,2

Acetonitrilpuffer:

50 % NH₄HCO₃-Puffer

50 % Acetonitril

DTT-Puffer:

100 mM DTT

100 mM NH₄HCO₃, pH 8,2

Iodacetamid-Puffer:

55 mM Iodacetamid

100 mM NH₄HCO₃, pH 8,2

Trypsinpuffer:

12,5 ng/µl Trypsin (Sigma)

25 mM NH₄HCO₃, pH 8,2

4.2. Molekularbiologische Methoden

4.2.1. Anzucht von Bakterien

Für Kulturen in Schüttelkultur im 3-5 ml-Maßstab wurde jeweils eine einzelne Kolonie der gewünschten Platten gepickt und je 3-5 ml LB-Medium angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert.

Wenn die zum Animpfen benutzten E. coli Plasmide enthielten, wurde dem LB-Medium das dem Resistenzgen entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

LB-Medium:

10 g Trypton (ICN, USA)

5 g Yeast extract (ICN, USA)

5 g NaCl

[5 g für Agar für Platten]

ad 1 l H₂O,

dann 20 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert

[und vor dem Gießen der Platten auf ca. 60 °C abgekühlt]

4.2.2. Herstellung kompetenter E. coli

Eine 5 ml-, „Über Nacht“-Schüttelkultur von DH5 α -Zellen wurde 1:100 verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Zellen für 5 min auf Eis gestellt und dann 5 min bei 5000 x g und 4 °C pelletiert. Die Pellets werden in 2/5 Originalvolumen Tfb I resuspendiert und die Suspensionen weitere 5 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen erneut 5 min bei 5000 x g und 4 °C pelletiert wurden. Die Pellets wurden in 1/25 Originalvolumen Tfb II resuspendiert und die Suspensionen 15 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Tfb I:

30 mM KAc/Essigsäure, pH 5,8

100 mM KCl

10 mM CaCl₂

50 mM MnCl₂

15 % Glycerol

sterilfiltrieren!

Tfb II:

10 mM MOPS/KOH, pH 6,5

75 mM CaCl₂

10 mM KCl

15 % Glycerol

sterilfiltrieren!

4.2.3. Transformation kompetenter E. coli

Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock. Dazu wurden die kompetenten Zellen zunächst vorsichtig auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl Zellsuspension mit je 2-3 µl DNA-Lösung (ca. 50-500 ng Plasmid-DNA) versetzt und dann 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die E. coli einem 60 s währenden Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und anschließend weitere 2 min auf Eis inkubiert, bevor je 900 µl LB-Medium zugegeben wurden und die Ansätze 1 h bei 37 °C und 225-250 rpm inkubiert werden.

Jeweils 250 µl jedes Ansatzes wurden auf je eine LB-Agarplatte ausplattiert, die das Antibiotikum enthielt, das dem Resistenzgen des transformierten Plasmids entsprach.

Die Agarplatten wurden 16-24 h bei 37 °C inkubiert. Von den gebildeten Kolonien wurden Schüttelkulturen im 3-5 ml-Maßstab angelegt, aus denen die DNA durch Minipräparation isoliert werden konnte, um mittels eines Restriktionsverdau den Transformationserfolg zu überprüfen.

LB-Medium: s.4.2.1

4.2.4. Mini/Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Zellen werden Plasmide von besonders hoher Reinheit benötigt. In diesem Falle wurden die Plasmide über eine Midi-Präparation (Clontech) aus den Zellen isoliert. Für alle anderen Zwecke wurde aufgrund des erheblich geringeren Zeitaufwandes die Präparation mittels Nucleospin Miniprep Kit (Clontech) bevorzugt.

Die das gewünschte Plasmid enthaltenden Zellen (OD_{600} ca. 1,5) einer 5 ml Übernachtskultur (für Midi-Präparation 30 ml Übernachtskultur, die in Klammern gesetzten Angaben dieser Beschreibung beziehen sich im weiteren immer auf die Midi-Präparation) wurden durch 5 min Zentrifugation bei 10.000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl (4 ml) S1-Puffer resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 250 µl (4 ml) S2-Puffer 3 bis 4 min bei RT lysiert. Durch die Zugabe von 300 µl (4 ml) S3-Puffer wurden die Plasmide renaturiert und bleiben unter den gegebenen Hochsalzbedingungen in Lösung. Die chromosomale DNA ist zu groß, um renaturieren zu können, sie wird mit den denaturierten Proteinen und SDS mittels 12 min (38 min) Zentrifugation bei 10.000 x g pelletiert.

Der Überstand wurde auf eine NucleoSpin-Säule (mit 2 ml N2-Puffer äquilibrierte NucleoBond AX 100-Säule) mit einer DNA-bindenden Silikat-Matrix gegeben und bei 10.000 x g zentrifugiert (bei 1 x g durchtropfen gelassen). Die Säule wird zweimal mit 700 µl

(4 ml) N3-Puffer gewaschen und die Plasmide schließlich mit 50 μ l (5 ml) deionisiertem Wasser eluiert.

