

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Hersteller und Lieferanten

Amersham Biosciences, U.K.
 Applichem, Darmstadt
 Beckmann, München
 Bio 101, Carlsbad, Kanada
 Biochrom, Berlin
 Biometra, Göttingen
 BioMol, Hamburg
 BioRad, München
 Biotez, Berlin
 Boehringer, Mannheim
 Calbiochem, San Diego, USA
 Fermentas, St. Leon-Rot
 Genomed, Löhne
 Gibco BRL, Eggenstein
 Henklein, Dr. P., Charité Berlin
 ICN Biomedicals, Irvine, USA
 Invitrogen, San Diego, USA

J.T. Baker, Deventer, Niederlande
 Kodak, New Haven, USA
 Merck, Darmstadt
 NewEnglandBiolabs, Schwalbach
 Perkin Elmer, Wellesley, USA
 Pharmacia, Freiburg
 Pierce Biotechnology, Rockford, USA
 Promega, Mannheim
 Qiagen, Hilden
 Roche, Mannheim
 Roth, Karlsruhe
 Santa Cruz, Heidelberg
 Serva, Heidelberg
 Sigma-Aldrich, Deisenhofen
 Stratagene, La Jolla, USA
 Whatman, Maidstone, USA
 Zinsser Analytic, Frankfurt

3.1.2 Chemikalien

Aceton	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid 30% (29:1)	Roth
Acrylamid/Bisacrylamid 30% (37,5:1)	Roth
Agarose	ICN Biomedicals
Albumin Standard	Pierce
Aluminiumchlorid	Merck
Amidoschwarz 10B	Serva
Aprotinin	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Blue Dextran	Perkin Elmer
Borsäure	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau Natriumsalz	Serva
Calciumchlorid	Merck
Chloramphenicol	Roth
Chloroform	Applichem
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-Propansulfonsäure (CHAPS)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Stratagene
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
<i>ECL Western Blotting Detection Reagents</i>	Amersham Biosciences
Essigsäure	Applichem
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Ethylenglycol	Merck
Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Serva
Ficoll 400	Amersham Biosciences
Forskolin	Calbiochem, ICN
Glucagon	Sigma
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth

Harnstoff	Roth
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (Hepes)	Roth
Imidazol	Sigma
Isopropanol	J.T. Baker
Isoproterenol	Sigma
Isoamylalkohol	Roth
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumacetat	Applichem
Leupeptin Hemisulfatsalz	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid-Tetrahydrat	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Applichem
PBS Dulbecco	Biochrom
Pepstatin A	Sigma
Phenol	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphoenolpyruvat Monokaliumsalz	Boehringer
Pipes	Roth
Polyoxyethylen 10 Laurylether (C ₁₂ E ₁₀)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Ro-20-1724	Calbiochem
RotiBlock	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Salzsäure	Roth
Sojabohnen-Trypsininhibitor (Typ II <i>Lima Bean</i>)	Sigma
Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 800 Plus	Zinsser Analytic
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Trichloressigsäure	Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth
Tween 20	Sigma

3.1.3 Enzyme, Proteine und Kitsysteme

Calmodulin	Calbiochem
Ca ²⁺ /Calmodulin Kinase II	Calbiochem
Lysozym	Sigma
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene
<i>Pfu</i> Turbo C _x Hotstart DNA-Polymerase	Stratagene
Pyruvat Kinase	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNase (DNase frei)	Applichem
<i>Taq</i> Polymerase	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Gibco BRL
<i>Bac-to-Bac Baculovirus Expression System</i>	Gibco BRL
<i>DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	Amersham Biosciences
<i>Jetsorb Gel Extraction Kit</i>	Genomed
<i>Qiagen Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen
<i>SignaTECT Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Assay System</i>	Promega

3.1.4 Peptide

pAC28 (IKPAKRMKFKTVCYLLVQLMHCRCMKFKA) Henklein, Dr.P.
 pVLG (TEEVHRLRRGSYRFVCRGKV) und pAAG (TEEAHRLARRGSYRFVCRGKV) wurden
 freundlicherweise von Dr. M. Beyermann, Forschungsinstitut Molekulare Pharmakologie Berlin, synthetisiert und zur
 Verfügung gestellt.
 pTT (TQPKTDHAHCCVEMGLDMIDT) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Schneider-
 Mergener, Charité Berlin, synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

3.1.5 Antikörper

Primärantikörper

anti-MYC, 9E10 (Epitop: EQKLISEEDL)	Santa Cruz
anti-HA, 12CA5 (Epitop: YPYDVPDYA)	Roche
anti-ACII (C20), sc-587	Santa Cruz
anti-ACIII (C20), sc-588	Santa Cruz

Sekundärantikörper

Ziege-anti-Maus-IgG	Sigma
Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Sigma

3.1.6 Vektoren und Konstrukte

pGem-T Easy	Promega
pBSK (pBlueskript SK)	Stratagene
pFastBac1	Gibco BRL

Folgende Baculoviren und DNA-Konstrukte wurden freundlicherweise von Prof. Dr. A. Gilman, Dallas, Dr. C. Kleuss, Berlin, und Dr. S. Weitmann, Berlin, zur Verfügung gestellt:

Baculoviren:

Baculovirus G β ₁	G β ₁ (<i>accession</i> M13236), Wildtyp
Baculovirus G γ ₂	G γ ₂ (<i>accession</i> K02199), N-terminal Hexahistidin-Epitop
Baculovirus IM1C1	ACI (<i>accession</i> P19754), AS 2-570, N-terminal MYC-Epitop
Baculovirus IM2C2	ACI (<i>accession</i> P19754), AS 571-1134, C-terminal HA-Epitop
Baculovirus IIM2C2	ACII (<i>accession</i> P26769), AS 556-1090, C-terminal HA-Epitop
Baculovirus VM1C1	ACV (<i>accession</i> P30803), AS 2-641, N-terminal MYC-Epitop

DNA-Konstrukte:

ACI cDNA pBSK	ACI (<i>accession</i> P19754)
ACII cDNA pBSK	ACII (<i>accession</i> P26769)
ACIII cDNA pBSK	ACIII (<i>accession</i> M55075)
IM1C1 pBSK	ACI (<i>accession</i> P19754), AS 2-570, N-terminal MYC-Epitop
IM2C2 pBSK	ACI (<i>accession</i> P19754), AS 571-1134, C-terminal HA-Epitop
IIM1C1 pBSK	ACII (<i>accession</i> P26769), AS 2-555, N-terminal MYC-Epitop
IIM2C2 pBSK	ACII (<i>accession</i> P26769), AS 556-1090, C-terminal HA-Epitop

3.1.7 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex synthetisiert.

Oligonukleotide für die Konstruktion von AC-Chimären (3.2.7.2):

ACII.IC1b:

5'-Fragment:

forward 5'-GCCATGCATGAGAATTAATAATTTTGTAG-3'

reverse 5'-GCACGTCTCATCTTTCCCTTGGGATTGATTAC-3'

3'-Fragment:

forward 5'-GCACGTCTCACCACGAAAGGATGATCCAAGCAATTG-3'

reverse 5'-CACCTCAGGAAAACGGAGC-3'

I-Kassette:

forward 5'-GCACGTCTCTAAGATAATTTCCAGGGCTGATTC-3'

reverse 5'-GCACGTCTCAGTGGTACTTTTCGCTCTCGC-3'

ACIII.IIC1b

5'-Fragment:

forward 5' - GCCGGTACCCTACCTGCTGTGG-3'*reverse* 5' - GCACGTCTCAGCTCTGGCTTGGAGGCAATGATG-3'

3'-Fragment:

forward 5' - GCACGTCTCAGAATTTTCAGCTGTTCTTCTGTGTGGTC-3'*reverse* 5' - GTTGGTGACCAAGGCCTCGTTC-3'

II-Kassette:

forward 5' - GCACGTCTCTGAGCGACGGAGTCCTCAG-3'*reverse* 5' - GCACGTCTCAATTCAGTTCTTCTTCAAATCTC-3'ACII.IC2

5'-Fragment:

forward 5' - GTTTTCCTGAGGGTGAACCTATGAG-3'*reverse* 5' - GCAACTACGTCTCATGTCTGCCCAGAACCAGCAGC-3'

