

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Zellen

Kompetente Bakterien (E. coli "TOP 10")

HEK293-Zellen

Glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte

Invitrogen, Leek, Niederlande

American Type Culture Collection
(ATCC), Rockville, USA

PD Dr. H. P. Reusch, Berlin

3.1.2 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 3 aufgeführt. Die Konstruktion der im Rahmen dieser Arbeit neu hergestellten Plasmide ist im Methodenteil beschrieben.

Tab. 3: Liste der verwendeten Plasmide.

cDNA	Spezies	Vektor	Quelle
-	-	pcDNA3	Invitrogen, Leek, Niederlande
-	-	pcDNA3.1- V5/His/TOPO	Invitrogen, Leek, Niederlande
-	-	pEYFP-C1	Clontech, Palo Alto, USA
-	-	pECFP-C1	Clontech, Palo Alto, USA
-	-	pcDNA3-YFP	M. Schaefer, Berlin
-	-	pcDNA3-CFP	M. Schaefer, Berlin
p85 α	Rind	pcDNA3.1- V5/His/TOPO	M. Michalke, Berlin
p85 α ohne Stopcodon	Rind	pcDNA3	M. Michalke, Berlin
p85 α	Rind	pcDNA3	(siehe Methoden)
YFP-p85 α	Rind	pEYFP-C1	M. Michalke, Berlin
p110 β	Mensch	pcDNA3	(siehe Methoden)
YFP-p110 β	Mensch	pEYFP-C1	M. Michalke, Berlin
p110 β -YFP	Mensch	pcDNA3-YFP	M. Michalke, Berlin
EE-p101	Schwein	pCMV3	L. R. Stephens, Cambridge, UK
p101	Schwein	pcDNA3	(siehe Methoden)

YFP-p101	Schwein	pEYFP-C1	M. Michalke, Berlin
CFP-p101	Schwein	pECFP-C1	(siehe Methoden)
p101-YFP	Schwein	pcDNA3-YFP	(siehe Methoden)
p101-CFP	Schwein	pcDNA3-CFP	(siehe Methoden)
p110 γ	Mensch	pBluescript SK	R. Wetzker, Jena
p110 γ	Mensch	pcDNA3	(siehe Methoden)
YFP-p110 γ	Mensch	pEYFP-C1	M. Michalke, Berlin
p110 γ -YFP	Mensch	pcDNA3-YFP	(siehe Methoden)
YFP-p110 γ -K833R	Mensch	pEYFP-C1	(siehe Methoden)
p110 γ -CAAX	Mensch	pFastBac	A. Schulz / K. Spicher, Berlin
YFP-p110 γ -CAAX	Mensch	pEYFP-C1	(siehe Methoden)
p110 γ -CAAX	Mensch	pcDNA3	(siehe Methoden)
EGFR		pRK5	A. Ullrich, Martinsried
fMLP-R	Mensch	pcDNA3	P. Gierschick, Ulm
fMLP-R	Mensch	pcDNA3	(siehe Methoden)
G α_{i2}	Ratte	pcDNA1-Amp	T. Schöneberg, Berlin
G α_{i2}	Ratte	pcDNA3	(siehe Methoden)
G β_1	Mensch	pcDNA3	M. Michalke, Berlin
CFP-G β_1	Mensch	pECFP-C1	K. Spicher, Berlin
G γ_2	Rind	pcDNA3	M. Michalke, Berlin
H-Ras N17			H. P. Reusch, Berlin
H-Ras N17	Mensch	pcDNA3	K. Giehl, Ulm
CFP-H-Ras V12	Mensch	pECFP-C1	K. Giehl, Ulm
H-Ras V12	Mensch	pcDNA3	(siehe Methoden)
GFP-GRP1 _{PH}	Maus	pEGFP-C1	C. P. Downes, Dundee, UK
Btk _{PH} -CFP	Mensch	pECFP-N1	A. Schulz / K. Spicher, Berlin