Wurde eine Midi-Präparation durchgeführt, so wurde das Eluat mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und die DNA 30 min bei 10.000 x g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, gevortext und die DNA durch erneute Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C herunterzentrifugiert. Die DNA wurde anschließend in 200 μ l deionisiertem Wasser aufgenommen.

S1-Puffer: 50 mM Tris/HCl
10 mM EDTA
100 μ g/ml RNase A

S2-Puffer: 200 mM NaOH
1 % SDS

S3-Puffer: 2,8 M KAc, pH 5,1

N2-Puffer: 100 mM Tris/H₃PO₄, pH 6,3
900 mM KCl
15 % Ethanol

N3-Puffer: 100 mM Tris/H₃PO₄, pH 6,3
1,15 M KCl
15 % Ethanol

4.2.5. Ethanolfällung von DNA

Die Ethanolfällung wurde zur Aufkonzentrierung oder als Reinigungsschritt zur Abtrennung niedermolekularer Verunreinigungen eingesetzt.

Eine wässrige DNA-Lösung wurde mit 3 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt und anschließend 20 min bei -20 °C inkubiert. Danach wurde die DNA 20 min bei 10.000 x g pelletiert und das Pellet mit eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen um mitpräzipitierte Salze zu entfernen. Das Pellet wurde getrocknet und in einem geeigneten Volumen Wasser aufgenommen.

4.2.6. Konzentrationsbestimmung von DNA

Es wurde die UV-Absorption der DNA-haltigen Lösung bei 260 nm und 280 nm gemessen.

Es gilt: $1 A_{260} = 50 \mu\text{g dsDNA/ml}$. Der Quotient A_{260}/A_{280} läßt eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNA zu, da Proteinverunreinigungen den Wert des Quotienten vermindern, der bei DNA hoher Qualität 1,8 bis 2 beträgt.

4.2.7. DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsansatz wurde in 20 µl Restriktionspuffer (NEB) durchgeführt. Es wurden 1-5 U Restriktionsenzym (NEB) pro µg DNA eingesetzt. Die DNA-Menge variierte, je nachdem ob der Ansatz präparativen oder analytischen Zwecken diene, betrug aber mindestens 0,1 µg. Der Ansatz wurde 1 bis 3 h bei 37 °C inkubiert.

Restriktionspuffer: Ist für jedes Enzym spezifisch, wird mit dem Enzym mitgeliefert.

4.2.8. DNA-Ligation

Die Ligation wurde in einem Volumen von 10 µl und unter Verwendung von 1 Unit T4-DNA-Ligase (NEB) durchgeführt. Die zu ligierenden Fragmente wurden im Verhältnis von 1:1 bis 1:10 zugunsten des kleineren Fragments gemischt, von der Mischung wurden je 50-150 ng DNA pro Ligationsansatz eingesetzt.

Die Ligationsansätze wurden 3 –5 h bei 16 °C inkubiert.

4.2.9. Sequenzierung von DNA:

Für die Durchführung der Sequenzierungsreaktion wurde der Big Dye Kit (Perkin Elmer) verwendet. Je 3,2 pmol des gewünschten Primers werden mit 500 ng der zu sequenzierenden DNA und 3 µl Big Dye Mix des Big Dye Kits (Perkin Elmer) gemischt und ad 10 µl mit Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden in einem Thermocycler (MWG Biotech) dem unten angegebenen Profil unterworfen.

Nach Ablauf des Programms wurden die Proben in normale 1,5 ml- Eppendorfgefäße umpipettiert und an die Firma GATC geschickt. Unter <http://www.GATC.de> wurde dann der Auftrag zur Auswertung der Proben aufgegeben. Das Ergebnis der Analyse wurde von GATC per E-Mail zugestellt.

Sequenzierungsansatz:

3,2 pmol	Primer
500 ng	DNA
3 µl	Big Dye-Mix (keine Herstellerangaben)
ad 10 µl	H ₂ O

Sequenzierungsprofil:

- 1) 4 °C, 10 s
- 2) auf 96 °C mit 1 °C/s
- 3) 96 °C, 30 s
- 4) auf 50 °C mit 1 °C/s
- 5) 50 °C, 15 s
- 6) auf 60 °C mit 1 °C/s
- 7) 60 °C, 4 min
- 8) weiter mit 2), 25 Wiederholungen
- 9) 4 °C, ∞ min

4.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Arnheim und Ehrlich (1992)

Eine PCR amplifiziert *in vitro* ein DNA-Fragment das zwischen den Bindungsstellen eines spezifischen Primerpaares auf einer „Vorlage-DNA“ liegt.

Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl Taq- bzw. Pfu-Polymerasepuffer (PEQLAB) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 100 bis 500 ng DNA-Template mit je 10 nmol der vier dNTP, je 50 pmol der entsprechenden Primer und 1 U Taq- bzw. Pfu-Polymerase (PEQLAB) gemischt.

Die Reaktionsansätze wurden in einem Thermocycler (MWG Biotech) einem Temperaturprogramm mit dem angegebenen Profil unterworfen.

Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

PCR-Temperaturprofil:

- 1) 94 °C, 2 min (Denaturierung der DNA-Stränge)
- 2) 94 °C, 30 s (Denaturierung der DNA-Stränge)
- 3) 50 °C, 60 s (Anlagerung der Primer)
- 4) 72 °C, 90 s (Elongation)
- 5) weiter mit 2), 25 Wiederholungen
- 6) 4 °C, ∞ min

4.2.11. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die Agarosekonzentration der Gele schwankte je nach Länge der aufzutrennenden Fragmente, in den meisten Fällen (Fragmentgröße 0,6 - 10 kB) waren 0,8 % Agarose in 1 x TAE geeignet. Der erhitzten Agaroselösung wurde kurz vor dem Gießen des Gels 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Von der DNA in Probenpuffer wurden höchstens 0,5 µg pro erwarteter Bande aufgetragen. Die angelegte Spannung variierte je nach Geldicke und Agarosekonzentration, betrug jedoch maximal 5 V/cm. Die Dauer der Elektrophorese war jeweils stark von dem eigenen Ermessen, Spannung und Größe/Größenunterschied der DNA-Fragmente abhängig und variierte von 15 min bis 45 min.

Die DNA-Banden konnten schließlich durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht ($\lambda = 302$ nm) sichtbar gemacht und bei Bedarf aus dem Gel ausgeschnitten werden.

1x TAE: 40 mM Tris/Acetat, pH 8,5
2 mM EDTA

5x Probenpuffer: 30 % (w/v) Glycerin
0.25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF

4.2.12. DNA-Elution aus Agarosegelen

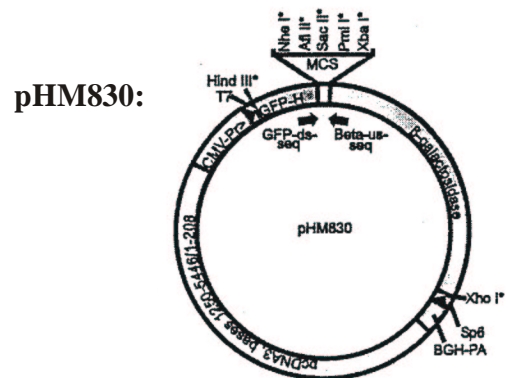
Die DNA-Elution aus Agarosegelen erfolgte mittels E.Z.N.A-Gel Extraktion Kit (PEQLAB). Die Bande wird unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und das Volumen des Gelstückes über dessen Gewicht bestimmt, wobei eine Geldichte von 1 g/ml angenommen wird. Danach wurden 4 Volumen Bindepuffer (bei Fragmenten < 100 bp 6 Volumen Bindepuffer, bei Fragmenten < 500 bp zusätzlich 1 Volumen Isopropanol) hinzugegeben und die Mischung 7 min bei 55 °C inkubiert. Nach vollständiger Auflösung des Gelstückes wurde die Lösung auf eine HiBind-Zentrifugensäule gegeben und 1 min bei 10.000 x g und RT zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten mit 750 µl Waschpuffer wurde die DNA mit 50µl deionisiertem Wasser durch 1 min Zentrifugation bei 10.000 x g und RT eluiert.

Alle verwendeten Lösungen stammten von PEQLAB. Die genaue Zusammensetzung der Puffer wurde vom Hersteller nicht angegeben.

4.2.13. Herstellung der Vektoren

Expressionsvektoren:

Bei den verwendeten Expressionsvektoren handelt es sich ausnahmslos um Abwandlungen des Vektors pHM830 (Sorg & Stamminger 1999), der mir von T. Stamminger freundlicherweise zur Verfügung gestellt und von mir für meine Zwecke modifiziert wurde. Bei der in dem Vektor enthaltenen GFP-cDNA handelt es sich um die von S. Zolothukhin „humanisierte“ Form GFP_h (Zolothukhin et al., 1996).



MCS:

Spacer	Nhe I	Afl II	Sac II	Pml I	Xba I	Spacer
GCTAGGCCC.GGG.CCC	GCTAGG.GGC	CTT.AAG.GGC	CCG.CGG.GGC	CAC.GTC.GGC	TCT.AGA	GGG.CCC.GGG.CCT.AGA
A R P G P	A S G L K G P R G H V G S R G P G P R					

Die benötigten PKC α -Fragmente wurden über PCR aus Vektor 4 (Wagner et al. 2000) amplifiziert, der mir von Stefan Wagner aus unserer Gruppe zur Verfügung gestellt wurde.

1) „pHM ohne STOP“:

pHM830 (Nhe I und Xba I), die komplementären Schnittstellen wurden religiert („pHM ohne MCS“). Danach wurde aus pHM830 ein 2,2 kB β -Galactosidasefragment mit bGala (5' caggatattcctgctgatgaagc 3') und bGalb (5' ccctcagagaccgggaccttagattttgacaccagaccaactgg 3') über PCR amplifiziert, mit EcoR V und Xho I geschnitten und in den gleichfalls mit EcoR V und Xho I verdauten „pHM ohne MCS“ ligiert.