I-Kassette:

forward 5' - CGAAAGCTTCCACTAAGCCTCCTTCCCAGAG-3'*reverse* 5' - GCACGTCTCTGACAGGTGGATGTCAAGCTGCG-3'ACI.IIC2

5'-Fragment:

forward 5' - GCCGTCTCTCCGGGTCCAGTGTTCCTCCAGG-3'*reverse* 5' - GCCGTCTCTCTGCCGGCGTGCAGGGC-3'

II-Kassette:

forward 5' - GCCGTCTCAGCAGAGTGAATATTACTGTAGGTTAG-3'*reverse* 5' - CCAAGCTTATTCAGGATGCCAAGTTGCTCTG-3'**Oligonukleotide für die Konstruktion von AC-Deletionsmutanten (3.2.7.3):**ACI.1094:*forward* 5' - CTACACATCACCCGGGTCCAGTG-3'*reverse* 5' - CGAAAGCTTAGGGGTGACCCGC-3'ACI.1057:*forward* 5' - CTACACATCACCCGGGTCCAGTG-3'*reverse* 5' - CGAAAGCTTAGAAGTATGTCAGCATC-3'**Oligonukleotide für die Konstruktion von NAAIRS- oder AA-Mutagenese-Matrizen (3.2.7.4):**C1b-Vorkonstrukt der ACII:*forward* 5' - GCCATGCATGAGAATTAATAATTTTAG-3'*reverse* 5' - CACCCTCAGGAAAACGGAGC-3'C2a-Vorkonstrukt der ACII:*forward* 5' - TTTCTGAGGGTGAACCTATGAG-3'*reverse* 5' - ACGAAAGCTTAGGATGCCAAG-3'C2a-Vorkonstrukt der ACI:*forward* 5' - CTACACATCACCCGGGTCCAGTG-3'*reverse* 5' - CGAAAGCTTATGCGTAGTCCGGCAC-3'**Oligonukleotide für NAAIRS-Mutagenesen:**

Die Sequenz des jeweils revers-komplementären Oligonukleotids ist nicht separat aufgeführt.

ACII.472:

5' - GGGAGAGCGACGGAGTAATGCTGCTATAACGATCGCCTCGACACACTCTG-3'

ACII.484:

5' - TCGACACACTCTGGACAATGCTGCTATAACGATCGTCTGTCCGCATGACC-3'

ACII.490:

5' - GCCAAGATGAGAGCAAATGCTGCTATAACGATCGTACTTGGAGTCCTGG-3'

ACII.496:

5' - GTCCGCATGACCCGGAATGCTGCTATAACGATCGGCAGCCAAGCCATTC-3'

ACII.503:

5' - GAGTCCTGGGGAGCAAATGCTGCTATAACGATCGCTGCACCACAGAGAT-3'

ACII.510:

5' - GCCATTCGCACATCTGAATGCTGCTATAACGATCGACCACAGAGAATGGG-3'

ACII.522:

5' - ACAGAGAATGGGAAGAATGCTGCTATAACGATCGCCAATGGGTCAACAT-3'

ACII.534:

5' - ATGGGTCAACATAATAATGCTGCTATAACGATCGAGAATAAGTCACAGAAG-3'

ACII.546:

5' - ACTAAGTCACAGAAGAATGCTGCTATAACGATCGCTGAATGAAAGGATG-3'

ACII.829:

5'- GAATATTACTGTAGGAATGCTGCTATACGATCGAACAAGTTCAAAAAA-3'

ACII.835:

5'- GACTTCTTGTGGAAGAATGCTGCTATACGATCGCGGGAGGAGATAGAA-3'

ACII.841:

5'- AAGTTCAAAAAGAGAATGCTGCTATACGATCGATGGAGAACCTAAAT-3'

ACII.847:

5'- GAGGAGATAGAAACCAATGCTGCTATACGATCGGTGCTGCTGGAGAACG-3'

ACII.853:

5'- TGGAGAACCTAAATCGAAATGCTGCTATACGATCGCTTCTGCACACGTG-3'

ACII.865:

5'- CCTGCACACGTGGCTAATGCTGCTATACGATCGAGCCTGAAAAATGAGG-3'

ACII.884:

5'- CCACCAGTCTACGACAATGCTGCTATACGATCGGCCTCCATTCCGGAC-3'

ACII.928:

5'- TGATGATCTGCTTTCTAATGCTGCTATACGATCGGTTGAAAAGATCAAG-3'

ACII.948:

5'- ACATACATGGCAGCCAATGCTGCTATACGATCGCCAGCCAGGAGCAC-3'

ACII.958:

5'- ATACCCAGCCAGGAGAATGCTGCTATACGATCGCGTCAGTACATGCAC-3'

ACII.967:

5'- CCTGAGCGTCAGTACAATGCTGCTATACGATCGGTGGAGTTGCATAT-3'

ACII.977:

5'- ATGGTGGAGTTTGCAAATGCTGCTATACGATCGCTGGATGCCATCAAT-3'

ACII.1042:

5'- GACAAAATACAGGTGAATGCTGCTATACGATCGATCTTGCAGACGCTT-3'

ACII.1054:

5'- TTGCAGACGCTTGGCAATGCTGCTATACGATCGGGTATCATCAATGTG-3'

ACII.1067:

5'- ATCAATGTGAAGGGGAATGCTGCTATACGATCGTATTTTGTAACACA-3'

ACII.1079:

5'- TTTGTAAACACAGAGAATGCTGCTATACGATCGCAGAGCAACTTGGCA-3'

Oligonukleotide für AA-Mutagenesen an der C2a-Domäne der ACII:

Die Sequenz des jeweils revers-komplementären Oligonukleotids ist nicht separat aufgeführt.

ACII.AA925:

5'-GCTGACTTTGATGATGCTGCTTCTAAGCCAAAGTTC-3'

ACII.AA927:

5'-TTTGATGATCTGCTTGCTGCTCCAAAGTTCAGTGGT-3'

ACII.AA930:

5'- CTGCTTTCTAAGCCAGCTGCTAGTGGTGTGAAAAG-3'

ACII.AA932:

5'-TCTAAGCCAAAGTTCGCTGCTGTTGAAAAGATCAAG-3'

Oligonukleotide für AA-Mutagenese an der C2a-Domäne der ACI:

Die Sequenz des jeweils revers-komplementären Oligonukleotids ist nicht separat aufgeführt.

5'-CAGGTCACAGAGGAAGCTCACCGGCTGGCTCGGCGGGTTCTAC-3'

3.1.8 Nukleotide

cAMP

GDP

ATP

dATP

dCTP

dGTP

dTTP

GTP

GTP_γS

Sigma

Boehringer

Sigma

Stratagene

Stratagene

Stratagene

Stratagene

Boehringer

Boehringer

3.1.9 Radionukleotide

[α - ³² P]ATP	Perkin Elmer
[γ - ³² P]ATP	Perkin Elmer
[³ H]cAMP	Perkin Elmer
[³⁵ S]GTP γ S	Perkin Elmer

3.1.10 Molekulargewichtstandards

1 kb DNA-Leiter <i>GeneRuler</i>	Fermentas
<i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i>	Fermentas

3.1.11 Zellen, Zellkulturmedien und Zusätze

<i>E. coli</i> DH10Bac	Gibco BRL
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene
Sf9-Zellen: Ovarialzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i>	Gibco BRL

Agar	Bio 101
(S-Gal/LB) Agar <i>Blend</i>	Sigma
Ampicillin	Sigma
Bacto-Pepton	Roth
Bacto- <i>Yeast</i> Extrakt	Roth
Bluo-Gal	BioMol
C _{ELL} FECTIN	Gibco BRL
fötales Kälberserum	Biochrom
Gentamicin	Biochrom
IPTG	Applichem
Kanamycin	Sigma
Lipid Medium Supplement	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Tetracyclin	Sigma
TNM-FH	Sigma

LB-Medium (1l): 10g Bacto-Pepton, 5g Bacto-*Yeast* Extrakt, 10g NaCl

LB-Agar (1l): LB-Medium mit 12g Agar

SOC-Medium (1l): 200g Bacto-Pepton, 50g Bacto-*Yeast* Extrakt, 5g NaCl, 25 mM KCl, 100 mM MgCl₂

SOB-Medium: SOC-Medium mit 20 mM Glucose

3.1.12 Puffer und Lösungen

AC-Reaktionspuffer: 20 mM Na-Hepes (pH 8,0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 2 mM MgCl₂

