

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Enzyme und Labormaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien analysenrein von den Firmen Merck, Roth und Sigma bezogen.

Die eingesetzten Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas, Roche Molecular Biochemicals und New England Biolabs bezogen.

Verwendetes Plastikmaterial für das Labor sowie die Zellkultur stammte von den Firmen Nunc, Greiner, Millipore und Costar.

2.1.2. Verwendete Antikörper

2.1.2.1. Primäre Antikörper

Antikörper	Konzentration (WB)-Western Blot; (IH)-Immunhistochemie; (IC)- Immunzytologie (WH)- „Whole-mount“	Bezug/Firma
Kaninchen anti cGKI α (verschiedene Chargen)	1:500 (WH, IH, WB) 1:20 (IH, IC), 1:80 (WB)	Jens Schlossmann, München
Kaninchen anti cGKI β	1:500 (WH)	Jens Schlossmann
Kaninchen anti trkA	1:2000 (IH), (WH)	Louis F. Reichert, San Francisco
Kaninchen anti trkA	1:1000 (IH)	Fa. Chemicon
Kaninchen anti VASP	1:5000 (WB)	Frank B. Gertler, Cambridge
Kaninchen anti Mena Maus anti Mena	1: 5000 (WB) 1:10 (WB)	Frank B. Gertler
Maus anti 2H3, (165 kD Neurofilament-Protein)	0,1 μ g/ml (WH)	Dev. Studies Hybridoma Bank, Iowa
Kaninchen anti nNOS	2 μ g/ml (IH)	Fa. Zytomed
Kaninchen anti Calbindin	1:2000 (IH)	Fa. Chemicon
Kaninchen anti Maus L1	3 μ g/ml (WB)	AG Rathjen
Maus anti Dnmt3a	2 μ g/ml (WB)	Fa. Imgenex
Maus anti FLAG M2	1 μ g/ml (IC)	Fa. Sigma
Maus anti FLAG M5	0,5 μ g/ml (WB)	Fa. Sigma
Maus anti γ -tubulin	1:10000 (WB)	Fa. Sigma

2.1.2.2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konzentration (WB)-Western Blot (IH)- Immunhistochemie (IC)- Immunzytologie (WH)- „Whole-mount“	Bezug/Firma
Ziege anti Kaninchen -cy3	1:400 (IH), 1:200 (IC)	Dianova
Ziege anti Maus -cy3	1:400 (IH)	Dianova
Ziege anti Kaninchen -HRP	1:25000 (WB) 1:400 (WH)	Dianova
Ziege anti Maus - HRP	1:25000 (WB), 1:400 (WH)	Dianova
Ziege anti Kaninchen-AP	1:3500 (WB)	Dianova
Ziege anti Maus- AP	1:3500 (WB)	Dianova
Ziege anti Maus Alexa 488	1:200 (IC)	Molecular Probes

2.1.3. Verwendete Programme und Datenbanken

Folgende Computerprogramme und Datenbanken wurden für die Erstellung der vorliegenden Arbeit genutzt:

- Microsoft Word und Microsoft Excel
- Adobe Photoshop 7,0
- CorelDraw 11
- DNASTAR
- Delta 2D 3.3 (Decodon)
- GraphPad
- ImageJ
- Reference Manager 10
- PubMed, BLAST, Prosite, OMIM von NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- SwissProt, Prosite und Compute pI/Mw von ExPasy: <http://www.expasy.org/>
- iHOP: <http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/>
- NetPhos 2,0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

2.1.4. Versuchstiere

Tiere folgender Mäusestämme wurden zu Versuchen in der vorliegenden Arbeit genutzt:

- cGK I (erhalten von Franz Hofmann, München (Pfeifer et al., 1998))
- Myosin IIB (erhalten von Robert Adelstein, Bethesda (Tullio et al., 1997))
- Myosin IIB-delta, hypomorph (erhalten von Robert Adelstein, Bethesda (Uren et al., 2000))
- VASP KO (erhalten von Reinhard Fässler, München (Aszodi et al., 1999))

- CRP2 (erhalten von Matthias Sausbier, Tübingen)
- C57Bl6 (Hauszucht; Charles River; Tierzucht Berlin-Schönwalde)
- SVF 129 (Hauszucht)

2.2. Methoden

2.2.1. Histologische Methoden

2.2.1.1. Beschichtung von Objektträgern mit Gelatine

5 g Blattgelatine (Merck) wurden in einem Liter Aqua dest. über Nacht bei Raumtemperatur und anschließend für ca. 30 min bei 60°C gelöst. Dann wurde 0,5 g $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (Merck) zugegeben und gut gerührt.

Die Glasobjektträger wurden über Nacht mit verdünntem Spülmittel (Extran) inkubiert und danach mehrmals mit heißem und kaltem Wasser gespült. Anschließend wurden sie kurz in eine 10 % ige HCl Lösung getaucht und erneut mit Wasser gewaschen. Danach wurden die Objektträger kurz in die Gelatinelösung getaucht, bei 37°C über Nacht getrocknet und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.1.2. Anfertigung von Gewebeschnitten

Das präparierte Gewebe wurde in PBS mit 4 % Paraformaldehyd, 0,32 M Saccharose je nach Gewebetyp 4-5 h oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler fixiert und anschließend unter gleichen Bedingungen in 30 % Saccharose in PBS gesättigt. Anschließend wurden die Gewebe auf Trockeneis in Tissue Tek (Sakura) eingebettet.

Von den Präparaten wurden mit einem C-Messer serielle Schnitte (16-18 µm Schnittdicke) an einem Gefriermikrotom Jung CM 3000 (Leica) angefertigt, diese auf Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen und bei -20°C oder -70°C gelagert.

2.2.1.3. Immunhistochemie an Gewebeschnitten

Die Schnitte wurden zunächst aufgetaut und für 1-2 h getrocknet. Zur Reduktion einer unspezifischen Färbung wurde mit 10 % Ziegen Serum (Invitrogen) in PBS mit 0,1 % Tween 20 (Sigma Ultra) eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend erfolgte über Nacht bei 4°C die Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in 5 % Ziegen Serum in PBS; 0,1 % Tween 20). Nach drei Waschschritten (je 10 Minuten) in PBS mit 0,1 % Tween 20 wurden die Schnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in 5% Ziegen Serum in PBS mit 0,1% Tween 20) inkubiert. Nach drei Waschschritten (à 10 min) wurden bei Verwendung eines Cy3-gekoppelten sekundären

Antikörpers die Schnitte für 10 min in 4 % Formaldehyd in PBS nachfixiert, anschließend noch zweimal gewaschen und schließlich in 10 % Mowiol eingedeckelt. Bei Verwendung eines HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers wurden die Schnitte nach dem Waschen in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Permount (Fisher Scientific) eingedeckelt. Die Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgte am konfokalen Mikroskop MRC 1000 (BioRad) bzw. am Axiovert 135 mit der Kamera AxioCam HRC (Zeiss).

- **Waschpuffer:** PBS (Biochrom AG) mit 0,1 % Tween 20 (Sigma Ultra)
- **10 % Mowiol:** 2,4 g Mowiol (Calbiochem); 15,6 ml H₂O; 2,4 ml 1 M Tris pH 8,5
über Nacht lösen lassen und 6 ml Glycerin zugeben, aliquotieren und bei -20°C lagern.