2) pHM1-93C:

„pHM ohne STOP“ + Δ PKC α (1-93) (\rightarrow GFP- β -Gal- Δ PKC α (1-93)):

Δ PKC α (1-93) wurde mittels PKC1 (5' gctctagaatggctgacgtttaccggc 3') und PKC3 (5' ccgctcgagttaaggtcccttatccgcaccgc 3') über PCR amplifiziert, mit Xba I und Xho I geschnitten und in den gleichfalls mit Xba I und Xho I verdauten „pHM ohne STOP“ ligiert.

3) pHM1-187C:

„pHM ohne STOP“ + Δ PKC α (1-187) (\rightarrow GFP- β -Gal- Δ PKC α (1-187)):

Δ PKC α (1-187) wurde mittels PKC1 (5' gctctagaatggctgacgtttaccggc 3') und PKC2 (5' ccgctcgagttaatccatagggattagatttttgc 3') über PCR amplifiziert, mit Xba I und Xho I geschnitten und in den gleichfalls mit Xba I und Xho I verdauten „pHM ohne STOP“ ligiert.

4) pHM93-187C:

„pHM ohne STOP“ + Δ PKC α (93-187) (\rightarrow GFP- β -Gal- Δ PKC α (93-187)):

Δ PKC α (93-187) wurde mittels PKC4 (5' gctctagagacactgatgaccccaag 3') und PKC2 (5' ccgctcgagttaatccatagggattagatttttgc 3') über PCR amplifiziert, mit Xba I und Xho I geschnitten und in den gleichfalls mit Xba I und Xho I verdauten „pHM ohne STOP“ ligiert.

5) pHM-N:

GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggcccgccgcccaccatgagcaag 3') und GFP2 (5' gtgtaccgtacctgctcgacatgttcggcccgagatctcg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Xba I und Hind III geschnitten und in den gleichfalls mit Xba I und Hind III verdauten pHM830 ligiert.

6) pHM1-93N:

„pHM-N“ + Δ PKC α (1-93) (\rightarrow Δ PKC α (1-93)-GFP- β -Gal- Δ PKC α (1-93)):
 Δ PKC α (1-93) wurde mittels PKC1b (5' cccaagcttatggctgacgtttaccggc 3') und PKC3b (5' cccgctagcaggtcccttatccgcaccg 3') über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Hind III geschnitten und in den gleichfalls mit Nhe I und Hind III verdauten pHM-N ligiert.

7) pHM1-187N

„pHM-N“ + Δ PKC α (1-187) (\rightarrow Δ PKC α (1-187)-GFP- β -Gal- Δ PKC α (1-187)):
 Δ PKC α (1-187) wurde mittels PKC1b (5' cccaagcttatggctgacgtttaccggc 3') und PKC2b (5' cccgctagcatccatagggattagatttttgc 3') über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Hind III geschnitten und in den gleichfalls mit Nhe I und Hind III verdauten pHM-N ligiert.

8) pHM93-187N:

„pHM-N“ + Δ PKC α (93-187) (\rightarrow Δ PKC α (93-187)-GFP- β -Gal- Δ PKC α (93-187)):
 Δ PKC α (93-187) wurde mittels PKC4b (5' cccaagcttatggacactgatgacccccagaag 3') und PKC2b (5' cccgctagcatccatagggattagatttttgc 3') über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Hind III geschnitten und in den gleichfalls mit Nhe I und Hind III verdauten pHM-N ligiert.

9) pHM1-93CMono: (\rightarrow GFP- Δ PKC α (1-93)):

GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgtagcggccccggggccgccaccatgagcaag 3') und GFP2 (5' gtgtaccgtacctgctcgacatgttcggccccgagatctcg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Xba I und Hind III geschnitten und in pHM1-93C (Xba I und Hind III) ligiert.

10) pHM1-187CMono: (\rightarrow GFP- Δ PKC α (1-187)):

GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgtagcggccccggggccgccaccatgagcaag 3') und GFP2 (5' gtgtaccgtacctgctcgacatgttcggccccgagatctcg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Xba I und Hind III geschnitten und in pHM1-187C (Xba I und Hind III) ligiert.

- 11) pHM93-187CMono:** (\rightarrow GFP- Δ PKC α (93-187)):
 GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2 (5' gtgtaccgtacctgctcgacatgttcggccccgagatctcg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Xba I und Hind III geschnitten und in pHM93-187C (Xba I undHind III) ligiert.
- 12) pHM1-93CDi:** (\rightarrow GFP-GFP- Δ PKC α (1-93)):
 GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2 (5' gtgtaccgtacctgctcgacatgttcggccccgagatctcg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Xba I und Hind III geschnitten und in pHM1-93CMono (Nhe I undHind III) ligiert
- 13) pHM1-187CDi:** (\rightarrow GFP-GFP- Δ PKC α (1-187)):
 GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2 (5' gtgtaccgtacctgctcgacatgttcggccccgagatctcg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Xba I und Hind III geschnitten und in pHM1-187CMono (Nhe I undHind III) ligiert.
- 14) pHM93-187CDi:** (\rightarrow GFP-GFP- Δ PKC α (93-187)):
 GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2 (5' gtgtaccgtacctgctcgacatgttcggccccgagatctcg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Xba I und Hind III geschnitten und in pHM93-187CMono (Nhe I undHind III) ligiert.
- 15) pHM1-93NMono:** (\rightarrow PKC α (1-93) -GFP):
 GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2b (5' ggctcgaggccttatctagagccctgtacagctcgtccatgcatgtg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Xho I geschnitten und in pHM1-93N (Xba I und Xho I) ligiert.
- 16) pHM1-187NMono:** (\rightarrow PKC α (1-187) -GFP):
 GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2b (5' ggctcgaggccttatctagagccctgtacagctcgtccatgcatgtg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Xho I geschnitten und in pHM1-187N (Xba I und Xho I) ligiert.