AC-ReaktionspufferPlus: 50 mM Na-Hepes (pH 8,0), 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0,01 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) C₁₂E₁₀

AC-Startpuffer: 100 mM Na-Hepes (pH 8,0), 20 mM MgCl₂, 1,2 mM EDTA, 0,02 % (w/v) BSA, 200 μ M cAMP, 200 μ M Ro 20-1724, 1 μ g Pyruvatkinase, 6 mM K-Phosphoenolpyruvat, 1 mM ATP, 2 x 10⁶ cpm [α -³²P]ATP

AC-Stopplösung: 2,5 % (w/v) SDS, 50 mM ATP, 1,75 mM cAMP

Aufbewahrungspuffer für Sf9-Membranpräparationen: 20 mM Na-Hepes (pH 8,0), 2 mM EDTA, 5 % (w/v) Sucrose, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 μ M Pepstatin, 3,2 μ g/ml Leupeptin-Proteaseinhibitor, 3,2 μ g/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor, 2 μ g/ml Aprotinin

cAMP-Elutionspuffer: 20 mM Imidazol (pH 7,5), 200 mM NaCl

Coomassie Brilliant Blue - Färbelösung: 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 30 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Coomassie Brilliant Blue - Entfärbelösung: 30 % Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

DaCaM-Puffer: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EGTA

DNA-Probenpuffer (10x): 500 μ l 50 % Ficoll 400 (in H₂O), 500 μ l TAE-Puffer, 20 μ l 2,5 % Bromphenolblau (in H₂O)

Extraktionspuffer: 20 mM Na-Hepes (pH 8,0), 0,1 mM PMSF, 1 μ M Pepstatin, 3,2 μ g/ml Leupeptin-Proteaseinhibitor, 3,2 μ g/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor, 2 μ g/ml Aprotinin, 7 mM β -Mercaptoethanol

GTE: 0,9 % (w/v) Dextrose, 25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA

GTP γ S-Mix: 50 mM Na-Hepes (pH 8,0), 1 mM EDTA, 0,1 % C₁₂E₁₀, 1 mM DTT, 10 mM MgSO₄, 400 μ M GTP γ S, 5 x 10⁶ cpm [³²S]GTP γ S

HMEDBL-Puffer: 50 mM Na-Hepes (pH 8,0), 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,01 % (w/v) BSA, 0,05 % C₁₂E₁₀

Laemmli-Probenpuffer: 48 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) SDS, 133 mM β-Mercaptoethanol, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

Lysispuffer für Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen: 200 mM NaOH, 1 % SDS

Lysispuffer für Membranpräparation von Sf9-Zellen: 20 mM Na-Hepes (pH 8,0), 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mM PMSF, 1 μM Pepstatin, 3,2 μg/ml Leupeptin-Proteaseinhibitor, 3,2 μg/ml Sojabohnen-Trypsininhibitor, 2 μg/ml Aprotinin

PBST: 12 mM Na₂HPO₄, 4 mM KH₂PO₄, 120 mM NaCl, 1 % (v/v) Tween 20

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol: Phenol (mit 100 mM Tris-HCl pH8 gesättigt)/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)

Ponceau S-Lösung: 0,2 % Ponceau S in 0,3 % Essigsäure

Puffer A: 20 mM Na-Hepes (pH 8,0), 200 mM NaCl, 0,5 % (v/v) C₁₂E₁₀, 7 mM β-Mercaptoethanol

Puffer B: 20 mM Na-Hepes (pH 8,0), 20 mM NaCl, 0,5 % (v/v) C₁₂E₁₀, 7 mM β-Mercaptoethanol

Puffer C: 20 mM Na-Hepes (pH 8,0), 200 mM Imidazol, 0,5 % (v/v) C₁₂E₁₀, 10 mM β-Mercaptoethanol

Puffer D: 20 mM Na-Hepes (pH 8,0), 0,5 % (v/v) C₁₂E₁₀, 10 mM β-Mercaptoethanol

Puffer E: 50 mM Na-Hepes (pH 8,0), 0,5 % (v/v) C₁₂E₁₀, 7 mM β-Mercaptoethanol

Puffer F: 20 mM Tris (pH 8,0), 200 mM Imidazol, 11 mM Chaps, 10 mM β-Mercaptoethanol

RNaseA: 20 μg/ml RNase (DNase-inaktiviert) in TE

<u>SDS-Polyacrylamidgele:</u>	<u>Trenngel</u>	<u>Sammelgel</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %, 37,5:1)	10-13 %	5 %
Tris-HCl	500 mM, pH 8,6	95 mM, pH 6,8
SDS	0,1 %	0,15 %
TEMED	0,05 %	0,1 %
APS	0,05 %	0,06 %

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Base, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8,5)

TB-Lösung: 10 mM Pipes, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂ (pH 6,7)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA

Transferpuffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol

3.1.13 Reinigungs- und Trennmaterialien

neutrale Tonerde-WN-3 (Alumina WN-3: Neutral)

Dowex AG50 W-X4 Resin

G50 fine

Fractogel EMD DEAE 650(s)

Ni²⁺-NTA-Agarose

Sigma
BioRad
Pharmacia
Merck
Qiagen

3.1.14 Filtermembranen und Filmmaterial

Nitrocellulose-Membran Hybond-C extra (45 μm)

Röntgenfilme: X-OMAT AR

Whatman P81

Amersham Biosciences
Kodak
Whatman

3.1.15 Software

FL Winlab (Dansyl-CaM-Fluoreszenzspektren)

McMolly Tetra Version 3.9 (DNA-Sequenz-Analysen)

Protein Explorer 2.1 alpha (Protein-Struktur-Analysen)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1.1 Präparation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Mit einem Einzelklon wurden 2 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Mit 100-200 µl der Flüssigkultur wurden 250 ml SOB-Medium inoculiert und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Die Zellen wurden 10 Minuten unter Schwenken auf Eis abgekühlt und anschließend bei 4 °C durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 3.500 x g geerntet. Das Zellsediment wurde in kalter TB-Lösung resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut für 10 Minuten bei 3.500 x g zentrifugiert und das Zellsediment anschließend in 20 ml TB-Lösung resuspendiert. Nach Zusatz von 1,5 ml DMSO und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Transformationseffizienz betrug etwa 2 x 10⁶ cfu/µg pBSK.

3.2.1.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

1 Vol superkompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Die Zellen wurden mit 1/10 Vol Ligationsansatz oder mit 100-500 ng Plasmid gemischt und 30-60 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C wurde der Ansatz 2 Minuten auf Eis gekühlt, anschließend mit 4 Vol SOC-Medium versetzt und 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. 1/4 des Transformationsansatzes wurde auf LB-Agar, der Antibiotikum entsprechend der Resistenz des transformierten Vektors enthielt, ausplattiert und 12-14 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für anschließende über Nacht-Kulturen wurde LB-Medium inklusive entsprechendem Antibiotikum mit einem *E. coli*-Klon angeimpft und bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert.

3.2.1.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen

3.2.1.3.1 Plasmid-Minipräparation

Das bei der vorliegenden Arbeit angewandte Verfahren beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzelle mit anschließender selektiver Ausfällung der chromosomalen DNA (Birnboym und Doly, 1979). Die Zellen von 1,5 ml stationärer *E. coli*-Kultur wurden durch kurze Zentrifugation bei 16.000 x g sedimentiert und anschließend in 200 µl GTE-Lösung resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 400 µl Lysispuffer. Direkt im Anschluss wurde der Ansatz durch Zugabe von 300 µl Ammoniumacetat (7,5 M) neutralisiert. In 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden Proteine denaturiert und chromosomale DNA präzipitiert, anschließend wurden sie in 10-minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g sedimentiert und abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die verbliebenen Nukleinsäuren mit 550 µl Isopropanol ausgefällt und 10 Minuten bei 16.000 x g sedimentiert. Salze wurden aus dem Sediment mit 1 ml 70 % Ethanol gelöst. Das getrocknete Sediment wurde in 50 µl RNase A aufgenommen und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Bei Bedarf von Plasmiden höheren Reinheitsgrades wurden die *E. coli*-Kulturen mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* aufgearbeitet, das nach erfolgter alkalischer Lyse auf dem Prinzip der pH- und Salz-abhängigen Bindung von DNA an Silica-Gel beruht. Bis zu 20 µg DNA kann über Bindung an eine Silica-Gel-*Miniprep*-Säule aufgereinigt werden.