2.2.1.4. Modifizierte Bielschowsky-Färbung für die Zellkörper- und Faserfärbung

Die Modifizierte Bielschowsky-Färbung kombiniert eine einfache Silberfärbung mit einer Nisslfärbung durch Kresylviolett. Bei der Nisslfärbung werden die für Nervenzellen spezifischen, so genannten Nisslschollen (Stapel des rauhen endoplasmatischen Retikulums) im Zellkörper gefärbt, während durch die Silberfärbung die Neuriten und Axonkollaterale dargestellt werden.

Mit Hilfe dieser Übersichtsfärbung wurden serielle Hirnschnitte cGKI-defizienter Mäuse hinsichtlich morphologischer Veränderungen mit Hirnschnitten von Wildtyp-Mäusen verglichen. Hierzu wurden die aufgezogenen und über Nacht luftgetrockneten Schnitte fünf Minuten in 96 %igem Ethanol getaucht. Dann wurden sie fünf Minuten lang in 70 %igem Ethanol inkubiert und anschließend 10 min in H₂O_{dest} gewässert. Daraufhin wurden die Präparate ca. 40 min in Lösung A gegeben, dann ca. 1-5 s in Lösung B getaucht und kurz in der Lösung C inkubiert. Die Präparate wurden fünf Minuten in H₂O_{dest} gewaschen und zur Nisslfärbung ca. vier Minuten in die Kresylviolettlösung eingetaucht. Zur Differenzierung der Färbung wurden sie fünf Sekunden in Lösung D überführt und anschließend entwässert (5 min 70 % Ethanol, 5 min 96 % Ethanol). Abschließend wurden die Präparate fünf Minuten in Isopropanol inkubiert und in Permount (Fisher Scientific) eingedeckelt. Die Auswertung und fotografische Dokumentation erfolgte am Axiovert 135 mit der Kamera AxioCam HRC (Zeiss).

- **Lösung A:** 1 % AgNO₃ (Merck) ; 1 % Pyridin
- **Lösung B:** besteht aus drei Teillösungen, die getrennt angesetzt werden und in der genannten Reihenfolge zugegeben werden. Die Zugabe von Teillösung B3 sollte unter ständigem Rühren erfolgen, wobei die Lösung erst kurz braun werden sollte und dann sofort wieder aufklaren sollte.
 - **Lösung B1:** 2,75 g AgNO₃ in 110 ml H₂O lösen
 - **Lösung B2:** 65 ml 96 %iges Ethanol
 - **Lösung B3:** 13 ml 2,5 %iges NaOH; 11 ml konzentrierte NH₃-Lösung
- **Lösung C:** 0,03 g Zitronensäure in 270 µl 37% iger Formaldehydlösung lösen, 30 ml absoluten Ethanol zugeben und mit H₂O auf 250 ml auffüllen.
- **Lösung D:** 2,5 ml Eisessig; 40 ml absoluten Ethanol zugeben und mit H₂O auf 250 ml auffüllen
- **Kresylviolettlösung:** 0,5 g Kresylviolett in 100 ml H₂O lösen und 10 Tropfen konzentrierten Eisessig zugeben

2.2.1.5. Ganzkörperfärbungen von Embryonen/ „whole-mount staining“

Die Methode der Ganzkörperfärbung wurde bei den Untersuchungen zur Expression der Kinase und in cGKI-defizienten Mäusen bei der Fehleranalyse des embryonalen Nervensystems genutzt. Sie ermöglicht einen guten, dreidimensionalen Überblick über gefärbte Strukturen, ist aber methodisch auf Embryonalstadien bis ca. E12,5 beschränkt. Die Färbung erfolgte leicht modifiziert nach Klymkowsky und Hanken (Klymkowsky and Hanken, 1991).

Die präparierten Embryonen wurden über Nacht in 4 % Formaldehyd in PBS bei 4°C geschüttelt. Anschließend erfolgte, wieder über Nacht bei 4°C, ein zweiter Fixierschritt in Dent's Fixativ (4 Teile Methanol, 1 Teil DMSO). Danach wurden die Embryonen zum Bleichen in 10 % H₂O₂ in Dent's Fixativ ca. 5-6 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die Präparate mit 95 % FCS, 5% DMSO über Nacht bei 4°C blockiert und danach mit dem primären Antikörper (verdünnt in 95 % FCS, 5% DMSO) über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach fünf, je einständigen Waschschritten, bei Raumtemperatur in PBS, schloss sich die Inkubation mit dem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper (1:400 Verdünnung in 95 % FCS, 5 % DMSO) über Nacht bei 4°C an. Nach erneutem fünfmaligen Waschen je eine Stunde in PBS, wurden die Embryonen vor der DAB-Reaktion für 20 min mit einer DAB-Lösung: 5 ml H₂O mit 2 Tropfen Pufferlösung, 4 Tropfen DAB-Lösung und 2 Tropfen Nickellösung (DAB-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA. USA) inkubiert. Die eigentliche Ausfällung des schwarzbraunen Niederschlages erfolgte durch Austauschen der Lösung gegen 5 ml H₂O mit je 2 Tropfen der Pufferlösung und Wasserstoffperoxidlösung (DAB-Kit). Die Farbentwicklung wurde mit Methanol gestoppt,

gefolgt von 2 Waschschritten, je 15-30 min mit Methanol sowie einen über Nacht. Anschließend wurden die Embryonen in einem Benzylalkohol/Benzylbenzoat-Gemisch (Verhältnis 1:3) aufgeklart und an einem Mikroskop (Axiovert 135 mit Kamera Axioacam HRC (Zeiss)) ausgewertet und fotografiert.

2.2.1.6. Immunzytologie

Die Zellen (COS 7 bzw. HEK293) wurden auf mit 0,5 mg/ml Collagen beschichtete Objektträger aufgebracht und über Nacht in DMEM (Fa. Invitrogen/Gibco) mit 10 % FCS (fetal calf serum, Fa. Invitrogen/Gibco) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen kurz mit kaltem PBS gewaschen und für 15 min bei 4°C mit 4 % Formaldehyd/PBS fixiert. Zellen, die mit dem cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP stimuliert werden sollten sowie die unstimulierten Kontrollzellen, wurden nach der Kultivierung über Nacht zunächst zweimal mit FCS freiem DMEM gewaschen und dann für 4-12 Stunden in FCS freiem DMEM kultiviert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für 40-45 min mit 1 mM 8-pCPT-cGMP in DMEM ohne FCS inkubiert und der andere Teil als Kontrollzellen unbehandelt belassen. Die Zellen wurden dann ebenfalls kurz mit kaltem PBS gewaschen und für 15 min bei 4°C mit 4 % Formaldehyd/PBS fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch eine 10 minütige Inkubation mit 0,1% TritonX-100/PBS bei Raumtemperatur. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen für 30 min mit 1% BSA/PBS blockiert und anschließend 1-12 h mit dem primären Antikörper (verdünnt in 1% BSA/PBS) inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit dem Fluoreszenz-gekoppelten, sekundären Antikörper für 45 min bei 37°C inkubiert, erneut dreimal mit PBS gewaschen und schließlich mit Mowiol eingedeckelt oder alternativ bei einer Doppelfärbung erneut einer Inkubation mit einem primären und sekundären Antikörper unterzogen.

- **10 % Mowiol:** 2,4 g Mowiol (Calbiochem); 15,6 ml H₂O; 2,4 ml 1 M Tris pH 8,5
über Nacht lösen lassen und 6 ml Glycerin zugeben, aliquotieren und bei -20°C lagern.