3.1.3 Enzyme und Reaktionssysteme

Expand High Fidelity PCR System

Roche, Mannheim

Cycle sequencing Kit

Perkin Elmer, Foster City, USA

Restriktionsendonukleasen

New England Biolabs, Beverly, USA

T4 DNA-Ligase

New England Biolabs, Beverly, USA

QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit

Stratagene, La Jolla, CA, USA

3.1.4 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid-Gellösung (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Adenosintriphosphat (ATP)	Roche, Mannheim
[γ - ³² P]ATP	NEN, Boston, USA
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Benzamidin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
ECL Western Blot Detection System	Amersham Pharmacia, Freiburg
EGF (<i>epidermal growth factor</i>)	Calbiochem, Frankfurt (Main)
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (fMLP)	Calbiochem, Frankfurt (Main)
fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i> , FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
FuGene 6 Transfection Reagent	Roche, Mannheim
Glutamin	Biochrom, Berlin
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
β -Glycerophosphat	Merck, Darmstadt
Glycin	ICN, Eschwege
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma, Deisenhofen
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
MEM Earle's Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt

Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyrophosphat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet P40 (NP40)	Roche, Mannheim
Oligonukleotide	Sigma-ARK, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidylcholin	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidylethanolamin	Sigma, Deisenhofen
L- α -Phosphatidylserin	Sigma, Deisenhofen
Ponceau S	Merck, Darmstadt
n-Propanol	Roth, Karlsruhe
Pefabloc [®] SC	Roche, Mannheim
Pertussistoxin (PTX)	Calbiochem, Frankfurt (Main)
Polyoxyethylen-10-Laurylether (C ₁₂ E ₁₀)	Sigma, Deisenhofen
Roti-Block	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sphingomyelin	Sigma, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Bio-Rad, München
N-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon (TPCK)	Sigma, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypton	Calbiochem, Frankfurt (Main)
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin
Trypsin-Inhibitor	Roche, Mannheim
Wortmannin	Calbiochem, Frankfurt (Main)

3.1.5 Antikörper

anti-p110 γ für Immunpräzipitation	R. Wetzker, Jena
anti-p110 γ für Immunoblot	R. Wetzker, Jena
anti-GFP	Clontech, Palo Alto, USA
anti-ERK1/2	New England Biolabs, Beverly, USA
anti-pERK1/2	New England Biolabs, Beverly, USA
anti-pAkt	New England Biolabs, Beverly, USA
anti-Kaninchen-IgG, POD-gekoppelt	Sigma, Deisenhofen

anti-Maus-IgG, POD-gekoppelt

Sigma, Deisenhofen

3.1.6 Sonstige Materialien

1 kb DNA Standard

Gibco BRL, Eggenstein

LMW Electrophoresis Calibration Kit

Amersham Pharmacia, Freiburg

Dünnschichtplatten mit Kieselgel 60

Whatman, Maidstone, UK

ProteinA-Sepharose CL-4B

Amersham Pharmacia, Freiburg

Qiagen Plasmid Purification Kits

Qiagen, Hilden

Hybond C Nitrocellulose-Membran

Amersham Pharmacia, Freiburg

Röntgenfilme (CRT7, R, X-OMAT)

Kodak, Rochester, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte molekularbiologische Standardmethoden sind ausführlich bei Sambrook & Russell (2001) beschrieben.

Für die Herstellung von Expressionsplasmiden wurde allgemein nach folgender Strategie verfahren: Das Einfügen von geeigneten Schnittstellen und/oder der Kozak-Sequenz (GCCACC direkt vor dem Startcodon; Kozak et al., 1987) bzw. Entfernen von Stopcodons geschah mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Die dabei entstandenen Fragmente wurden zunächst mittels TA-Klonierung in einen entsprechenden Vektor (pcDNA3.1-V5/His/TOPO) und von dort später weiter in die endgültigen Vektoren subkloniert: pcDNA3 für nicht-markierte, pcDNA3-CFP bzw. -YFP für C-terminal markierte, sowie pECFP- bzw. pEYFP-C1 für N-terminal markierte Proteine. Die Sequenzen aller PCR-generierten Fragmenten wurde durch Sequenzierung überprüft.