17) pHM93-187NMono: (\rightarrow PKC α (93–187) -GFP):

GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2b (5' ggcctcgaggccttatctagagccctgtacagctcgtccatgcatgtg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Xho I geschnitten und in pHM93-187N (Xba I und Xho I) ligiert.

18) pHM1-93NDi: (\rightarrow PKC α (1–93) -GFP-GFP):

GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2b (5' ggcctcgaggccttatctagagccctgtacagctcgtccatgcatgtg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Xho I geschnitten und in pHM1-93NMono (Xba I und Xho I) ligiert.

19) pHM1-187NDi: (\rightarrow PKC α (1–187) -GFP-GFP):

GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2b (5' ggcctcgaggccttatctagagccctgtacagctcgtccatgcatgtg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Xho I geschnitten und in pHM1-187NMono (Xba I und Xho I) ligiert.

20) pHM93-187NDi: (\rightarrow PKC α (93–187) -GFP-GFP):

GFP mittels GFP1 (5' gggaagcttggcgctagcggccccgcccggccaccatgagcaag 3') und GFP2b (5' ggcctcgaggccttatctagagccctgtacagctcgtccatgcatgtg 3') aus pHM830 über PCR amplifiziert, mit Nhe I und Xho I geschnitten und in pHM93-187NMono (Xba I und Xho I) ligiert.

Baculotransfervektoren:

21) pAcGHLT-A (Pharming) + PKC α (\rightarrow GST-His-PKC α):

pAcSGHLT-A (Not I/Sma I) + PKC α (Eag I/Stu I)

Dieser Vektor wurde zunächst von Stefan Wagner in unserer Gruppe hergestellt (Wagner S, 1999) und von mir nach seiner Vorschrift erneut synthetisiert.

4.3. Zellkultur

4.3.1. Sf9-Zellen

Die *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) Insektenzellen wurden verwendet, um mit dem Baculovirus-Expressionssystem (GibcoBRL) GST-PKC α zu exprimieren.

Die verwendeten Zellen wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe G. Schultz (Inst. f. Pharmakologie, FU Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie ist klonal aus der IPLBSF21-AE(Sf21)-Zelllinie hervorgegangen (O'Reilly et al. 1992). Sowohl die Sf21, als auch die Sf9-Zelllinie stammten aus dem Ovariumgewebe der Puppe des „fall army worm“ (O'Reilly et al. 1992; Vaughn et al. 1977).

Die Sf9 Zellen können sowohl in Monolayer-, als auch in Schüttelkultur kultiviert werden. Beim Passagieren konfluenter Monolayerkulturen wurden die Zellen mechanisch von der Zellkulturflasche abgeschabt, 3 min bei 500 x g zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Ein 20 μ l-Aliquot der Suspension diente der Bestimmung der Zellzahl mittels Haematocytometer nachdem es mit 20 μ l Trypanblau versetzt wurde, um geschädigte Zellen anzufärben. Die Zellen wurden in der gewünschten Verdünnung wieder ausgesät oder in Suspensionskultur überführt, deren Zelldichte gewöhnlich $0,5 \times 10^6$ /ml betrug. Da die Verdopplungszeit von gesunden Sf9-Insektenzellen in Schüttelkultur nur 24 h beträgt, wurde die Zelldichte alle zwei bis drei Tage kontrolliert. Sobald diese $2,5 \times 10^6$ /ml überstieg, wurden die Zellen durch Zugabe frischen Mediums auf $0,5 \times 10^6$ /ml verdünnt.

Sf9-Medium: SF-900 II Medium with L Glutamine (GibcoBRL)
10 % FCS (Life Technologies)
100 μ g/ml Penicillin (Life Technologies)
100 μ g/ml Streptomycin (Life Technologies)

4.3.2. Transfektion von Sf9-Zellen

Alle Transfektionsschritte müssen unter sterilen Bedingungen erfolgen. In einer 6-Loch-Platte wurden 10^6 Zellen pro Loch in je 2 ml Medium (x 0,5) ausgesät. Während 1 h Inkubation bei 27 °C setzten sich die Zellen auf dem Plattenboden ab. Währenddessen wurde ein 100 μ l-Aliquot antibiotikafreies Medium mit 10 μ l der gewünschten Bacmid-DNA, ein weiteres 100 μ l-Aliquot mit 10 μ l Insectin(Invitrogen) versetzt. Die beiden Lösungen wurden gemischt und die Mischung 45 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit antibiotikafreiem Medium gewaschen und weitere 800 μ l des Mediums zu der DNA-Lipid-Komplexlösung hinzugegeben. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen mit der DNA-haltigen Transfektionslösung

überschichtet und 5 h bei 27 °C darin inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium entfernt und durch frisches Medium mit den unter 4.3.1 angegebenen Mengen an FCS und Antibiotika ersetzt.