3.2.1.3.2 Plasmid-Maxipräparation

Für größere Plasmidmengen wurden 200 ml einer stationären *E. coli*-Kultur mit dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* aufgearbeitet. Das Verfahren basiert ebenfalls auf einer alkalischen Lyse und anschließender chromatographischer Reinigung der Plasmide über eine Anionen-Austauscher-Säule.

Die Plasmide wurden in einer Konzentration von 1-2 µg/µl DNA in TE gelöst.

Alle präparierten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.1.4 Sequenzspezifisches Schneiden doppelsträngiger DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für einen analytischen Verdau wurden die Plasmid-Mengen so gewählt, dass etwas 20-200 ng DNA in jeder Bande der zu erwartenden Restriktionsfragmente vorlagen. In den Verdau wurden 0,5-1 U des jeweiligen Restriktionsenzym eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 15 µl. Sollten Restriktionsfragmente präparativ erhalten werden, so wurden 1-10 µg DNA mit 1-10 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 60 µl verdaut. Die Inkubationsdauer betrug 1-2 Stunden.

3.2.1.5 Phenolextraktion von DNA

Die Phenolextraktion dient der Abtrennung von Proteinen aus einer Nukleinsäurelösung. 1 Vol DNA-haltige Lösung wurde mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und ausgeschüttelt. Der Ansatz wurde durch Zentrifugation bei 16.000 x g für 5 Minuten in wässrige und organische Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol versetzt und ausgeschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation (s.o.) wurde die wässrige Phase abgenommen und die DNA mit 1/10 Vol Natriumacetat (3M, pH 5,2) und 3 Vol Ethanol 1 Stunde bei 2 °C und 16.000 x g sedimentiert. Nach Waschen der Sedimente mit 1 ml 70 % Ethanol und Trocknen bei 37 °C wurde die DNA in Wasser gelöst.

3.2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

DNA wurde in TAE-Agarosegelen elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Gele enthielten je nach Größe der zu trennenden Fragmente 0,5-1,5 % Agarose in TAE-Puffer und Ethidiumbromid in einer finalen Konzentration von 0,5 µg/ml. Vor Applikation in die Geltaschen wurden die DNA-Proben mit 1/10 Vol DNA-Probenpuffer versetzt. Die Spannung betrug c.a. 6 V/cm.

3.2.1.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Sollten DNA-Fragmente für anschließende Applikationen isoliert werden, so wurden sie nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert. Hierzu wurde das *Jetsorb Gel Extraction Kit* verwendet. Es beruht auf dem Prinzip der pH- und Salz-abhängigen Bindung von DNA an Silica-Gel.

3.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Enzyms T4 DNA-Ligase kovalent verbunden. Dafür wurden der linearisierte Klonierungsvektor und die einzufügenden DNA-Fragmente in ein molares Verhältnis von etwa 1:3 bei einer Gesamtmenge von 50-100 ng DNA gesetzt. In die Reaktion wurde 1 U T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 5-10 µl eingesetzt. Die Pufferbedingungen richteten sich nach den Herstellerangaben der T4 DNA-Ligase. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht.

3.2.1.9 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Zur Mengenabschätzung von DNA in Agarosegelen wurde die Ethidiumbromid-Fluoreszenz einer etwa gleichgroßen DNA-Bande bekannter Menge unter UV-Licht herangezogen. War eine genaue Konzentrationsbestimmung gelöster DNA erforderlich, so wurde diese photometrisch vorgenommen (1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg DNA/ml).

3.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Fragmente wurden mit 5 U *Pfu*-Polymerase, die 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, amplifiziert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach Reinigung per Phenolextraktion (3.2.1.5) mit 1 U *Taq*-Polymerase polyadenyliert, um eine anschließende Klonierung in den pGem-T Easy-Vektor zu gewährleisten.

Die Puffer- und Reaktionsbedingungen richteten sich nach dem Herstellerprotokoll der Polymerasen. Die Wahl der Hybridisierungstemperatur für *Primer*-Oligonukleotide erfolgte nach der „2+4-Regel“ (2 °C pro Adenin/Thymin-Basenpaar, 4 °C pro Guanin/Cytosin-Basenpaar).

3.2.1.11 Gerichtete Mutagenese von DNA

Die gerichtete Mutagenese von DNA wurde mit dem *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* vorgenommen. Die Einführung der erwünschten Mutation basiert auf einer PCR-Amplifikation mit 2 *Primer*-Oligonukleotiden, die revers komplementär zueinander sind und die gewünschte Mutation enthalten. Durch einen anschließenden Verdau mit der methylierungsabhängigen Endonuklease DpnI wird gezielt die nicht mutierte Matrize (als einzig methylierte DNA) entfernt.

Die PCR-Amplifikation erfolgte in einer 2-Stufen-Reaktion: Im ersten Schritt wurden in getrennten Reaktionsgefäßen mit jeweils einem *Primer*-Oligonukleotid 2 Syntheszyklen durchgeführt (Halbreaktion), anschließend wurden die beiden Ansätze vereinigt und weitere 16 Zyklen unter gleich bleibenden Bedingungen durchgeführt:

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
95 °C	30 sec	1
95 °C	30 sec	
50 °C	1 min	2 bzw. 16
68 °C	15 min	
68 °C	7 min	1

Der 25 µl-PCR-Ansatz einer Halbreaktion war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 1 µl Matrize-DNA (50 ng/µl)
- 2,5 µl *Pfu*-Reaktionspuffer (10x)
- 1,75 µl DMSO
- 1 µl dNTP-Mix (10 mM)
- je 1 µl *Primer*-Oligonukleotid *forward* bzw. *reverse* (10 µM)
- 17,45 µl H₂O
- 0,3 µl *Pfu*Turbo C_x Hotstart DANN-Polymerase (2,5 U/µl)

Alle weiteren Schritte (DpnI-Verdau, Klonierung) erfolgten nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.12 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit* durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977). In die Sequenzierreaktion wurden 300 ng Plasmid-DNA, 5 pmol *Primer*-Oligonukleotid und 2 µl *Reaction Mix* in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die weitere Probenaufarbeitung, Gelelektrophorese und Auswertung erfolgte nach Herstellerangaben mit dem ABI PRISM™ 377 DNA-*Sequencer* (Perkin Elmer).

3.2.2 Proteinbiochemische Standardmethoden

3.2.2.1 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinen wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Sie beruht auf einer Bindung von *Coomassie-Blue* an das Protein mit anschließendem spektralselektivem Nachweis des Farb-Komplexes. Zur Bestimmung des Proteingehalts gereinigter $G\alpha_s$ - und $G\beta\gamma$ -Komplexe wurde die weniger störanfällige Methode nach Schaffner und Weissmann (1973) angewandt. Bei diesem Verfahren wird das Protein zunächst durch Trichloressigsäure ausgefällt und auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Nach Färbung mit Amidoschwarz 10B wird der Protein-gebundene Farbstoff eluiert und die Menge des Amidoschwarz im Eluat photometrisch bestimmt. Bei beiden Methoden wurde BSA als Mengenstandard eingesetzt.

3.2.2.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden nach ihrer Größe elektrophoretisch durch SDS-PAGE in einem denaturierenden, diskontinuierlichen Gelsystem aufgetrennt (Laemmli, 1970). Vor dem Auftragen auf das Sammelgel wurden die Proben in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer bei einer Spannung von 10-20 V/cm.

3.2.2.3 Coomassie-Blau-Färbung

In SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennte Proteine wurden bei Bedarf mit dem organischen Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* R250 in saurem Medium angefärbt. Die Methode beruht auf der elektrostatischen Bindung des Farbstoffes an die Aminogruppen des Proteins. Die untere Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,5 µg Protein pro Bande. Die Proteingele wurden 30 Minuten in Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Entfärberlösung gewaschen.

3.2.2.4 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen (Western-Blot)

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Trägermembran (Towbin et al., 1979) erfolgte elektrophoretisch im *Tankblot*-Verfahren. Die Proteine wurden 50 Minuten bei einer Spannung von 100 V (Minigel 8 x 10 cm) in Transferpuffer auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zur vorübergehenden Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde die Membran nach Harlow und Lane (1988) in Ponceau S gefärbt und überschüssiger Farbstoff in PBST entfernt.