Im Folgenden ist die Konstruktion jedes einzelnen Plasmids beschrieben. Hierbei wurde vor allem darauf Wert gelegt, daß nachvollziehbar wird, aus welchen Teilen jedes Plasmid letztlich zusammengesetzt ist. Das tatsächliche Vorgehen zur Herstellung einiger Plasmide erforderte mitunter kompliziertere Strategien (z. B. partieller Verdau mit den Restriktionsenzymen oder Austausch von Fragmenten mit bei der PCR entstandenen Mutationen), auf deren ausführliche Darstellung hier aber verzichtet werden soll.

p85 α :

Das 3'-Ende der p85 α -cDNA ohne Stopcodon in pcDNA3 wurde durch das 3'-Ende der p85 α -cDNA mit Stopcodon in pcDNA3.1-V5/His/TOPO ersetzt, und zwar über die Xho I- und Xba I-Schnittstellen.

p110 β :

Das 3'-Ende der p110 β -cDNA sowie die darauf folgende YFP-codierende Sequenz in pcDNA3-YFP wurden durch das 3'-Ende der p110 β -cDNA in pEYFP-C1 ersetzt, und zwar über die Xba I- und Apa I-Schnittstellen.

p101:

Die p101-cDNA wurde (ohne die Sequenz für die EE-Markierung) aus pCMV3 in pcDNA3 umkloniert, und zwar über die EcoR I- und Not I-Schnittstellen. Mittels PCR mit den Primern 5'-GCC ACC ATG CAG CCA GGG GCC ACG GA und 5'-GGC CCG AGA CGA AGG AGG T wurde ein Fragment generiert, welches das 5'-Ende der p101-cDNA mit der Kozak-Sequenz direkt vor dem Startcodon enthält, und in pcDNA3.1-V5/His/TOPO subkloniert. Schließlich wurde das 5'-Ende der p101-cDNA in pcDNA3 ohne Kozak-Sequenz durch das 5'-Ende der p101-cDNA mit Kozak-Sequenz ersetzt, und zwar über die Hind III- und BsmB I-Schnittstellen.

CFP-p101:

Die YFP-codierende Sequenz im YFP-p101-Plasmid wurde durch die CFP-codierende Sequenz aus dem Vektor pECFP-C1 ersetzt, und zwar über die Ase I- und BspE I-Schnittstellen.

p101-YFP und p101-CFP:

Mittels PCR mit den Primern 5'-GTC CTC TCC TCA CAC GGT TCT T und 5'-GTC TAG AGG CAG AGC TCC GCT GAA AGT wurde ein Fragment generiert, welches das 3'-Ende der p101-cDNA mit einer Xba I-Schnittstelle anstelle des Stopcodons umfaßt, und in pcDNA3.1-V5/His/TOPO subkloniert. Das 5'-Ende dieses Fragments wurde dann durch das 5'-Ende der p101-cDNA mit Kozak-Sequenz vor dem Startcodon aus pcDNA3 (siehe oben) ersetzt, und zwar über die Hind III- und Cla I-Schnittstellen. Schließlich wurde die komplette p101-cDNA mit Kozak-Sequenz und ohne Stopcodon aus dem Vektor pcDNA3.1-V5/His/TOPO in den Vektoren pcDNA3-YFP und pcDNA3-CFP umkloniert, und zwar über die Hind III- und Xba I-Schnittstellen.

p110 γ :

Mittels PCR mit den Primern 5'-GCC ACC ATG GAG CTG GAG AAC TAT AA und 5'-GGA TCC AGC TTT CAC AAT GTC TAT TG wurde die Kozak-Sequenz vor das