Nach einer Inkubation von 5 Tagen konnte der virushaltige Überstand abgenommen und bei 4 °C mehrere Monate gelagert werden.

Medium (x 0,5): SF-900 II Medium with L Glutamine (GibcoBRL)

50 µg/ml Penicillin (Life Technologies)

50 µg/ml Streptomycin (Life Technologies)

4.3.3. Bestimmung des Virustiters

Der Virustiter wurde unter Verwendung des BacPAK™ Bakulovirus Titer Kit (Clontech) bestimmt.

In 10-Löcher einer 96-Loch-Platte wurden pro Loch $6,5 \times 10^4$ Sf9-Zellen ausgesät, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. Während 1 h Inkubation bei 27 °C setzten sich die Zellen auf dem Plattenboden ab. Währenddessen wurden drei verschiedene Verdünnungen der virushaltigen Lösungen (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) angesetzt.

Das Medium wurde von den Zellen entfernt und je drei Löcher mit je 25 µl der drei Verdünnungen, eines mit 25 µl Medium versetzt. Nach 1 h wurden die Infektionslösungen entfernt und die Zellen mit je 50 µl Methyl Cellulose Overlay (Clontech) überschichtet und 48 h bei 27 °C inkubiert.

Es werden pro Loch 150 µl Acetonpuffer hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Lösungen entfernt und die Zellen 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 50 µl Normal Goat Serum pro Loch überschichtet und 5 min bei RT inkubiert.

Das Serum wurde entfernt, 25 µl gp64-Antikörperlösung pro Loch hinzugegeben und 25 min bei RT inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurden die Zellen 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Es wurden 50 µl Antikörper/HRP-Konjugat pro Loch hinzugegeben. Nach weiteren 25 min Inkubation bei RT wurden die Zellen erneut 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Schließlich wurden pro Loch 50 µl Blue Peroxidase Substrat (Clontech) hinzugegeben. Nach drei Stunden Inkubation bei RT konnten unter einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung die blaugefärbten Infektionszentren (Foci) ausgezählt werden. Der Durchschnittswert der Foci aller Löcher gleicher Verdünnung sollte 5-25 betragen und wurde in die von Clontech angegebene Formel zur Virustiterbestimmung eingesetzt.

$Zahl\ der\ Foci \times\ Verdünnungsfaktor \times 40_{(Normalisierungsfaktor)} \times 2_{(Umrechnungsfaktor\ von\ ffu\ in\ Pfu)} = Titer\ [Pfu/ml]$

PBS:	137 mM NaCl	Acetonpuffer:	1,2 ml PBS
	2,7 mM KCl		1,0 ml 37 % Formaldehyd
	1,5 mM KH ₂ PO ₄		1,8 ml Aceton
	8 mM Na ₂ HPO ₄		

gp64-Antikörperlösung:	10 µl	gp64-Antikörper-Konzentrat (Maus) (Clontech)
	490 µl	Normal Goat Serum

Antikörper/HRP-Konjugat:	4 µl	Antikörper/HRP-Konjugat-Konzentrat (Ziege anti Maus) (Clontech)
	996 µl	Normal Goat Serum

4.3.4. Amplifikationsschritte und Expression des Fusionsproteins

Es wurden insgesamt vier Amplifikationsschritte durchgeführt, drei davon waren Monolayeramplifikationen, der letzte Schritt eine Schüttelamplifikation. Für die Amplifikationen war jeweils eine „multiplicity of infection“ (MOI) von 0,1-0,15 optimal.

1. Amplifikation:

2 x 10⁶ Sf9-Zellen wurden in 4 ml Sf9-Medium aufgenommen, in einer 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und mit 600 µl des Transfektionsüberstandes (s. 4.3.2) versetzt. Die Zellen wurden 5 Tage bei 27 °C inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde danach abgenommen, für den 2. Amplifikationsschritt eingesetzt und bei 4 °C gelagert.

2. Amplifikation:

7 x 10⁶ Sf9-Zellen wurden in 15 ml Sf9-Medium aufgenommen, in einer 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und mit 1ml Überstand der 1. Amplifikation versetzt. Die Zellen wurden 24 h bei 27 °C inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde danach für den 3. Amplifikationsschritt eingesetzt, bzw. bei 4 °C gelagert.

3. Amplifikation:

14 x 10⁶ Sf9-Zellen wurden in 35 ml Sf9-Medium aufgenommen, in einer 150 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und mit 0,1 ml Überstand der 2. Amplifikation versetzt. Die Zellen wurden 4 Tage bei 27 °C inkubiert. Der virushaltige Überstand wurde danach für die Schüttelamplifikation eingesetzt, bzw. bei 4 °C gelagert.