3.2.2.5 Immunodetektion

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörper-Bindung wurde die Nitrocellulose-Membran nach erfolgreichem elektrophoretischem Transfer der Proteine mindestens 30 Minuten in 1x RotiBlock bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Darauf folgte eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Antikörper (1:1000 verdünnt in PBST).

Nach mehrmaligem Waschen mit PBST wurde die Membran anschließend mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper 30 Minuten in PBST inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBST wurden die Antigen-Antikörperkomplexe durch Chemilumineszenz mit Hilfe des *ECL Western Blotting Detection System* auf Röntgenfilmen visualisiert.

Bei allen Immunonachweisen von Adenylylcyclase-Konstrukten wurden als Negativkontrolle parallel Membranen von Sf9-Zellen mitgeführt, die mit β -Galactosidase-codierenden Baculoviren infiziert worden waren.

3.2.3 Protein-Expression

Die Expression von Adenylylcyclasen und von G $\beta\gamma$ erfolgte über das Baculovirus-Expressionssystem. *Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus* (AcNPV) aus der Familie der *Baculoviridae* infiziert Sf9-Zellen, eine klonale Linie aus Ovarialzellen von *Spodoptera frugiperda*. Fremdgene können in das Genom von AcNPV über Transposition integriert und somit in Sf9-Zellen zur Expression gebracht werden. Ein Vorteil gegenüber anderen eukaryotischen Systemen liegt in der hohen Expressionsrate und leichten Verfügbarkeit großer Zellmengen. Im Gegensatz zur Expression in *E. coli* können im Sf9-System Proteine oft eukaryotentypisch modifiziert werden; membranständige Proteine werden mit korrekter Lokalisation exprimiert (Luckow, 1991, King und Posse, 1992, Luckow, 1995). Die ACs von Insekten sind in Sf9-Zellen nur in geringem Maß exprimiert und zudem kaum durch G-Proteine regulierbar. So können gezielt Membranpräparationen hergestellt werden, die nur eine Isoform partikulärer Säuger-ACs aufweisen.

3.2.3.1 Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen wurden in TNM-FH-Medium (mit 10 % v/v FKS und 1 % v/v Penicillin/Streptomycin) sowohl adhärent (*Monolayer*) als auch in Suspension bei 27 °C kultiviert. Suspensionskulturen enthielten zusätzlich 1 % v/v Lipid Medium Supplement. Die Kultivierung erfolgte bei Zelldichten zwischen 0,5 und 2 x 10⁶ Zellen/ml.

3.2.3.2 Konstruktion rekombinanter Baculoviren

Die Konstruktion rekombinanter Baculoviren erfolgte mit dem *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System*. Die Methode basiert auf der positionsspezifischen Transposition einer Expressionskassette aus dem Klonierungsvektor pFastBac1 in einen Baculovirus-*shuttle*-Vektor (Bacmid) des *E.coli*-Stammes DH10Bac. Die Reaktionsbedingungen entsprachen den Angaben des Herstellers.

Für die Transfektion des Bacmids in Sf9-Zellen wurde 1 μ l DNA mit 6 μ l C_{ELL}FECTIN-Reagenz in 100 μ l TNM-FH-Medium (ohne Zusatz) 40 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Adhärenz Sf9-Zellen einer Zelldichte von 0,9 x 10⁶ auf 10 cm² wurden nach Waschen mit TNM-FH-Medium mit dem Bacmid/Liposomen-Gemisch und 1 ml TNM-FH-Medium (ohne Zusatz) überschichtet und daraufhin 5 Stunden bei 27 °C inkubiert. Nach Entfernen des Medium-Überstands und Zugabe von frischem TNM-FH-Medium (mit Zusatz von FKS und Penicillin/Streptomycin, s.o.) erfolgte weitere Inkubation bei 27 °C. Nach 2 Tagen wurde der Virus-Überstand geerntet, und die infizierten Zellen wurden nach Zugabe von frischem Medium weitere 2-4 Tage bei 27 °C inkubiert. Virus aus 1 ml der

Überstände erster Ernte (2. Tag nach der Transfektion) oder zweiter Ernte (4.-6. Tag nach der Transfektion) wurde mit 30-50 ml Sf9-Suspensionskultur ($0,8-1 \times 10^6$ Zellen/ml) 5-8 Tage amplifiziert. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit $3.500 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert und der virushaltige Überstand bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.3.3 Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Zur Amplifikation rekombinanter Viren wurde 1 Vol Sf9-Suspensionskultur bei einer Dichte von 1×10^6 /ml mit 1/1000 Vol virushaltigem Überstand aus einer vorherigen Amplifikation infiziert und 4-7 Tage bei $27 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit $3.500 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert und der virushaltige Überstand bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.3.4 Virusinfektion von Sf9-Zellen

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde 1 Vol Sf9-Suspensionskultur bei einer Dichte von $1,2 \times 10^6$ /ml mit 1/10 Vol virushaltigem Überstand infiziert und bei $27 \text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Die Expressionszeit betrug 48-52 Stunden für Adenylylcyclasen und 60-64 Stunden für $G\beta\gamma$ -Komplexe. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit $1000 \times g$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert und der Überstand abgenommen. Das Sediment wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.3.5 Membranpräparation von virusinfizierten Sf9-Zellen

Das Sf9-Zellsediment wurde in Lysispuffer resuspendiert. Die Zellen wurden entweder durch mehrmaliges sequentielles Schockgefrieren (flüssiger Stickstoff) und Auftauen (Wasserbad) oder mit einer Zellaufschluss-Bombe (30-50 bar N_2 , 30 Minuten, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) aufgeschlossen. Zum Abtrennen der Zellkerne wurde das Lysat 2 Minuten mit $1000 \times g$ bei $2 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugation ($40.000 \times g$, 30 Minuten, $2 \text{ }^\circ\text{C}$) in cytosolische Fraktion (Überstand) und Membranen (Sediment) aufgetrennt. Die Membranen wurden in Aufbewahrungspuffer resuspendiert und in einem Potter-Homogenisator oder mittels mehrmaligen Pressens durch 26 G-Kanülen homogenisiert. Die Membranfraktionen wurden bezüglich ihrer Proteinkonzentration auf 5-20 mg/ml eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.2.4 Präparation heterotrimerer G-Protein-Untereinheiten

3.2.4.1 Reinigung von $G\beta_1\gamma_2$

Die Reinigung rekombinant in Sf9-Zellen exprimierter $G\beta_1\gamma_2$ -Komplexe mit am N-Terminus von $G\gamma_2$ lokalisiertem Hexahistidin-Epitop erfolgte mittels Affinitäts-Chromatographie gefolgt von einer Anionenaustauscher-Chromatographie.

$G\beta_1\gamma_2$ -enthaltende Sf9-Zellmembranen wurden in kaltem Extraktionspuffer resuspendiert, so dass die Konzentration an Membranprotein weniger als 5 mg/ml betrug und auf 0,5 % (v/v) $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ eingestellt. Membranassoziierte Proteine wurden 1 Stunde unter Rühren auf Eis extrahiert. Der Extrakt wurde zentrifugiert ($40.000 \times g$, 60 Minuten, $2 \text{ }^\circ\text{C}$) und der Überstand mit Ni^{2+} -NTA-Agarose (5 ml gepacktes Material, mit 20 mM Na-Hepes, pH 8,0 äquilibriert) 3-4 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Schwenken inkubiert. Die Ni^{2+} -NTA-Agarose in dem Proteingemisch wurde dann in einer Säule gepackt, mit 10 ml Puffer A und im Anschluss mit 5 ml Puffer B gewaschen. Elution der $G\beta_1\gamma_2$ -Proteine erfolgte mit 30 ml Puffer C. Zur Reduktion der Salzkonzentration wurde das Eluat mit Puffer D auf 50 ml aufgefüllt und auf eine mit Fractogel EMD-DEAE-Material gepackte Säule (1 ml, 0,5 cm Durchmesser) geladen, die zuvor mit

Puffer D äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 5 ml Puffer E gewaschen und die Proteine anschließend über einen linearen NaCl-Gradienten (0-500 mM NaCl, $c/V = 25 \text{ mM/ml}$) in Puffer E eluiert und fraktioniert.