Startcodon der p110 γ -cDNA angehängt. Die so generierte p110 γ -cDNA mit Kozak-Sequenz wurde zunächst in den Vektor pcDNA3.1-V5/His/TOPO subkloniert, und von dort aus dann in den Vektor pcDNA3 umkloniert, und zwar über die Kpn I- und Xho I-Schnittstellen.

p110 γ -YFP:

Mittels PCR mit den Primern 5'-GCC ACC ATG GAG CTG GAG AAC TAT AA und 5'-GTC TAG AGC TGA ATG TTT CTC TCC CTT GT wurde die Kozak-Sequenz vor das Startcodon der p110 γ -cDNA angehängt und das Stopcodon durch eine Xba I-Schnittstelle ersetzt. Die so generierte p110 γ -cDNA mit Kozak-Sequenz und ohne Stopcodon wurde zunächst in den Vektor pcDNA3.1-V5/His/TOPO subkloniert, und von dort aus dann in den Vektor pcDNA3-YFP umkloniert, und zwar über die BamH I- und Xba I-Schnittstellen.

YFP-p110 γ -K833R:

Mittels ortsgerichteter Mutagenese mit den Primern 5'-ACA ATT GGA ATT ATC TTT AGA CAT GGT GAT GAT CTG CGC und 5'-GCG CAG ATC ATC ACC ATG TCT AAA GAT AAT TCC AAT TGT sowie unter Verwendung des *QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit* (nach den Angaben des Herstellers) wurde das A an Position 2498 der p110 γ -cDNA (Datenbanksequenz AF327656) in pcDNA3 nach G mutiert. Im YFP-p110 γ -Plasmid wurde dann das 3'-Ende der p110 γ -cDNA ohne Mutation durch das 3'-Ende mit der Mutation ersetzt, und zwar über die EcoR I- und BamH I-Schnittstellen.

YFP-p110 γ -CAAX:

Das freundlicher Weise von Andreas Schulz und Dr. Karsten Spicher aus unserem Institut zur Verfügung gestellte p110 γ -CAAX-Konstrukt (in pFastBac) enthält anstelle des Stopcodons der p110 γ -cDNA das 3'-Ende der cDNA für H-Ras, genauer die Sequenz für seine 18 C-terminalen Aminosäuren, also neben dem Farnesylierungs-Motiv CAAX auch beide möglichen Palmitoylierungsstellen. Im YFP-p110 γ -Plasmid wurde nun das 3'-Ende der p110 γ -cDNA durch das modifizierte 3'-Ende der p110 γ -cDNA des p110 γ -CAAX-Konstrukts in pFastBac ersetzt, und zwar über die EcoR I- und BamH I-Schnittstellen.

p110 γ -CAAX:

Das 3'-Ende der p110 γ -cDNA in pcDNA3 wurde durch das 3'-Ende der YFP-p110 γ -CAAX-cDNA ersetzt, und zwar über die EcoR I- und BamH I-Schnittstellen.

fMLP-Rezeptor (fMLP-R):

Mittels PCR mit den Primern 5'-GCC ACC ATG GAG ACA AAT TCC TCT CTC und 5'-TCA CTT TGC CTG TAA CTC CAC wurde die Kozak-Sequenz vor das Startcodon der fMLP-Rezeptor-cDNA angehängt. Die so generierte fMLP-R-cDNA mit Kozak-Sequenz wurde zunächst in den Vektor pcDNA3.1-V5/His/TOPO subkloniert, und von dort aus dann

in den Vektor pcDNA3 umkloniert, und zwar über die Hind III- und Xho I-Schnittstellen.

G α_{i2} :

Die G α_{i2} -cDNA wurde aus dem Vektor pcDNA1-Amp in den Vektor pcDNA3 umkloniert, und zwar über die Hind III- und Xba I-Schnittstellen.

H-Ras V12:

Das 3'-Ende der H-Ras-N17-cDNA in pcDNA3 wurde durch das 3'-Ende der H-Ras-V12-cDNA in pECFP-C1 ersetzt, und zwar über die Hind III- und BamH I-Schnittstellen.