2.2.2. Biochemische Methoden

2.2.2.1. Gewinnung von Proteinextrakten aus Geweben

Zur Erstellung eines Expressionsprofils der cGKI α in verschiedenen Hirnteilen (Bulbus olfactorius, Hippocampus, Cortex, Hypothalamus, Cerebellum) und Entwicklungsstadien, wurde das Gewebe von den jeweiligen C57Bl6 WT-Mäusen präpariert und gewogen. Pro mg Gewebe wurden 5 μ l des Homogenisationspuffers zugegeben und mit Eppendorf-

Homogenisatoren homogenisiert. Das Homogenisat wurde zunächst für 20 min, bei 4°C und 13000 upm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, anschließend der Überstand für 30 min bei 4°C und 45000 upm in einer Ultrazentrifuge. Der Überstand wurde photometrisch vermessen (280nm), mit Laemmli-Puffer versetzt, aufgeköcht und bis zur Auftrennung mittels SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt.

- **Homogenisationspuffer:** 20 mM HEPES; 1% OGP (n-Octylglucoside, Fa. ROCHE) pH-Wert 7,4; 40U/ml Aprotinin; 10 µM Pepstatin; 10 µM Leupeptin; 200 µM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
- **5x Laemmli-Puffer:** 60 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 1,5 % Bromphenolblau

2.2.2.2. Gewinnung von Proteinextrakten aus Zelllinien

Die konfluenten Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 % TritonX-100 in PBS mit Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin) für 20 min bei 4°C geschüttelt. Dann wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, mit einer feinen Kanüle (Ø 0,4 mm) homogenisiert und 30 min bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Laemmli-Puffer versetzt und aufgeköcht und bis zur Verwendung im SDS-PAGE bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.2.3. Gewinnung der Zytosol- und Membran-Fraktion von HEK293-Zellen

Nach zweimaligem Waschen der konfluenten HEK293-Zellen mit eiskaltem PBS, wurde mit Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin) versetztes PBS zugegeben, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und mit einer feinen Kanüle (Ø 0,4 mm) homogenisiert. Das Zell-Lysat wurde dann 10 min, bei 4°C und 5000 g zentrifugiert und der gewonnene Überstand wiederum in einer Ultrazentrifuge bei 4°C und 100.000 g für 1 h zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde als Zytosol-Fraktion verwendet, das Pellet in PBS mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und als Membran-Fraktion genutzt.

2.2.2.4. Gewinnung der Kern-Fraktion von HEK293-Zellen

Nach zweimaligem Waschen der konfluenten HEK293-Zellen mit eiskaltem PBS wurde mit Proteaseinhibitoren (10 µM Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 µM PMSF, 10 µM Pepstatin) versetztes PBS zugegeben (10 ml pro 10 cm Schale), die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und 5 min bei 4°C und 300 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem

Hypotonischen-Puffer (HB-Puffer) resuspendiert und für 15 min auf Eis schwellen gelassen. Anschließend wurde 50 µl 10 % NP-40 zugegeben, kurz gemischt und die Lösung in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 13000 upm für 30 s zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1ml HB-Puffer mit 0,1 % TritonX-100 gewaschen und erneut für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 50 µl eiskaltem RIPA-Lysis-Puffer resuspendiert und 30 min auf Eis geschüttelt. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14000 g für 10 min wurde der Überstand als nukleärer Zell-Extrakt genutzt.

- **HB-Puffer (pH 7,5):** 20 mM Hepes, 10 µM Na₂MoO₄, 0,1 mM EDTA
- **RIPA-Lysis-Puffer:** 50 mM Tris/HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 1 mM EDTA, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 1 mM DTT, 40U/ml Aprotinin; 10 µM Pepstatin; 10 µM Leupeptin; 200 µM Phenylmethylsulfonylfluorid

2.2.2.5. Präparation und Stimulation von Spinalganglien mit 8-pCPT-cGMP

Von jedem Embryo wurden pro Körperhälfte jeweils 20 Spinalganglien (zervikale, thorakale sowie lumbale Spinalganglien enthaltend) herauspräpariert und in HBSS (Hanks balanced salt solution, Fa. Invitrogen/Gibco) in zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen auf Eis gesammelt. Eine Probe wurde später mit dem cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP (Fa. Biolog) behandelt (Probe A), die andere diente als Kontrolle (Probe B). Nach der Präparation wurden die Proben in einer Tischzentrifuge bei 4°C für 5 min bei 200 g zentrifugiert, das Medium abgesaugt und durch 35 µl frischem HBSS ersetzt. Anschließend wurden als Phosphataseinhibitoren pro Reaktionsgefäß jeweils 5 µl 1 µM Okadain Säure (Fa. Alexis) sowie 1 µM Calyculin A (Fa. Alexis) zugegeben (Enkonzentration im 50µl Ansatz: 0,1 µM) und noch mal für 1 min bei 200 g zentrifugiert.

Danach wurde zur Probe A 5µl 10 mM 8-pCPT-cGMP (Fa. Biolog) in PBS (Endkonzentration 1 mM) und zur Kontrollprobe B 5 µl PBS gegeben, und sofort bei 37°C inkubiert (je nach Versuch 1 min bis 1 h). Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit wurden die Proben mit einem Eppendorf-Homogenisator homogenisiert, mit 12,5 µl 5 x Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min aufgekocht. Die Lagerung bis zur anschließenden SDS-PAGE erfolgte bei -20°C.

Die Embryonalhüllen der Embryonen wurden als Gewebe für die Genotypisierung genutzt (siehe Kap. 2.2.3.1.).

- **5x Laemmli-Puffer:** 60 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 1,5 % Bromphenolblau

2.2.2.6. Dephosphorylierung mit λ – Protein-Phosphatase

Jeweils 20 Spinalganglien wurden in 49 μ l des folgenden Puffers homogenisiert:

- 1x λ – Protein-Phosphatase Puffer (Fa. BioLabs), 2 mM $MnCl_2$, 10 μ M Pepstatin, 10 μ M Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 μ M PMSF

Nach Zugabe von 1 μ l (=400 units) λ – Protein-Phosphatase wurde der Ansatz 30 min bei 30°C inkubiert. In die Kontrollprobe wurde vor der Inkubation statt der λ – Protein-Phosphatase die entsprechende Menge des obigen Puffers gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Puffer gestoppt und die Proben anschließend 5 min bei 95°C aufgeköcht.

- **5x Laemmli-Puffer:** 60 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 1,5 % Bromphenolblau

2.2.2.7. SDS –PAGE und Western Blot

Für die immunologische Detektion von Proteinen wurden diese mit Laemmli-Puffer versetzt und durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer „Mini Protean II“-Apparatur (BioRad) bei 180 mV aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Größen der aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe eines Massenstandards (BioRad) ermittelt. Mittels Western Blot wurden die Proteine mit der „Mini Transblot-Apparatur“ (Biorad) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell, BioScience GmbH) transferiert (340 mA, 4°C). Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in Blockierungspuffer geschüttelt. Die Inkubation mit dem in Blockierungspuffer verdünnten primären Antikörper, erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei Waschschritten (je 10 min), wurde die Membran mit einem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper (1:25000 in Blockierungspuffer verdünnt) bzw. alternativ, mit einem sekundären, AP-gekoppelten Antikörper (1:3500 in Blockierungspuffer verdünnt) für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde wie zuvor gewaschen, gefolgt von einem zehnminütigen Waschschriff in PBS bzw. in AP-Puffer. Bei Verwendung eines HRP-gekoppelten Antikörpers erfolgte die Detektion mit dem „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ (Pierce) nach Angaben des Herstellers auf „Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film“ (Roche) mit Hilfe einer Fotoentwicklermaschine Curix 60 (Agfa). Bei Verwendung eines AP-gekoppelten Antikörpers wurde die Membran in AP-Puffer mit 165 μ g/ml NBT-Lösung und 82,5 μ g/ml BCIP-Lösung entwickelt.