Schüttelamplifikation:

Eine Schüttelkultur von Sf9-Zellen wurde von einer Dichte von $2-2,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf eine Dichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Nach etwa 1-2 Tagen sollte die Schüttelkultur wieder eine Dichte von $0,45-0,55 \times 10^6$ Zellen/ml erreicht haben. Mit dem Überstand der 3. Amplifikation wurde dann eine MOI von 0,15 eingestellt. Nach einer viertägigen Inkubation bei 27 °C und 100 rpm/min wurden die Zellen 15 min bei $8000 \times g$ und 4 °C abzentrifugiert und der Virustiter des Überstands bestimmt. Der Überstand der Schüttelamplifikation wurde bei 4 °C gelagert und für die Expressionsansätze verwendet.

Expression des Fusionsproteins:

Eine Zellkultur hoher Dichte ($2,0-2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurde mit dem Überstand der Schüttelamplifikation versetzt (MOI = 10). Nach drei Tagen konnte das Protein isoliert und aufgereinigt werden.

Sf9-Medium: SF-900 II Medium with L Glutamine (GibcoBRL)
10 % FCS (Life Technologies)
100 µg/ml Penicillin (Life Technologies)
100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies)

4.3.5. Isolierung und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins

Die Zellen des Expressionsansatzes wurden 10 min bei $8000 \times g$ abzentrifugiert und in 5-10 ml Homogenisationspuffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall oder einem Dounce-Homogenisator aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch 20 min Ultrazentrifugation bei $100.000 \times g$ und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde auf eine mit 4 Volumen Homogenisationspuffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose-Säule (Pharmacia) oder eine Glutathion-Agarose-Säule (Clontech) gegeben. Es wurden je 1 ml Sepharose bzw. Agarose pro 20 ml Homogenat eingesetzt. Nachdem die Säulen mit 4 Volumen Homogenisationspuffer gewaschen wurden, wurde das Fusionsprotein mit Elutionspuffer in 1,5 ml-Aliquots eluiert. Die Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C aufbewahrt.

Die Säule wurde anschließend mit den angegebenen Puffern regeneriert.

Homogenisationspuffer:	140 mM NaCl, pH 7,5	Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	10 mM Na ₂ HPO ₄		10 mM Glutathion
	1,8 mM KH ₂ PO ₄		

1 Regenerationspuffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5
0,5 M NaCl

2. Regenerationspuffer: 0,1 M Natriumacetat, pH 4,5
0,5 M NaCl

Regenerationspuffer: 140 mM NaCl, pH 7,5
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄

4.3.6. Säugerzellen

Die verwendeten NIH3T3-Zellen stammten von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ) in Braunschweig. Die N2a- Zellen wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe G. Schultz zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in dem entsprechenden Medium bei 5% CO₂ und 37 °C kultiviert.

Die Zellen wurden beim Passagieren kurz mit PBS (s 4.3.3) gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA vom Untergrund gelöst. Danach wurde die Zellsuspension zur Inaktivierung des Trypsins mit der gleichen Menge Medium versetzt und die Zellen 4 min bei 500 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend sorgfältig resuspendiert und 3-4fach verdünnt wieder ausgesät.

3T3-Medium:

DMEM mit 1,0 g/l Glucose (Gibco)

10 % FCS

100 µg/ml Penicillin (Life Technologies)

100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies)

N2a-Medium:

DMEM mit 4,5 g/l Glucose (Gibco)

10 % FCS

100 µg/ml Penicillin (Life Technologies)

100 µg/ml Streptomycin (Life Technologies)

4.3.7. Transfektion von Säugerzellen

Die Transfektion der Säugerzellen wurde mit dem Lipofetamine PLUS-System (Life Technologies) durchgeführt. Die angegebenen Mengen beziehen sich jeweils auf ein Loch einer 12-Loch-Platte und stellen die Werte dar, mit denen ich optimale Ergebnisse erzielen konnte.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion so dicht auf runden Deckgläschen in einer 12-Loch-Platte ausgesät, daß sie am nächsten Tag einen zu 50-60 % konfluenten Zellrasen bildeten.

Zur Transfektion wurden dann 50 µl serumfreies Medium (s. 4.3.6) mit 0,7 µg Plasmid-DNA und 5 µl PLUS-Reagenz versetzt. Die Mischung wurde kurz gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde ein weiteres 50 µl-Aliquot serumfreien Mediums mit 2 µl Lipofektamine versetzt, ebenfalls gevortext und zu der DNA-Lösung hinzugegeben. Während der nun folgenden Inkubation von 15 min, bei der sich die DNA-Reagenzkomplexe bilden sollen, wurden die Zellen gründlich mit PBS (4.3.3) gewaschen und anschließend mit 400 µl serumfreien Mediums bedeckt.

Die komplexierte DNA wurde nun tropfenweise hinzugegeben und die Zellen danach 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden zu dem Transfektionsüberstand 500 µl Medium mit 10 % FCS hinzugefügt.