Proteinhaltige Fraktionen (OD_{280}) wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blue-Färbung dargestellt und die quantitativ dominierende Bande bei 37 kDa der $G\beta_1$ -Untereinheit zugeordnet.

Die $G\beta_1\gamma_2$ -haltigen Fraktionen wurden umgepuffert und eingeeengt, so dass $G\beta_1\gamma_2$ schließlich in einer Konzentration von 2-4 mg/ml in Puffer F vorlag. Nach Überprüfung der Reinheit durch SDS-PAGE mit Coomassie-Blue-Färbung und Protein-Konzentrationsbestimmung nach Schaffner und Weissmann (1976) wurde das gereinigte $G\beta_1\gamma_2$ in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.2.4.2 GTP γ S-Aktivierung von $G\alpha_s$

$G\alpha_{s-S4}$ (accession number X03404) mit C-terminalem Hexahistidin-Epitop, in *E. coli* exprimiert und über Affinitäts- und Hydroxyapatit-Chromatographie aufgereinigt (Lee et al., 1994), wurde freundlicherweise von Dr. C. Kleuss zur Verfügung gestellt.

Bevor $G\alpha_s$ als Costimulator in den AC-Funktionsuntersuchungen eingesetzt werden konnte, musste es aktiviert werden. Die Bindung des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons GTP γ S bewirkt den irreversiblen Übergang in die aktive Form des $G\alpha$ -Proteins. Durch radioaktive Markierung des GTP γ S ($[^{35}\text{S}]$) kann nach Trennung des gebundenen von nicht Protein-gebundenem GTP γ S der Anteil des $G\alpha_s$ -gebundenen $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S vermessen und somit die Menge an aktivem $G\alpha$ -Protein genau bestimmt werden.

Es wurde etwa 1 mg des heterolog exprimierten und gereinigten $G\alpha_s$ mit GTP γ S-Mix auf ein Gesamtvolumen von 100 μl gebracht und 30 Minuten bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Es folgte eine 1-stündige Inkubation auf Eis. Die Trennung des $G\alpha_s$ -gebundenen von nicht Protein-gebundenem GTP γ S erfolgte über Größenausschluss-Chromatographie auf einer 2 ml Sepharose-G50-Säule (4,6 % w/v G50 in 0,2% Natriumazid). Der Reaktionsansatz wurde auf die mit HMEDBL-Puffer äquilibrierte Säule geladen und 4 Minuten bei $1000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend wurde mit 100 μl HMEDBL-Puffer gewaschen und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Radioaktivität des im Säulendurchlauf befindlichen $G\alpha_s$ -gebundenen $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S wurde in 2 ml Szintillationslösung im Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500 (Perkin Elmer) bestimmt.

3.2.5 Bindungsstudien mit Dansyl-Calmodulin

Dansyliertes Calmodulin (Dansyl-CaM) wurde freundlicherweise von Kathrin Klass (Arbeitsgruppe Dr. C. Kleuss) zur Verfügung gestellt.

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten am *Luminescence Spectrometer* LS50B (Perkin Elmer).

In einer Quartz-Mikro-Küvette (10 mm) wurden 80 nM Dansyl-CaM in einem Gesamtvolumen von 800 μl DaCam-Puffer vorgelegt. Verdünnungseffekte durch experimentell bedingte Zugabe von Calcium, Peptiden und/oder EGTA wurden unter 3 % des Ausgangsvolumens gehalten. Nach Mischen der zu vermessenden Proben wurde der Dansylrest bei $26 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einer Wellenlänge von 334 nm angeregt und das Spektrum der resultierenden Fluoreszenz zwischen 450 und 550 nm mit einer Geschwindigkeit von 20 nm/min aufgenommen.

3.2.6 Enzym-Funktionsstudien

3.2.6.1 Bestimmung der Adenylylcyclase-Aktivität

Die AC-Aktivität wurde nach der Methode von Salomon et al. (1974) bestimmt. Die Methode beruht auf der Umsetzung von [α - 32 P]ATP in 32 P-cAMP mit anschließender Reinigung des cAMP durch sequentielle Chromatographie über Dowex-Kationenaustausch- und Aluminiumoxid-Säulen.

Alle Reaktionsansätze enthielten zur Regenerierung von ATP Pyruvatkinase und deren Substrat Phosphoenolpyruvat. Zum Schutz des cAMP vor Hydrolyse wurde Ro 20-1724 als Inhibitor cAMP-spezifischer Phosphodiesterasen zugesetzt. Die AC-Aktivität wurde in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ und 0,5 mM ATP bestimmt.

Alle Funktionsuntersuchungen der AC wurden direkt an den Membranen der virus-infizierten Sf9-Zellen durchgeführt. Als Maß für die endogene Aktivität der Membranen wurden in jedem Versuch parallel Membranen von Sf9-Zellen mitgeführt, die mit β -Galactosidase-codierenden Baculoviren infiziert worden waren.

Im Detail wurde die AC-Aktivität folgendermaßen bestimmt: Die AC-haltigen Sf9-Membranen wurden mit den jeweiligen Regulatoren in einem Volumen von 50 μ l AC-Reaktionspuffer auf Eis gemischt. Der Leerwert umfasste lediglich den Puffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l AC-Startpuffer bei 30 °C gestartet und nach 10 Minuten durch Zugabe von 850 μ l AC-Stopplösung beendet.

Um die Rückgewinnungsrate des cAMP aus der chromatographischen Aufreinigung ermitteln zu können, wurde [3 H]cAMP (c.a. 5000 cpm) zugesetzt. Der Ansatz wurde auf eine gewässerte Dowex AG50 WX4-Säule geladen. Nicht umgesetztes ATP wurde mit 2 ml Wasser eluiert, anschließend wurden gebundene Adenosinphosphate mit 2 x 2 ml Wasser eluiert und auf eine gewässerte 1 ml neutrale Tonerde-WN-3-Säule geladen. Gebundenes cAMP wurde mit 3 ml cAMP-Elutionspuffer eluiert und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500 (Beckmann) in 8 ml Szintillationslösung gemessen.

Die spezifische AC-Aktivität berechnete sich wie folgt:

$$A \text{ (nmol / min / mg)} = \frac{[R_{\text{Probe}} \text{ (cpm)} - R_{\text{Leerwert}} \text{ (cpm)}] \times K_{\text{ATP}} \text{ (nmol/}\mu\text{l)} \times V \text{ (}\mu\text{l)}}{R_{[\alpha\text{-}^{32}\text{P]ATP}} \text{ (cpm)} \times Z \text{ (min)} \times M_{\text{Protein}} \text{ (mg)} \times a}$$

A	= spezifische Aktivität
R	= Radioaktivität
K	= Konzentration
V	= Reaktionsvolumen
Z	= Reaktionszeit
M	= Menge Membranprotein (AC-haltig)
a	= 3 H-cAMP-Rückgewinnungsrate

3.2.6.1.1 AC-Regulierbarkeit durch G β γ

Zur Bestimmung der AC-Aktivität in Gegenwart von G β γ wurde der Reaktionspuffer durch Zusatz von NaCl, BSA und C₁₂E₁₀ modifiziert (AC-ReaktionspufferPlus).

3.2.6.1.2 AC-Regulierbarkeit durch Ca/CaM

Zur Bestimmung der AC-Regulierbarkeit durch Ca/CaM wurde zunächst endogenes Ca/CaM durch Waschen der Sf9-Membranen mit 1 mM EGTA entfernt. Die AC-Aktivität wurde in Gegenwart von 100 μ M CaCl₂ ermittelt. Die MgCl₂-Konzentration des AC-Reaktionspuffers wurde auf die Hälfte reduziert. Vor Zugabe des AC-Startpuffers wurde der Reaktionsansatz 2 Minuten bei 30 °C präinkubiert, die Reaktionszeit betrug danach 7 Minuten.

Für Peptidkompetitionsversuche wurden die Peptide allein oder mit Ca/CaM etwa 60 Minuten auf Eis vorinkubiert, Zellmembranen und Costimulatoren wurden unmittelbar vor der Reaktion zugegeben.