- **5x Laemmli-Puffer:** 60 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 1,5 % Bromphenolblau
- **Polyacrylamidgel:** 1 M Tris/HCl (pH 8,8 und pH 6,8), dest. H₂O, 30 % Acrylamid und 0,8 % PDA (BioRad), 10 % Ammoniumpersulfat (BioRad), TEMED (BioRad)
- **Laufpuffer:** 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS
- **Transferpuffer:** 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 190 mM Glycin, 20 % Methanol
- **Blockierungspuffer:** 4 % Magermilchpulver, 1x PBS, 0,5 % Tween 20
- **Waschpuffer:** 1x PBS mit 0,5 % Tween 20
- **AP-Puffer:** 100 mM Tris/HCl pH 9,7; 5 mM MgCl₂; 0,01 mM ZnCl₂
- **NBT- Lsg.:** 50 mg/ml in 70 % Dimethylformamid (DMF)
- **BCIP- Lsg.:** 50 mg/ml in 100 % DMF

2.2.2.7.1. Dokumentation und Quantifizierung der Blots

Die entwickelten Filme bzw. Nitrocellulosemembranen wurden mit einem Flachbettscanner Arcus 1200 (Agfa) mit Hilfe der Software Agfa Foto Look 3.5 gescannt (16 bit, 600ppi) und als Tif Datei gespeichert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte anschließend mit dem Programm ImageJ.

2.2.2.8. Immunpräzipitation

24 h nach der Transfektion (siehe Kap. 2.2.3.4.) wurden die COS 7-Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und pro Schale mit 1150 μ l 1 % TritonX-100 in PBS mit Proteaseinhibitoren (10 μ M Leupeptin, 40 U/ml Aprotinin, 200 μ M PMSF, 10 μ M Pepstatin) für 20 min bei 4°C geschüttelt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, mit einer feinen Kanüle (\varnothing 0,4 mm) homogenisiert und 30 min bei 4°C und 100.000 g zentrifugiert. In dieser Zeit wurde der Agarose gekoppelte Anti-FLAG Antikörper (Anti-FLAG M2 Affinity Gel, Fa. Sigma) für die Immunpräzipitation (IP) wie folgt vorbereitet. Nach dem Vortexen wurden pro Ansatz 28 μ l der uniformen Suspension entnommen und für 30 s bei 5000 g zentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen, und schließlich pro Ansatz mit 1 % TritonX-100/PBS auf 100 μ l aufgefüllt. Diese 100 μ l wurden anschließend zu 1000 μ l des Überstands vom Zell-Lysat gegeben und für 4 h, bei 4°C inkubiert. Ein Teil des Zell-Lysat-Überstandes wurde für die spätere Bestimmung der Effizienz der IP entnommen, mit Laemmli-Puffer versetzt und aufgeköcht.

Nach der Inkubation des Zell-Lysats mit dem M2 Antikörper wurden die Proben bei 4°C und 500 g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder zur Bestimmung der Effizienz der IP entnommen. Das Präzipitat wurde mit 450 μ l 1 % TritonX-100/PBS vermischt, auf eine

Ultrafree MC Säule gegeben und bei 4°C für 30 s und 500 g zentrifugiert. Nach drei Waschschritten mit je 450 µl 1 % TritonX-100/PBS wurden die Präzipitate mit je 30 µl Laemmli-Puffer bei 95 °C eluiert. Die Auftrennung der Eluate erfolgte mittels SDS-PAGE, die Detektion der FLAG-Präzipitate im Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen FLAG (M5, Fa. Sigma) und die Detektion der cGKI-Kopräzipitate mit einem polyklonalen Antikörper gegen cGKI α .

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie z.B. Medienherstellung, Agarosegelelektrophorese, Restriktionsenzymverdau, Klonierung und Ligation wurden nach den von Sambrook und Kollegen beschriebenen Protokollen durchgeführt (Sambrook et al., 1989).

2.2.3.1. Genotypisierung

2.2.3.1.1. Isolierung genomischer DNA

Für die Genotypisierung von Mäusen wurde die genomische DNA (gDNA) mit dem „High Pure PCR Isolation Kit“ (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers isoliert. Als Ausgangsmaterial diente Gewebe vom Schwanz bzw. Embryonalhüllen.

2.2.3.1.2. Primer/Oligonukleotide

Primer MyoIIB 1: TCT CTT CCA GAG GCA ATT ACT

Primer MyoIIB 20: TAA AGC GCA TGC TCC AGA CT

Primer MyoIIB 24: TCC GTC CTG AAT AGT AGC GGT

Primer cGKI RF53: CCT GGC TGT GAT TTC ACT CCA

Primer cGKI 1108: CAG CTC TAC TCG TCC GAA ACC

Primer cGKI RF88: ACA CAT TCC ACA GCT GGT TCT

2.2.3.1.3. PCR

25 µl Reaktionsansatz für cGKI:

13,25 µl	H ₂ O
2,5 µl	10x LA PCR Puffer (TaKaRa Bio Inc.)
2,5 µl	25 mM MgCl ₂ (TaKaRa Bio Inc.)
4 µl	dNTP Mischung (TaKaRa Bio Inc.)
0,5 µl	Primer cGKI RF53 (25 mM)
0,5 µl	Primer cGKI RF88 (25 mM)

0,5 µl	Primer cGKI 1108 (25 mM)
1 µl	gDNA (unverdünnt)
0,25 µl	TaKaRa LA Taq Polymerase (5 units/µl)

PCR Protokoll für cGKI:

94°C/5min

94°C/10s, 55°C/30s, 35 Zyklen

72°C/10min

4°C/∞

25 µl Reaktionsansatz für Myosin II B:

17,2 µl	H ₂ O
2,5 µl	10x LA PCR Puffer (Invitrogen)
0,75 µl	50 mM MgCl ₂ (Invitrogen)
2 µl	dNTP Mischung (TaKaRa Bio Inc.)
0,4 µl	Primer MyoIIB 1 (WT Reaktion) bzw. Primer MyoIIB 20 (Neo-Reaktion)
0,4 µl	Primer MyoIIB 24
1,5 µl	gDNA (unverdünnt)
0,5 µl	Taq DNA Polymerase (5 units/µl; Invitrogen)

PCR Protokoll für Myosin IIB:

95°C/3min

94°C /30s, 55°C/30s, 72°C/30s, 32 Zyklen

72°C/7min

4°C/∞

Die PCR wurde mit der PCR Maschine „Mastercycler Gradient“ (Eppendorf) durchgeführt, die PCR- Produkte anschließend in einem 2 % igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der „ChemiDoc“ (Biorad) dokumentiert.

2.2.3.2. Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA- Fragmente wurden nach deren gelelektrophoretischen Auftrennung unter Verwendung des Kits „QiaQuick“ (Qiagen) isoliert.