3.2.2 Zellkultur, Transfektion und Mikroinjektion

HEK293-Zellen wurden in MEM Earle's Medium oder in DMEM mit 10 % FCS, 4 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin bei 5 bzw. 7 % CO₂ und 37 °C kultiviert und alle 3 bis 4 Tage nach Ablösen mit Trypsin/EDTA-Lösung im Verhältnis 1:10 in neue Zellkulturflaschen überführt.

Für Transfektionen wurden die Zellen 1 bis 3 Tage vorher in Kulturschälchen mit 3 oder 6 cm Durchmesser ausgesetzt, so daß sie am Tag der Transfektion etwa 50 - 70 % des Bodens bedeckten. Für geplante Fluoreszenz-mikroskopische Versuche wurden vorher Glasplättchen in die 3-cm-Schalen gelegt. Die Transfektion der subkonfluenten Zellen erfolgte mit Hilfe des FuGene 6 Transfektions-Reagenz nach Herstellerangaben. Für 3-cm-Schälchen wurden jeweils 2,5 μ g, für 6-cm-Schälchen jeweils 5 μ g cDNA insgesamt eingesetzt (ggfs. mit leerem pcDNA3 aufgefüllt).

Glatte Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) der Ratte wurden freundlicher Weise von PD Dr. Peter Reusch zur Verfügung gestellt (Reusch et al., 2001a, 2001b). Die intranukleäre Injektion von Plasmiden erfolgte mit Hilfe eines Eppendorf Mikromanipulators und Injektors. Für die intranukleäre Mikroinjektion wurden die Plasmide auf eine Konzentration von ca. 0,5 μ g/ml in der Injektionspipette verdünnt.

3.2.3 Immunoblot-Analyse von Ganzzell-Lysaten

Zur Gewinnung von Ganzzell-Lysaten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann direkt in 62,5 mM Tris/HCl, 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol (β -ME), 2 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau lysiert. Aliquots der Ganzzell-Lysate wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt (Sammegel: 6 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 125 mM Tris pH 6,8; Trenngel: 10 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 375 mM Tris pH 8,8; Laufpuf-

fer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS; Lauf: ca. 90 Minuten bei 100 - 150 V) (Lämmli, 1970). Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Hybond C extra, Amersham) transferiert (Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02 % SDS, 20 % Methanol; 90 Minuten bei 250 mA). Zur Kontrolle des Transfers wurden die transferierten Proteine mit Ponceau S reversibel angefärbt. Nach dem Blocken freier Membranareale durch Inkubation mit einer Blockierlösung (Roti-Block, Roth; mindestens 1 Stunde) wurden die Membranen für 1 Stunde oder über Nacht mit spezifischen Antisera oder Antikörpern inkubiert. Nach Waschen mit 10 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween (mindestens fünf mal 10 Minuten) wurde die Membran für eine Stunde mit einem Peroxidase-konjugiertem zweiten Antikörper gegen den ersten Antikörper inkubiert (POD-anti-Maus-IgG oder POD-anti-Kaninchen-IgG; Sigma). Nach weiterem Waschen (wie zuvor, aber zusätzlich anschließend noch einmal ohne Tween) wurden die gebundenen Antikörper durch eine Chemilumineszenz-Reaktion (ECL-Kit, Amersham) und Exposition auf Röntgenfilm nachgewiesen.

3.2.4 Gelfiltration

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM β -ME, 4 mM EDTA, 0,2 % Polyoxyethylen-10-Laurylether (C₁₂E₁₀), 200 μ M Pefabloc® SC, 30 μ g/ml TPCK, 30 μ g/ml Trypsin-Inhibitor, 50 mM Benzamidin resuspendiert, durch Homogenisieren mit einer Injektionskanüle (26 G) aufgeschlossen und ultrazentrifugiert (30 Minuten mit 100.000 x g bei 4 °C). Die Cytosole wurden auf eine 24 ml Superdex 200 Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgetragen und mit dem gleichen Puffer mit Hilfe des „ÄKTA purifier“ HPLC-Systems (Amersham Pharmacia) in Fraktionen à 0,5 ml eluiert. Aliquots der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot (wie in 3.2.3 beschrieben) analysiert.