Die Zellen wurden mindestens 24 h bei 37 °C inkubiert und dann mikroskopisch analysiert.

4.3.8. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde insbesondere zum Studium der subzellulären Verteilung der GFP-Fusionsproteine in Säugerzellen eingesetzt, die zuvor mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert worden waren.

24 h nach der Transfektion erfolgte, sofern gewünscht, die Stimulation der Zellen mit 160 nM PMA für 10 min bei 37 °C. Danach wurden die Zellen gründlich mit 4 °C-kaltem PBS (s. 4.3.3) gewaschen und mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS 20 min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS und anschließend, zur Entfernung von Salzresten, einmal mit deionisiertem Wasser gewaschen. Die Glasplättchen wurden daraufhin der 12-Loch-Platte entnommen und mit der zelltragenden Seite nach unten auf Objektträgern in Fluoromount (Serva) eingebettet. Das Harz härtete über Nacht bei 4 °C unter Lichtausschluß aus. Danach wurde das Präparat unter einem Inversionsmikroskop (Leitz, DMIRB) bei 1000facher Vergrößerung analysiert. Die fotografischen Aufnahmen zur Dokumentation der Ergebnisse erfolgten in der AG R. Menzel an einem konfokalen Laser scanning Mikroskop (Leica, TCS 4D).

4.3.9. Subzelluläre Fraktionierung: Kernpräparation

Die Zellkerne aus N2a-Zellen wurden nach der von Emig et al. (1995) beschriebenen Methode präpariert.

Dabei wurden die Zellen von 12-24 154 cm²-Zellkulturschalen 2 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in PBS abgeschabt, bei 500 x g und 4 °C 5 min abzentrifugiert und in eiskaltem STM 0,25 resuspendiert. Die folgenden Schritte erfolgten ebenfalls

alle unter Eiskühlung oder bei 4 °C. Nach der Zugabe einer 10% Nonidet P-40 (NP-40)-Lösung bis zu einer finalen Konzentration von 0,025 % wurden die Zellen mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Durch Zugabe der entsprechenden Menge STM 2,1 wurde das Homogenat auf 1,4 M Sucrose eingestellt. In Zentrifugenröhrchen geeigneter Größe wurde nun folgender Stufengradient geschichtet: Ein 1-2 ml STM 2,1 Sucrosekissen wurde mit STM 1,4-Homogenat überschichtet, das wiederum mit mindestens 3 ml STM 0,25 überschichtet wurde. Die Proben wurden in einem Ausschwingrotor 65 min bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert.

Die Pellets, die die Zellkerne enthalten, wurden in einem kleinen Volumen, gewöhnlich 100-200 µl/Pellet, resuspendiert. Die N2a-Kerne wurden vorzugsweise umgehend weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

STM 0,25:	50 mM	Tris/HCl, pH 7,4	STM 2,1:	50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	0,25 M	Sucrose		2,1 M	Sucrose
	5 mM	MgSO ₄		5 mM	MgSO ₄
	2 mM	DTT		2 mM	DTT
	10 µg/ml	Leupeptin		10 µg/ml	Leupeptin
	1 mM	PMSF		1 mM	PMSF

4.3.10. Präparation von Kernmembranen und Nucleoplasma

Die Kernmembranen wurden nach einer modifizierten Methode von Otto et al. (1992) präpariert.

Dabei wurden 2,8-3,9 mg Zellkerne von N2a-Zellen in 24 ml eiskaltem TP-Puffer resuspendiert, der 7,2 mg Heparin und 440 µg DNase I (ca. 866 Units) enthält.

Die Suspension wurde 60 min bei 4 °C und anschließend weitere 15 min bei RT gerührt. Die Suspension wurde danach 60 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der das „Nucleoplasma“ darstellte, wurde abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Das aus Kernmembran bestehende Pellet wurde einmal vorsichtig mit STM 0,25 (s. 4.3.9) gewaschen und dann in einem kleinen Volumen STM 0,25 resuspendiert. Sowohl die Kernmembran, als das Nucleoplasma wurden nach einer Proteinbestimmung nach Bradford, sofern sie nicht umgehend weiterverarbeitet wurden, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

Eine typische Kernmembranpräparation ergibt etwa 6-9 % Membran, bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Menge N2a-Kerne.

TP-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0
10 mM Na₂HPO₄
1 mM PMSF
10 µg/ml Aprotinin
10 µg/ml Leupeptin

4.3.11. Tritonextraktion von Kernmembranen

Die Tritonextraktion von Kernmembranen dient der Anreicherung von Kernporenkomplexen und Proteinen der inneren Kernmembran und wurde nach der von Dreger et al. (2001) beschriebenen Methode durchgeführt. Alle beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Die Kernhüllen in STM 0,25 (s. 4.3.9) wurden auf 0,5% Triton X 100 eingestellt. Danach wurden die Proben 15 min gut geschüttelt und anschließend 15 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in STM 0,25 resuspendiert und umgehend weiterverarbeitet.