2.2.3.2. Plasmid-DNA Präparation

Die Präparation von Plasmid DNA erfolgte mit dem „Plasmid Mini Kit“ bzw. „Plasmid Midi Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.3. Transformation

2.2.3.3.1. Chemokompetente E.coli DH5 α

Die Erzeugung chemokompetenter Bakterien erfolgte nach der “Frozen Storage III” Methode (Hanahan, 1985).

2.2.3.3.2. Transformation von DH5 α

100 μ l der kompetenten DH5 α Bakterien (AG Rathjen) wurden auf Eis aufgetaut, dann mit 10 μ l (1 μ l DNA-Plasmid +9 μ l H₂O) des Ansatzes vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem 2 minütigen Hitzeschock bei 42°C wurde der Ansatz 90 s auf Eis abgekühlt, anschließend mit 390 μ l vorgewärmten LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C geschüttelt. 50 μ l des Ansatzes wurden danach auf eine LB-Agarplatte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

- **LB Medium:** 10 g/l Trypton (BD-Bioscience Clontech), 5 g/l Hefeextrakt (BD-Bioscience Clontech), 10 g/l NaCl (Merck); pH 7,0; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **LB Agar:** LB Medium mit 1,5 % Agar Agar (Roth) mit 100 μ g/ml Ampicilin (Sigma) bzw. 25 μ g/ml Kanamycin

2.2.3.4. Transfektion der Zelllinie COS 7 mit Lipofectamine 2000

Das Lipofectamine 2000 (Invitrogen) wurde gevortext und pro Transfektionsansatz 20 μ l zu 500 μ l DMEM gegeben, gemischt und 5 min inkubiert. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 8 μ g der zu transfizierenden DNA zu 500 μ l DMEM gegeben und ebenfalls gemischt. Anschließend wurden beide verdünnten Ansätze zusammengegeben und vermischt. Nach einer 20 minütigen Inkubationszeit wurde der Ansatz zu 90-95% konfluenten Zellen in DMEM gegeben (6 cm Schalen) und gleichmäßig verteilt. Nach 4 h Inkubation im 37°C Schrank wurde das Medium gegen DMEM mit 10% FCS ausgetauscht.

Verwendete Plasmide:

- pcDNA3.1+[cGKI α ORF] wurde freundlicherweise von Dr. Hannes Schmidt (AG Rathjen, MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt
- pCMV-FLAG [Syntenin1] wurde freundlicherweise von Dr. Michael Koroll (AG Rathjen, MDC, Berlin) zur Verfügung gestellt

Alle folgenden Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Cristina Cardoso (AG Cardoso, MDC, Berlin) und Prof. Dr. Heinrich Leonhardt (AG Leonhardt, Uni München) zur Verfügung gestellt und sind u.a. in den folgenden Publikationen beschrieben worden: (Margot et al., 2001; Easwaran et al., 2004; Grohmann et al., 2005)

- pCR3.1-FLAG [Dnmt3a1] mit N-terminalem FLAG
- pCR3.1-FLAG [Dnmt3b1] mit N-terminalem FLAG
- pCR3.1-FLAG [Dnmt1] mit N-terminalem FLAG
- pCR3.1-FLAG [N-Terminus Dnmt1]: mit N-terminalem FLAG, entspricht den Aminosäuren 1-1134 der Dnmt1
- pCR3.1-FLAG [C-Terminus Dnmt1]: mit N-terminalem FLAG, entspricht den Aminosäuren 1087-1620 der Dnmt1
- pEGMT1L: GFP-Dnmt1

2.2.4. Zweihybrides Hefesystem

Zur Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner der cGKI α wurde mit Hilfe des Zweihybriden Hefesystems eine cDNA-Bibliothek von Mäusen des Embryonalstadiums E17 (Fa. Clontech) durchmustert. In Abb. 4 ist schematisch das Prinzip des Zweihybriden Hefesystems dargestellt. Die cGKI α wurde als Köderplasmid in den BD-Vector pGBT9 kloniert, während die cDNA im AD-Vector pACT2 vorlag.

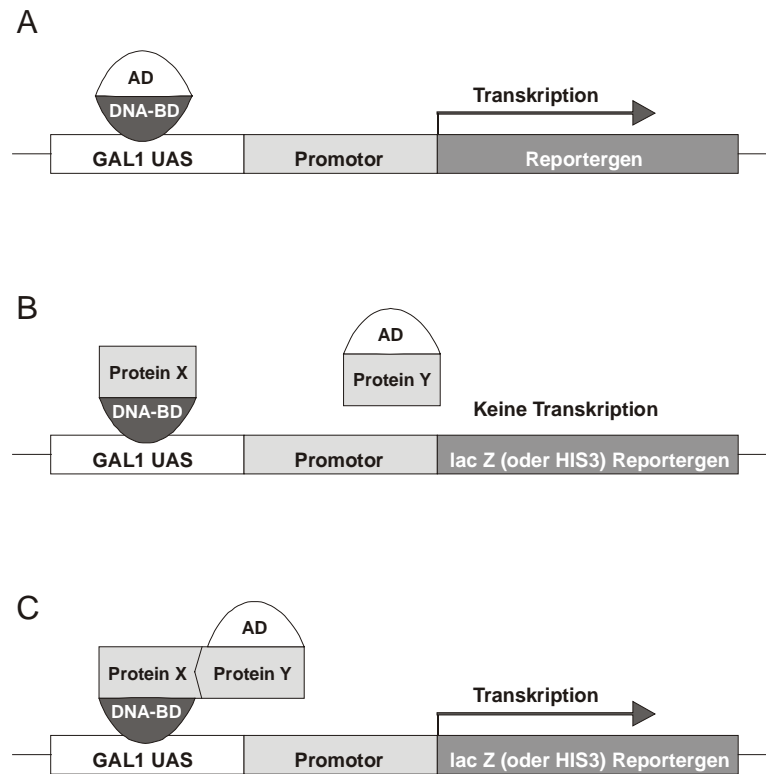


Abb. 4: Prinzip des Zweihybriden Hefesystems

A: Der native Transkriptionsfaktor GAL4 besteht aus zwei funktionell unabhängigen Domänen, die Bestandteil desselben Proteins sind. Die DNA-Bindungsdomäne (**BD**) gewährleistet die Bindung des Faktors an eine spezifische, stromaufwärts vom Gen-Promotor gelegene DNA-Sequenz (**UAS**). Die saure Aktivierungsdomäne (**AD**) ist unmittelbar in die Initiation der Transkription involviert, indem sie genunspezifisch mit anderen Komponenten des Transkriptionskomplexes interagiert. **B:** Im Zweihybriden Hefesystem wird die Möglichkeit ausgenutzt, die beiden Domänen künstlich zu trennen. Mit Hilfe zweier verschiedener Plasmide wird sowohl die Sequenz der AD als auch die Sequenz der BD mit der Sequenz eines zu testenden Proteins (bzw. die AD mit der Insertsequenz einer cDNA-Bibliothek) fusioniert. **(C:)** Eine Interaktion dieser Hybridproteine ermöglicht die Rekonstitution des Transkriptionsfaktors, welcher dann sein Reportergen (*lacZ* oder *HIS3*) aktiviert.

2.2.4.1. Hefestämme

Es kamen zwei Hefestämme zur Anwendung. Der Hefereporterstamm HF7c wurde zur Durchmusterung der cDNA Bank verwendet und der Stamm Y187 diente zur Kontrolle der primärpositiven Klone aus der Bankdurchmusterung sowie zum Testen von Interaktionen bekannter Proteine durch simultane Kotransformation.