3.2.5 Immunpräzipitation und in vitro PI-3-Kinase-Assay

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in 50 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM NaF, 2 mM β -ME, 1 % Nonidet P40, 2 mM Pyrophosphat, 2 mM Orthovanadat, 0,2 mM Pefabloc® SC, 50 μ g/ml Benzamidin, 10 μ g/ml Trypsin-Inhibitor, 10 μ g/ml TPCK resuspendiert, durch Homogenisieren mit einer Injektionskanüle (26 G) aufgeschlossen und ultrazentrifugiert (30 Minuten mit 100.000 x g bei 4 °C). Inzwischen wurde der anti-p110 γ -Antikörper an Protein A-Sepharose gebunden. Die Zellextrakte wurden mit Präzipitationspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM NaF, 1 % Nonidet P40, 2 mM Pyrophosphat, 2 mM Orthovanadat, 0,2 mM Pefabloc® SC, 50 μ g/ml Benzamidin) verdünnt und mit Antikörper-haltiger bzw. Antikörper-freier Protein

A-Sepharose über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Sepharose (2 Minuten mit 1000 x g) wurden nicht gebundene Proteine durch Waschen mit Präzipitationspuffer entfernt. Es folgten Waschschrte mit 1 M LiCl in 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 und mit 40 mM HEPES pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM β -Glycerophosphat, 7 mM MgCl₂. Zur Kontrolle der Immunpräzipitation wurden Aliquots der Proben mittels SDS-PAGE und Immunoblot (wie in 3.2.3 beschrieben) analysiert.

Die Überprüfung der Lipidkinase-Aktivität der präzipitierten PI-3-Kinase erfolgte wie von Maier et al. (1999) beschrieben nach folgendem Prinzip: PtdIns-4,5-P₂-haltige Lipidvesikel wurden hergestellt und mit der PI-3-Kinase, 120 nM gereinigten G β γ -Komplexen und [γ -³²P]ATP inkubiert (15 Minuten bei 37 °C), anschließend die Lipide extrahiert und mittels Dünnschicht-Chromatographie aufgetrennt und schließlich das gebildete radioaktive PtdIns-3,4,5-P₃ mit Hilfe eines Phosphoimagers detektiert.

3.2.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die subzelluläre Lokalisation der heterolog exprimierten fluoreszierenden Fusionsproteine wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) analysiert. Ein solches Mikroskop eignet sich besonders gut zur Untersuchung subzellulärer Strukturen. Bei einem herkömmlichen Mikroskop wird stets auch störendes Licht von außerhalb der Fokusebene aufgenommen. Vereinfacht ausgedrückt wird die gesamte Zelle vom „Boden“ bis zur „Decke“ betrachtet und dabei aber nur eine bestimmte Ebene scharf abgebildet. Bei einem konfokalen Mikroskop hingegen wird nur das Licht aus genau der Fokusebene detektiert, auf die auch das Anregungslicht fokussiert ist - daher auch der Name konfokales Mikroskop (Emptage, 2001). Mit einem CLSM ist es also möglich, eine definierte - je nach Einstellung etwa 1 μ M dicke - Schicht der Zelle zu betrachten.