3.2.6.2 Bestimmung der Aktivität der Ca/CaM-abhängigen KinaseII

Die Aktivität der Ca/CaM-abhängigen KinaseII (CaMKinaseII) wurde mit dem *SignaTECT Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Assay System* nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das System beruht auf der Phosphorylierung eines CaMKinaseII-spezifischen Peptids mit radioaktiv markiertem $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Das Peptid ist über eine Biotin-Streptavidin - Bindung an einer Membran immobilisiert. Nach Waschen der Membran zur Entfernung des nicht gebundenen $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ wird die Menge des ^{32}P -markierten Peptids an der Membran bestimmt.

3.2.7 Generierung von Adenylylcyase-Konstrukten

Prinzipiell wurde aus Restriktions-, PCR- oder Mutagenese-Reaktionen erhaltene DNA elektrophoretisch aufgetrennt und interessierende Fragmente eluiert (3.2.1.7). Nach Ligation mit dem entsprechenden Klonierungsvektor wurden die Konstrukte in superkompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert (3.2.1.2) und die positiven Klone über Restriktionsanalyse überprüft.

Die korrekte Sequenz amplifizierter DNA-Bereiche wurde stets durch Sequenzierung verifiziert.

PCR- und Mutagenese-Reaktionen wurden nicht an den bis zu 3500 bp großen AC-Konstrukten voller Länge durchgeführt, sondern erfolgten an kürzeren, die zu mutierende AC-Region umfassenden Fragmenten. Die mutierten AC-Fragmente wurden anschließend in die gesamte AC voller Länge zurückkloniert.

Die Sequenzen aller in der Arbeit verwendeten *Primer*-Oligonukleotide sind in Abschnitt 3.1.7 aufgelistet. Alle Klonierungsschritte erfolgten in den Vektoren pGem-T Easy und pBSK.

Die fertigen AC-Konstrukte wurden unter Verwendung der Schnittstellen *SpeI/HindIII* in den pFastBac1-Vektor transferiert, um davon Baculoviren zu erzeugen.

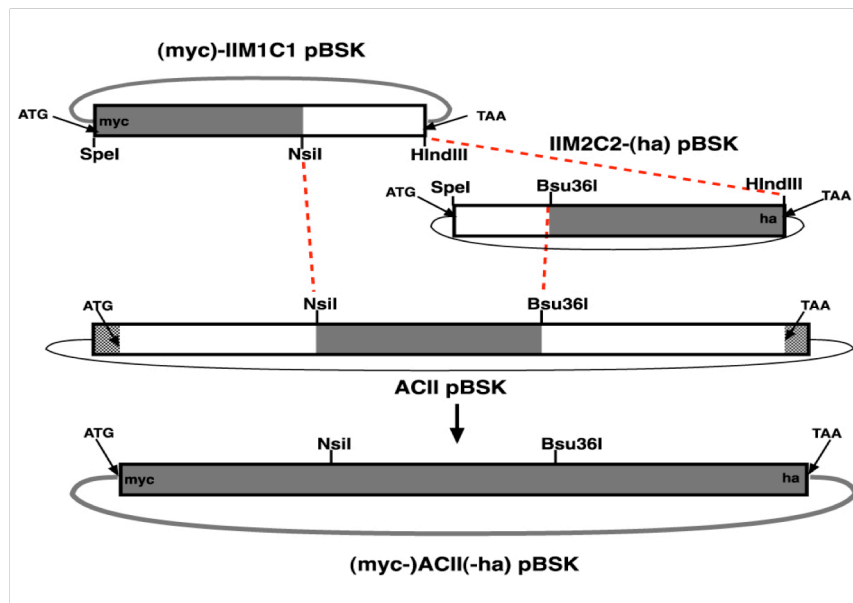
3.2.7.1 AC-Wildtyp-Konstrukte mit MYC- und HA-Epitop

Um die rekombinant exprimierten AC-Proteine immunologisch detektieren zu können, wurden sie mit Epitopen für entsprechende Antikörpererkenntnisse versehen. Die cDNA der ACI- und ACII-Wildtypen, die als Matrizen aller in dieser Arbeit generierten AC-Mutanten dienten, lagen mit zum Teil ausgedehnten nicht-codierenden Sequenzen im 5'- und 3'-Bereich vor. Daher wurden zunächst ACI- und ACII-Wildtyp-Konstrukte generiert, die MYC- und HA-codierende Sequenzen an ihrem 5'- bzw. 3'- Ende enthielten und mit ihren Start- bzw. Stopcodons direkt in die Schnittstellen übergangen, so dass keine - eventuell störenden - nicht-codierenden Sequenzen erhalten blieben.

3.2.7.1.1 ACII mit MYC- und HA-Epitop

Da halbierte AC-Konstrukte (M1C1 und M2C2) schon mit den entsprechenden MYC- und HA-codierenden Sequenzen über *SpeI/HindIII* in pBSK kloniert vorlagen, konnte auf eine PCR-Amplifikation verzichtet werden. Aus ihnen wurde mittels „Drei-Wege-Ligation“ unter Zuhilfenahme der ACII-internen Schnittstellen *NsiI* und *Bsu36I* die mit den Epitopen versehene ACII nach folgendem Schema generiert (Abbildung 3.1):

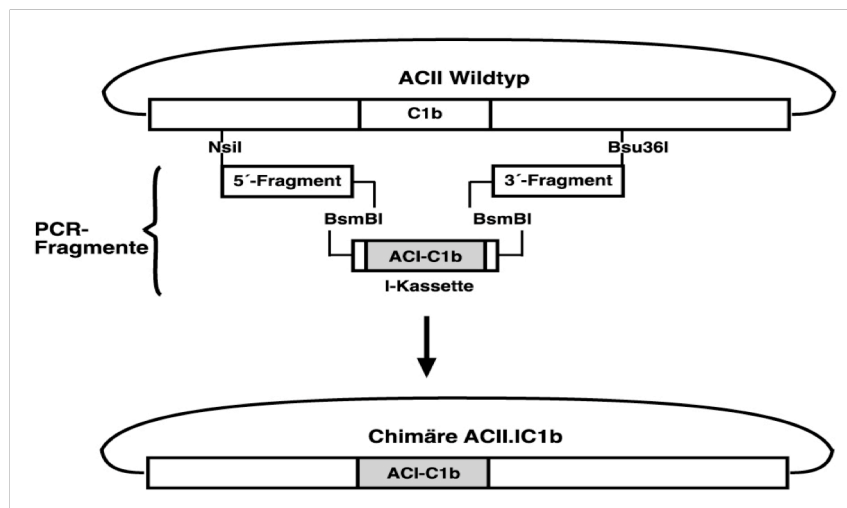
Aus M1C1 pBSK (mit 5'-terminaler MYC-codierender Sequenz) wurde über *NsiI/HindIII*-Verdau die stromabwärts von *NsiI* liegende Sequenz der ersten AC-Hälfte entfernt. Dafür wurden 2 ACII-Fragmente eingeführt, die über *NsiI/Bsu36I*-Verdau der ACII-cDNA und *Bsu36I/HindIII*-Verdau des M2C2-Konstrukts (mit 3'-terminaler HA-codierender Sequenz) erhalten wurden. Die Ligation der 3 ACII-Fragmente ergab die über *SpeI/HindIII* in pBSK liegende ACII-Wildtyp-Sequenz, flankiert von 5'-terminaler MYC- und 3'-terminaler HA-codierender Sequenz.



Legende zu Abbildung 3.1: Generierung von (myc-)ACII(-ha) in pBSK

ATG: Startcodon, TAA: Stopcodon,

myc: MYC-codierende Sequenz (GAACAAAACTGATATCGGAAGAAGACCTC), ha: HA-codierende Sequenz (TATCCGTACGACGTGCCGGACTACGCA), rot gestrichelte Linien: verbinden Schnittstellen, über die die „Drei-Wege-Ligation“ abläuft, hellgrau gemusterte Fläche der ACII-cDNA: überhängende cDNA-Sequenzen vor Start- bzw. hinter Stopcodon. Weitere Details siehe Text.



Legende zu Abbildung 3.2: Konstruktion der Chimäre ACII.IC1b

Die C1b-Domäne der ACII (weiße Fläche) wurde durch die C1b-Domäne der ACI (graue Fläche) ersetzt. Details siehe Text und Legende zu Abbildung 3.1.