- Hefereporterstamm *S. cerevisiae* HF7c *HIS3*, *lacZ* ; *MATa*; *trp1*, *leu2* (Clontech)
- Hefereporterstamm *S. cerevisiae* Y187 *lacZ*; *MATα*; *trp1*, *leu2* (Clontech)

2.2.4.2. cDNA-Bibliothek

Die über *Xho I* / *EcoR I* in den AD-Vector pACT2 klonierte Maus E17 cDNA-Bibliothek wurde von der Firma Clontech bezogen. Die durchschnittliche cDNA-Insertgröße beträgt 2,0 kb bei einer Größenspanne von 0,4-4,0 kb, die Anzahl der unabhängigen Klone liegt bei $3,5 \times 10^6$.

2.2.4.3. Plasmide

pACT2	GAL 4 DNA Aktivierungsdomäne, leu2, Amp ^r (Clontech)
pGBT9	GAL 4 DNA Bindungsdomäne, trp1, Amp ^r (Clontech)
pGBT9[cGKIα]	cGKIα im DNA-BD-Vector pGBT9 als Sonde (Köderplasmid)
pVA3	GAL 4 DNA Bindungsdomäne/p53, trp1, Amp ^r (Clontech)
pTD1	GAL 4 DNA Aktivierungsdomäne/T-antigen, leu2, Amp ^r (Clontech)

2.2.4.4. Lösungen, Medien und Agar

- **10x Lithiumacetat Stammlösung:** 1M LiAc (Sigma); pH 7,5; sterilfiltriert
- **10x TE Puffer Stammlösung:** 100 mM Tris-HCl (Merck), 10 mM EDTA (Merck); pH 7,5; autoklaviert
- **50% PEG Stammlösung:** 500 g/l Polyethylenglycol 4000 Mw 3.350 (Sigma)
- **Lithiumacetat/TE Lösung:** 80% dest.H₂O + je 10% der Stammlösungen
- **PEG/LiAc/TE Lösung:** 80% dest.H₂O + je 10% der Stammlösungen, sterilfiltriert
- **40% Glucosestammlösung:** 400 g/l Glucose (Merck), sterilfiltriert
- **YPD Medium:** 20 g/l Pepton (Roth), 10 g/l Hefeextrakt (BD-Bioscience Clontech), 2 % Glucose (Merck); pH 5,8; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **YPD Agar:** YPD Medium mit 1,5 % Agar Agar(Roth), pH 5,8; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **SD (-W) Medium:** 26,7g/l Minimal SD-Base (BD-Bioscience Clontech), 0,74g/l (-W) DO Supplement (BD-Bioscience Clontech); pH 5,8; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **SD (-W) Agar:** SD (-W) Medium mit 1,5 % Agar Agar (Roth); pH 5,8; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **SD (-L) Medium:** 26,7g/l Minimal SD-Base (BD-Bioscience Clontech), 0,69g/l (-L) DO Supplement (BD-Bioscience Clontech); pH 5,8; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **SD (-W -L) Agar:** 26,7g/l Minimal SD-Base (BD-Bioscience Clontech), 0,64g/l (-W -L) DO Supplement (BD-Bioscience Clontech), 1,5 % Agar Agar (Roth); pH 5,8; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **SD (-H -W -L) Agar:** 26,7g/l Minimal SD-Base (BD-Bioscience Clontech), 0,62g/l (-H -W -L) DO Supplement (BD-Bioscience Clontech), 1,5 % Agar Agar (Roth); pH 5,8; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **Z Puffer:** 60 mM Na₂HPO₄ * 2H₂O (Merck), 40 mM NaH₂PO₄* H₂O (Merck), 10 mM KCl (Merck), 1 mM MgSO₄* 7H₂O (Merck); pH 7,0
- **60x X-Gal Stammlösung:** 0,4g 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal; Fa. Invitrogen) in 20ml Dimethylformamid (Fluka) lösen und bei -20°C im Dunkeln lagern
- **X-Gal Substratlösung:** 100 ml Z Puffer, 1,67 ml 60x X-Gal Stammlösung, 0,27 ml β-Mercaptoethanol (Sigma)
- **Aufschlusspuffer:** 2 % TritonX-100 X-100 (Merck), 1 % SDS (BioRad), 100 mM NaCl (Merck), 10 mM Tris (Merck), 1 mM EDTA (Merck); pH 8,0
- **500x Prolin/Thiamin Stammlösung:** 20 mg/ml Prolin (Merck); 173 mg/ml Thiamin-Hydrochlorid (Sigma); sterilfiltrieren
- **5x M9 Salzlösung:** 42,5 g/l Na₂HPO₄* 2H₂O (Merck); 15 g/l KH₂PO₄ (Merck); 5 g/l NH₄Cl (Merck); 2,5 g/l NaCl (Merck)

- **M9 (-L) Agar:** 628 ml/l H₂O; 200 ml/l 5x M9 Salzlösung; 0,69 g/l (-L) DO Supplement (BD-Bioscience Clontech); 1,5 % Agar Agar (Roth); pH 7,0; 15 min bei 121°C autoklaviert und 2 ml/l 500x Prolin/Thiamin Stammlösung, 50 ml/l 40%ige Glucosestammlösung und 50 µg/ml Ampicilin (Sigma) zugegeben
- **LB Medium:** 10 g/l Trypton (BD-Bioscience Clontech), 5 g/l Hefeextrakt (BD-Bioscience Clontech), 10 g/l NaCl (Merck); pH 7,0; 15 min bei 121°C autoklaviert
- **SOC Medium:** 20 g/l Trypton (BD-Bioscience Clontech); 5 g/l Hefeextrakt (BD-Bioscience Clontech); 0,5 g/l NaCl (Merck); 2,03 g/l MgCl₂*6 H₂O (Merck); 0,19 g/l KCl (Merck); pH 7,0; 15 min bei 121°C autoklaviert und 10 ml/l 40 %ige Glucosestammlösung zugegeben

2.2.4.5. Sequentielle Kotransformation

2.2.4.5.1. Vorbereitung kompetenter Hefezellen

Um kompetente Hefezellen vorzubereiten wurde als Starterkultur 7 ml YPD Medium in einem 50 ml Glaskolben mit ca. 5 Hefekolonien des HF7c Reporterstammes angeimpft und bei 30°C und 250 upm ca. 16 h geschüttelt. Danach wurden 45 ml YPD Medium in einem 500 ml Erlenmeier-Kolben mit der Starterkultur angeimpft und unter gleichen Bedingungen ca. 3-4 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-0,9 geschüttelt und dann in einer Heraeus Zentrifuge bei Raumtemperatur 10 min bei 1500 upm zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit jeweils 40 ml 1 x LiAc/TE Lösung gewaschen und mit der gleichen Lösung auf 2 ml aufgefüllt und resuspendiert.

2.2.4.5.2. Transformation der Hefe mit der Sonde (BD-Fusionsplasmid)

In der anschließenden Transformation wurden 100 µg gereinigter Lachssperma-DNA (Fa. Sigma) mit 0,5 µg pGBT9[cGKIα] und 100 µl kompetenten Hefezellen vermischt, nach Zugabe von 700 µl PEG/LiAc/TE Lösung gut geschüttelt und bei 30°C für 45 min inkubiert. Anschließend wurden 88 µl DMSO zugegeben und die Zellen für 7 min einem Hitzeschock bei 42°C, mit anschließender Wasserkühlung auf Raumtemperatur unterzogen. Dann wurden die Zellen für drei Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 upm zentrifugiert, zweimal mit TE Puffer gewaschen und in 200 µl TE Puffer aufgenommen.