Die Glasplättchen mit den darauf adhätierenden transfizierten oder mikroinjizierten Zellen wurden aus den Kulturschälchen entnommen, vorsichtig mit HBS-Puffer (10 mM HEPES pH 7,5, 128 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5,5 mM Glucose, 0,2 % BSA) abgespült, in eine Kammer eingespannt, mit HBS-Puffer (1 ml) überschichtet und schließlich mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 (Carl Zeiss, Oberkochen) mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4-Objektiv betrachtet. YFP wurde mit dem Licht eines Argon-Lasers mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das emittierte YFP-Fluoreszenzlicht durch einen 488-nm-Hauptfarbteiler und einen 505-nm-Langpassfilter detektiert. CFP wurde mit dem Licht eines Argon-Lasers mit einer Wellenlänge von 458 nm angeregt und das emittierte CFP-Fluoreszenzlicht durch einen 458 nm Hauptfarbteiler und einen 470 nm Langpassfilter detektiert. Die konfokalen Blenden wurden so eingestellt, daß die optischen Schichtdicken zwischen 0,5 und 1,5 μ M lagen.

Für die Darstellung der Zellkerne wurde 10 Minuten vorher bis-Benzimid ad 30 μM zum Puffer gegeben (3 μl 10 mM Stammlösung auf 1 ml). Das bis-Benzimid wurde mit dem Licht eines UV-Lasers mit einer Wellenlänge von 364 nm angeregt und sein Fluoreszenzlicht durch einen 375-nm-Hauptfarbteiler und einen 385-470-nm-Bandpassfilter detektiert.

3.2.7 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer

Eine weitere Anwendung von Fusionsproteinen mit verschiedenen Farbvarianten des GFP ist der erstmals 1996 beschriebene Nachweis der Interaktion zweier Proteine in lebenden Zellen mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) (Heim & Tsien, 1996; Pollok & Heim, 1999; van Roessel & Brand, 2001). Als FRET bezeichnet man die Strahlungs-unabhängige Energieübertragung von einem angeregten Fluorophor (Donor) auf ein benachbartes zweites Fluorophor (Akzeptor). Voraussetzung für FRET zwischen zwei Fluorophoren ist die Kompatibilität ihrer Anregungsenergien: Da keine zusätzliche Energie entstehen kann, muß die Anregungsenergie des Akzeptors geringer sein als die des Donors. Zwischen zwei Fluorophoren kann also Energie stets nur vom „kürzerwelligen“ auf das „längerwellige“ übertragen werden, also z. B. von CFP (Absorptionsmaximum bei 454 nm; Emissionsmaximum bei 490 nm) auf YFP (Absorptionsmaximum bei 510 nm; Emissionsmaximum bei 535 nm) (Abb. 6). Außerdem ist der FRET eine Funktion des Abstands der beiden Partner: Die FRET-Effizienz E (das ist der Anteil der Energie des angeregten Donors, die auf den Akzeptor übertragen wird) sinkt mit der sechsten Potenz des Abstandes r :

$$E = [1 + (r/R_0)^6]^{-1}$$

Hierbei ist R_0 der sogenannte Förster-Radius, bei dem die FRET-Effizienz 50 % beträgt (Förster, 1948). R_0 ist abhängig von der Kombination der Fluorophoren und liegt z. B. für das CFP-/YFP-Paar bei ca. 5 nm. Somit läßt sich FRET zwischen CFP und YFP noch bis zu einem Abstand von etwa 10 nm messen, bei dem die FRET-Effizienz dann bei etwa 1,5 % liegt. Das heißt praktisch, daß FRET zwischen einem CFP- und einem YFP-Fusionsprotein nur dann meßbar ist, wenn die beiden Proteine miteinander interagieren. Die Energieübertragung z. B. von CFP auf YFP durch FRET macht sich dadurch bemerkbar, daß es bei der Anregung des CFP nicht nur zu CFP-Fluoreszenz sondern zusätzlich auch zu YFP-Fluoreszenz kommt, was sich durch verschiedene Verfahren nachweisen läßt (siehe Abb. 6).

Bei den hier vorgestellten Experimenten wurde der FRET zwischen CFP und YFP durch Ausbleichen des Akzeptors (YFP) und gleichzeitige Messung der Donor-Fluoreszenz (CFP) bestimmt (siehe Abb. 6): Kommt es durch Wegnahme des Akzeptors zu einem Anstieg der Donor-Fluoreszenz, so ist dadurch nachgewiesen, daß zwischen den beiden Fluorophoren FRET stattgefunden hat (Kenworthy, 2001). Das Ausmaß des Anstiegs der Donor-Fluoreszenz durch komplettes Ausbleichen des Akzeptors ist proportional zur FRET-Effizienz.