3.2.7.1.2 ACI mit MYC- und HA-Epitop

Es wurde nach dem unter 3.2.7.1.1 beschriebenen Klonierungsschema vorgegangen. Als Ausgangskonstrukte dienten hier neben der ACI-cDNA die über SpeI/HindIII in pBSK klonierten AC-Hälften M1C1 und M2C2 mit den entsprechenden MYC- bzw. HA-codierenden Sequenzen (s.o.). Die „Drei-Wege-Ligation“ erfolgte über SpeI, HindIII und die ACI-internen Schnittstellen NspI und XmaI.

3.2.7.2 AC-Chimären: Domänenaustausch verschiedener AC-Isoformen

Alle AC-Chimären wurden mit einer PCR-basierten Methode konstruiert, bei der das zur zweiten Gruppe der Typ II Restriktionsenzyme gehörende BsmBI zum Einsatz kam. Diese Gruppe von Restriktionsenzymen zeichnet sich dadurch aus, dass sie außerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden. Diese Eigenschaft wurde hier ausgenutzt, um den Domänenaustausch ohne Insertion AC-fremder Restriktionsstellen durchzuführen.

3.2.7.2.1 ACII.IC1b

Es wurden 3 Fragmente per PCR amplifiziert: (1) ein 5'-Fragment mit der ACII als Matrize, (2) ein 3'-Fragment mit der ACII als Matrize und (3) eine I-Kassette mit der ACI als Matrize. Das 5'-Fragment (1) wurde am 5'-Ende von der endogenen ACII-Schnittstelle NsiI abgeschlossen und enthielt am 3'-Ende eine BsmBI-Erkennungssequenz, die über das *Primer*-Oligonukleotid eingebracht wurde. Das 3'-Fragment (2) enthielt am 3'-Ende die endogene ACII-Schnittstelle Bsu36I und am 5'-Ende eine BsmBI-Erkennungssequenz, die über das *Primer*-Oligonukleotid eingebracht wurde. Die I-Kassette (3) enthielt sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende jeweils eine BsmBI-Erkennungssequenz, welche über die *Primer*-Oligonukleotide eingebracht wurden.

Die BsmBI-Schnittstellen auf der I-Kassette wurden so gewählt, dass nach BsmBI-Verdau die überhängenden Enden komplementär zu denen des 5'-Fragments bzw. 3'-Fragments waren. Diese 3 Fragmente wurden miteinander und über die NsiI- bzw. Bsu36I-Schnittstellen mit der ACII voller Länge in einer „Vier-Wege-Ligation“ verknüpft (Abbildung 3.2).

3.2.7.2.2 ACIII.IIC1b

Die Chimäre ACIII.IIC1b wurde analog zu dem unter 3.2.7.2.1 beschriebenen Verfahren konstruiert. Als ACI-interne Schnittstellen dienten hier KpnI und BstEII.

3.2.7.2.3 ACII.IC2

Es wurden 2 Fragmente per PCR amplifiziert: (1) ein 5'-Fragment mit der ACII als Matrize und (2) eine I-Kassette mit der ACI als Matrize. Das 5'-Fragment (1) wurde am 5'-Ende von der ACII-Schnittstelle Bsu36I abgeschlossen und enthielt am 3'-Ende eine BsmBI-Erkennungssequenz, die über das *Primer*-Oligonukleotid eingebracht wurde. Die I-Kassette (2) enthielt am 5'-Ende eine BsmBI-Erkennungssequenz und wurde am 3'-Ende von einer HindIII-Schnittstelle abgeschlossen.

Die BsmBI-Schnittstelle auf der I-Kassette wurde so gewählt, dass nach BsmBI-Verdau das überhängende Ende komplementär zu dem des 5'-Fragments war. Die 2 Fragmente wurden miteinander und über die Bsu36I- und HindIII-Schnittstellen mit der ACII voller Länge in einer „Drei-Wege-Ligation“ verknüpft.

3.2.7.2.4 ACI.IIC2

Die Chimäre ACI.IIC2 wurde analog zu dem unter 3.2.7.2.3 beschriebenen Verfahren konstruiert. Als ACI-intrinsische Schnittstelle diente hier XmaI.

3.2.7.3 ACI-C2b-Deletionsmutanten

Zur Generierung der beiden C2b-Deletionsmutanten wurde über PCR jeweils ein Fragment mit der ACI als Matrize generiert, welches an seinem 5'-Ende die ACI-intrinsische Schnittstelle XmaI enthielt und auf 3'-Seite an den die ACI-Aminosäuren 1094 bzw. 1057 codierenden Sequenzen mit einer HindIII-Schnittstelle abgeschlossen wurde.

Die stromabwärts der XmaI-Schnittstelle liegende Sequenz des ACI-Wildtyp wurde über XmaI/HindIII mit einem der beiden PCR-amplifizierten ACI-Fragmente ersetzt.

3.2.7.4 NAAIRS- und AA-Substitutionsmutanten

Alle NAAIRS- und AA-Mutanten wurden per *QuikChange Site-Directed*-Mutagenese generiert (3.2.1.11). Die Mutagenese wurde nicht an AC-Matrizen voller Länge durchgeführt, sondern es wurden mittels PCR kürzere, die betreffenden Domänen umfassende Vorkonstrukte generiert. Nach Klonierung in den pGem-T Easy-Vektor dienten diese als Matrizen für die Mutagenese-Amplifikationen. Die Vorkonstrukte waren durch AC-intrinsische Schnittstellen eingegrenzt, über die sie nach erfolgter Mutation in die AC voller Länge zurückkloniert wurden.

3.2.7.4.1 NAAIRS-Mutanten der C1b-Domäne der ACII

Als Vorkonstrukt wurde ein die C1b-Domäne der ACII umfassendes Fragment generiert, das von den ACII-intrinsischen Schnittstellen NsiI und Bsu36I flankiert wurde. Für die Substitution von 6-Codon-Blöcken wurden jeweils 2 Mutagenese-Oligonukleotide synthetisiert: Das erste Oligonukleotid enthielt die 15 direkt stromaufwärts von der zu substituierenden ACII-Sequenz lokalisierten Nukleotide, gefolgt von der NAAIRS-codierenden Sequenz 5'-AATGCTGCTATACGATCG-3', der wiederum die 15 stromabwärts von der zu substituierenden Sequenz liegenden Nukleotide folgten. Das zweite Oligonukleotid war revers-komplementär zum ersten.

3.2.7.4.2 NAAIRS-Mutanten der C2a-Domäne der ACII

Als Vorkonstrukt wurde ein die C2a-Domäne der ACII umfassendes Fragment generiert, das von den endogenen Schnittstellen Bsu36I und HindIII flankiert wurde. Die NAAIRS-Substitution erfolgte nach der in 3.2.7.4.1 beschriebenen Strategie.

3.2.7.4.3 AA-Mutanten der C2a-Domäne der ACII

Als Matrize diente das für die C2a-NAAIRS-Mutationen (siehe 3.2.7.4.2) generierte Vorkonstrukt.

Für die Substitution der Codon-Paare wurden jeweils 2 Mutagenese-Oligonukleotide entworfen: Ein Oligonukleotid enthielt die 15 direkt stromaufwärts von der zu substituierenden ACII-Sequenz lokalisierte Nukleotide, gefolgt von der AA-codierenden Sequenz 5'-GCTGCT-3', der wiederum die 15 stromabwärts von der zu substituierenden Sequenz liegende Nukleotide folgten. Die Sequenz des zweiten Oligonukleotids war revers-komplementär zu der eben beschriebenen Sequenz.

3.2.7.4.4 AA-Mutante der C2a-Domäne der ACI

Als Vorkonstrukt wurde ein die C2a-Domäne der ACI umfassendes Fragment generiert, das von den Schnittstellen XmaI und HindIII flankiert wurde. Für die simultane Substitution der V1027- und L1031-Codons wurden 2 Mutagenese-Oligonukleotide entworfen: Ein Oligonukleotid enthielt insgesamt 45 Nukleotide, bestehend aus den 15 Nukleotiden der ACI-Sequenz, die das Pentapeptid zwischen V1027 und L1031 codieren, und jeweils 15 Nukleotiden direkt stromauf- und stromabwärts davon. Die V1027- und L1031-Codons waren jeweils durch das A-Codon 5'-GCT-3' ersetzt. Das zweite Oligonukleotid war revers-komplementär zu der eben beschriebenen Sequenz.