Je 100µl einer 1:10 und 1:20 Verdünnung des Transformationsansatzes wurden auf einer 10 cm (-W) Selektivmedium- Agarplatte ausplattiert und für 3 Tage bei 30°C inkubiert bis die gewachsenen Hefekolonien 1-2 mm groß waren.

2.2.4.5.3. Vorbereitung der Hefezellen für die zweite Transformationsstufe

15 ml SD (-W)-Medium wurden in einem 100 ml Kolben mit 3-5 Kolonien der Sondentransformation vom Vorschritt angeimpft und bei 30°C und 220 upm über Nacht geschüttelt. 130 ml gleiches Medium wurden in einem 1 l Kolben mit der gewachsenen Kultur angeimpft und unter den gleichen Bedingungen für ca. 24 h geschüttelt. Diese Starterkultur wurde anschließend auf vier 2 l Kolben mit jeweils 220 ml YPD Medium verteilt und für ca. 4 h bis zum Erreichen einer $OD_{600} > 0,7$ geschüttelt. Die gewachsenen Kulturen wurden in konischen Zentrifugationsbecher verteilt und in einer Heraeus Zentrifuge (Ausschwingrotor) bei RT für 10 min bei 2000 upm sedimentiert, anschließend in LiAc/TE Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Sedimente wurden vereinigt und noch zweimal mit LiAc/TE Lösung gewaschen, 10 min bei 1500 upm zentrifugiert und mit der gleichen Lösung auf 20 ml aufgefüllt.

2.2.4.5.4. Transformation der Hefe mit der cDNA-Bibliothek

Im anschließenden Transformationsansatz wurden 2 ml denaturierte Lachssperma DNA mit 200 µg der in den pACT2 Vector klonierten cDNA- Bibliothek vermischt und zu 20 ml der primärtransformierten kompetenten Hefezellen vom Vorschritt gegeben. Der Ansatz wurde mit 140 ml PEG/LiAc/TE Lösung vermischt und 45 min bei 30°C inkubiert. Danach folgte nach Zugabe von 17,6 ml DMSO ein Hitzeschock für 8 min bei 42°C mit anschließender Wasserkühlung auf RT. Der Ansatz wurde in 50 ml Röhrchen für 10 min bei 2000 upm zentrifugiert, die Sedimente zweimal mit TE-Puffer gewaschen, auf drei 2 l Kolben mit jeweils 300 ml YPD Medium verteilt und 1 h bei 30°C mit 200 upm geschüttelt. Die Hefezellen wurden dann für 10 min bei 2000 upm sedimentiert, zweimal mit TE-Puffer gewaschen und letztlich mit TE Puffer auf ein Endvolumen von 13 ml aufgefüllt. Je 200 µl dieser Suspension wurden pro 15 cm SD (-H -W -L)-Agarplatte ausplattiert, bei 30°C und Luftbefeuchtung ca. 8 Tage inkubiert und anschließend einem β -Galaktosidase-Filterfarbstest unterzogen (siehe Kap. 2.2.4.7.).

2.2.4.5.5. Bestimmung der Transformationseffizienz

Um die Transformationseffizienz bestimmen zu können, wurden geeignete Verdünnungen der Hefesuspension vom Vorschritt auf 10 cm SD (-W -L)-Agarplatten ausplattiert und die Kolonien nach 4 Tagen gezählt.

2.2.4.6. Simultane Kotransformation

Kotransformationen, welche nicht durch die Transformationseffizienz limitiert waren, wurden simultan ausgeführt. Die Vorbereitung der kompetenten Hefezellen des Hefereporterstamms Y187 erfolgte wie unter Kapitel 2.2.4.5.1 beschrieben. Die kompetenten Hefezellen wurden weiter wie unter Kapitel 2.2.4.5.2. behandelt, mit der Abweichung, dass die Zellen simultan mit je 0,5 µg der zu testenden pGBT9- und pACT2-Fusionsplasmide transformiert wurden. Mit dieser Methode wurde z.B. die Interaktion der primärpositiven Klone aus der cDNA-Bibliothek-Transformation mit der Sonde erneut und in einem anderen Hefestamm getestet.

2.2.4.7. β -Galaktosidase Filtertest

Die Prüfung einer Interaktion zwischen den GAL4-Hybridproteinen wurde mit Hilfe der β -Galactosidase Farbreaktion durchgeführt, die auf der Umsetzung des farblosen löslichen X-Gal Substrats in das blaue unlösliche Chlor-Indigo beruht. Dazu wurde ein Whatman-Rundfilter in einer Bakterienchale mit der X-Gal-Substratlösung durchtränkt (1,8 ml für eine 10 cm und 5ml für eine 15 cm Schale). Die zu testenden Hefekolonien wurden mit Hilfe eines Glassattels auf einen anderen Whatman-Filter übertragen und danach, zur Lysis der Zellwände, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde der Filter mit den Hefekolonien nach oben auf den mit X-Gal-Substratlösung durchtränkten Filter gelegt, die Schale mit Parafilm abgedichtet und bei 30°C inkubiert. Die Farbentwicklung wurde bis zu 24 h beobachtet.

Die Originalplatten einer cDNA-Bibliothekstransformation wurden zum Nachwachsen der abgezogenen Kolonien in den Inkubationsschrank zurückgestellt. Positive Kolonien wurden nach Vergleich der Filter mit den Originalplatten identifiziert, auf SD (-W -L)-Agarplatten ausgestrichen und nochmals in einem Filterfarbtest auf eine homogene Blaufärbung aller Kolonien (aus der Originalkolonie stammend) hin unterzogen. Bei einem erneuten positiven Filtertest wurden von diesen Hefezellen die Gesamtplasmid-DNA isoliert.

2.2.4.8. Plasmidisolierung aus Hefezellen

Eine Hefekolonie wurde in 6 ml SD (-W -L)-Medium ca. 48 h bei 30°C und 220 upm kultiviert. Die Hefezellen wurden 20 s in einer Tischzentrifuge bei 13000 upm sedimentiert und in 200 µl Aufschlusspuffer resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde die Hefesuspension mit 300 µg säuregewaschener Glasperlen (425-600 microns, Fa. Sigma) und 200 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Gemischs (Fa. Sigma) im Verhältnis (25:24:1) für 2 min kräftig geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13000 upm wurde der Überstand mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und dem

2,5fachen Volumen absoluten Ethanol vermischt und 30 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz 20 min bei 13000 upm zentrifugiert, das Sediment in 150 μl Wasser aufgenommen und erneut gefällt. Nach zwei Waschschritten mit 70 %igem Ethanol wurde das DNA-Pellet in 20 μl Wasser aufgenommen, photometrisch vermessen und bei -20°C bis zur Elektroporation gelagert.

2.2.4.9. Transformation der Plasmid-DNA in Bakterien

2.2.4.9.1. Vorbereitung elektrokompenter Bakterien

18 ml LB Medium wurden mit einer frischen Kolonie des Bakterienstamms HB101 (AG Rathjen) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 upm inkubiert. In 6 Ansätzen wurden jeweils 2,5 ml der Übernachtskultur mit 500 ml LB Medium bei 240 upm und 37°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,5 geschüttelt. Die gewachsenen Kulturen wurden 15 min in einem Eisbad abgekühlt und in einer Sorvall Zentrifuge bei 2°C 20 min bei 2600 g sedimentiert.