Die Glasplättchen mit den darauf adhären den transfizierten Zellen wurden aus den Kulturschälchen entnommen, vorsichtig mit HBS-Puffer (10 mM HEPES pH 7,5, 128 mM NaCl, 6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 5,5 mM Glucose, 0,2 % BSA) abgespült, in eine Kammer eingespannt, mit HBS-Puffer (1 ml) überschichtet und schließlich mit einem invertierten Axiovert 100 Mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) durch ein Plan-Apochromat 63x/1,4-Objektiv betrachtet, an das eine gekühlte CCD-Kamera (IMAGO, Till-Photonics, Martinsried) gekoppelt war. CFP und YFP wurden mit Licht der Wellenlängen 440 bzw. 480 nm aus einem angeschlossenen Monochromator (Polychrome II, TILL-Photonics, Martinsried) angeregt. Für die Messung der CFP- und YFP-Fluoreszenzen wurden ein halbdurchlässiger Spiegel (80 % Transmission, 20 % Reflexion) und ein Emissionsfilterwechsler mit den Bandpassfiltern 475 - 505 nm (für CFP-Fluoreszenz) und 535 - 565 nm (für YFP-Fluoreszenz) verwendet. Zur Bestimmung des FRET wurde nach Aufnahme der initialen CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten das YFP (Akzeptor) durch längere Belichtungszeit ausgebleicht, das heißt zerstört, so daß keine Energie mehr vom CFP auf das YFP übertragen werden konnte (*acceptor bleach*). Der resultierende Anstieg der Fluoreszenz des Donors (CFP) entspricht dem FRET vor dem Ausbleichen des Akzeptors.

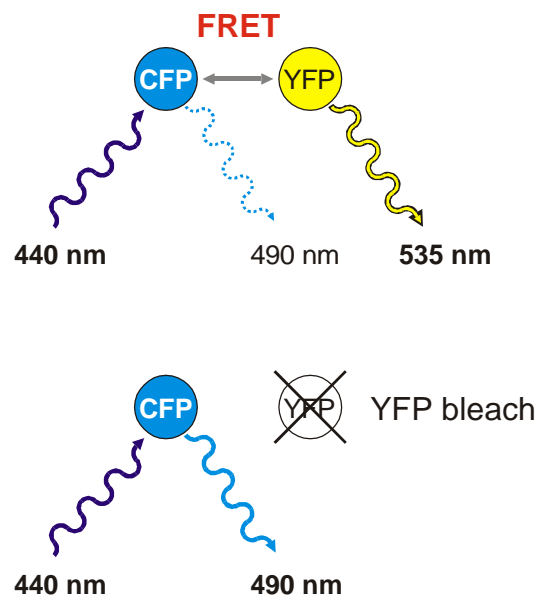


Abb. 6: Bestimmung des FRET zwischen CFP und YFP. Je geringer der Abstand der beiden Fluorophore zueinander ist, um so mehr Energie wird durch FRET von CFP auf YFP übertragen. Durch den FRET wird die Fluoreszenz des angeregten CFP um den der transferierten Energie entsprechenden Anteil vermindert. Die vom YFP aufgenommene Energie wird als YFP-Fluoreszenz abgestrahlt. Wird das YFP durch Ausbleichen zerstört (*YFP bleach*), kann kein FRET mehr stattfinden, so daß die CFP-Fluoreszenz nicht mehr durch den FRET vermindert wird. Die Zunahme der CFP-Fluoreszenz durch Ausbleichen des YFP ist proportional zur FRET-Effizienz, das heißt zum Anteil der (vor dem Ausbleichen) durch FRET übertragenen Energie des CFP.