2.2.4.9.2 Transformation durch Elektroporation

Die elektrokompenten HB101-Bakterien wurden 15 min auf Eis aufgetaut und je 40 μl mit 1 μl der Plasmid-DNA vermischt. Der Ansatz wurde zügig auf den Boden vorgekühlter Elektroporationsküvetten pipettiert und sofort der Elektroporation unterzogen (Elektroporator EASYJECT Plus (Fa. EquiBIO), $U = 2,5\text{kV}$; $C = 25 \mu\text{F}$; R bis 200Ω ; $t_{\text{impuls}} = 5\text{ms}$). Unmittelbar nach der Elektroporation wurden die Bakterien mit 800 μl vorgewärmten SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Nach einem Zentrifugationsschritt für 30 s bei 13000 upm wurden die Bakterien in TE-Puffer gewaschen und in 100 μl TE-Puffer resuspendiert. Ein Teil der Suspension wurde auf M9 (-L) amp-Agarplatten ausplattiert und 2-3 Tage bei 37°C inkubiert. Da *E. coli* HB101 auxotroph für Leucin sind, konnten auf dem Leucin-defizienten M9-Agar nur solche Bakterien wachsen, die das pACT2-Plasmid mit dem Leu2-Marker enthielten.

2.2.4.10. Gewinnung der Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* HB 101

Jeweils eine Bakterienkolonie wurde mit 3 ml LB-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin über Nacht bei 37°C und 220 upm inokuliert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers und wurde in 50 μl EB Puffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.4.11. Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma MWG, Göttingen durchgeführt und erfolgte mit dem 5'AD Primer. Die erhaltenen Sequenzen für die Hefeklone sind im Anhang aufgeführt.

2.2.5. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Zweidimensionale Gelelektrophorese wurde 1975 von P. H. O'Farrel und J. Klose eingeführt und ist inzwischen eine weit verbreitete Methode, um aus Geweben oder Zelllinien extrahierte, komplexe Proteingemische zu analysieren (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). Mit dieser Technik werden die Proteine basierend auf zwei unabhängigen Eigenschaften in zwei separaten Schritten aufgetrennt. Im ersten Schritt, der isoelektrischen Fokussierung (IEF), werden die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI) separiert. Im zweiten Schritt, einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese, trennt man die Proteine nach ihrer relativen molekularen Masse auf. Jeder Punkt (Spot) in dem resultierenden zweidimensionalen Array entspricht einem einzelnen Protein aus dem Proteingemisch. Zahlreiche unterschiedliche Proteine können so gleichzeitig separiert werden und anhand der Informationen über den pI-Wert, der molekularen Masse und der Proteinmenge charakterisiert werden und mit Hilfe der Massenspektrometrie und dem Abgleich mit Datenbanken identifiziert werden. Auch Informationen über posttranslationale Modifikationen der Proteine können mit dieser Methode gewonnen werden.

Sie findet deshalb bei der Charakterisierung von Proteinen hinsichtlich einer Vielzahl von biologischen Eigenschaften wie Gewebsspezifität, Spezifität für ein bestimmtes Entwicklungsstadium, Spezifität für verschiedene Zellorganellen, Geschlechtsspezifität, quantitative Charakteristiken (wie relative Proteinmenge und Metabolismus) und genetische Variabilitäten (wie Polymorphismus) ihre Anwendung (Klose et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode für zwei Fragestellungen genutzt. Zum einen interessierte, ob sich das Proteinexpressionsmuster eines cGKI-defizienten Gewebes von dem entsprechenden Wild-Typ Gewebe unterscheidet, d.h. ob es Proteine gibt, die aufgrund der Abwesenheit von cGKI hoch- oder herunterreguliert werden? Vor allem interessierten eventuelle Unterschiede im Phosphorylierungsgrad von Proteinen, bei Abwesenheit der Kinase, um Hinweise auf mögliche Substrate der Kinase zu bekommen.

2.2.5.1. Probenaufbereitung und Proteinbestimmung

Als zu untersuchendes Nervengewebe wurde das Cerebellum postnataler Mäuse (P10 bzw. P12) ausgewählt, welches eine starke Expression der cGKI α in den Purkinje-Zellen aufweist. Die Cerebella von cGKI-defizienten Mäusen und Wildtypmäusen wurden von zuvor genotypisierten P10 cGKI-Mäusen präpariert. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert und sofort für 30 min bei 37°C unter Begasung mit Carbogengas (5% CO₂, 95% O₂) in artifizierlicher Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) mit 1 mM 8-pCPT-cGMP (Biolog), 0,1 μ M Calyculin A und 0,1 μ M Okadain Säure (Alexis) inkubiert.

Zur Untersuchung von Unterschieden im Phosphorylierungsgrad wurden P12 Mäuse verwendet. Die Präparation erfolgte wie oben beschrieben. Bei der Inkubation des Gewebes mit dem cGK-Aktivator und den Phosphataseinhibitoren wurde zusätzlich 100 μ M Natrium-Peroxyvanadat in die artifizierliche Cerebrospinalflüssigkeit gegeben.

Anschließend wurde das Gewebe kurz zentrifugiert, einmal mit TE-Puffer gewaschen erneut zentrifugiert und gewogen. Pro mg Gewebe wurde 4 μ l Lysislösung zugegeben und das Gewebe mit einem Eppendorf-Homogenisator homogenisiert. Die Lysislösung enthält 8 M Urea um eine, für eine optimale Fokussierung entscheidende, komplette Löslichkeit und Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Der Zusatz von Thiourea dient einer verbesserten Löslichkeit der Proteine, insbesondere von Membranproteinen (Rabilloud, 1998). Das zwitterionische Detergenz CHAPS löst hydrophobe Proteine und minimiert Proteinaggregationen (Perdew et al., 1983). Damit sich die Proteine komplett entfalten können, wird das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) zugegeben, welches Disulfidbrücken spaltet. Ampholyte sind kleine, lösliche amphotere Moleküle mit einer hohen Pufferkapazität im Bereich ihres pI Wertes. Sie werden entsprechend dem pH-Bereich, der bei der Fokussierung vorherrscht eingesetzt, und führen dabei entlang des pH-Gradienten zu einer gleichmäßigeren Leitfähigkeit. Gerade bei hohen Proteinmengen verbessern Ampholyte die Separation der Proteine. Schließlich wurde der Lysislösung noch PMSF als Proteaseinhibitor zugesetzt sowie die Phosphataseinhibitoren Calyculin A und Okadain Säure.

Die Homogenisate wurden anschließend für 30 min bei 4°C und 100000 g in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert und das Pellet verworfen. Die Proteinbestimmung des Überstandes erfolgte mit dem Bradford BioRad Protein Assay nach Angaben des Herstellers und photometrischer Messung bei einer OD₅₉₅. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

- **10x Stammlösung I:** 119 mM NaCl (Merck); 10 mM Glucose (Merck); 2,5 mM KCl (Merck); 1,3 mM MgSO₄ (Merck); 1 mM NaH₂PO₄ (Merck); 2,5 mM CaCl (Merck)
- **10x Stammlösung II:** 26 mM NaHCO₃ (Merck)
- **ACSF Lsg:** 10 % 10x Stammlösung I , 10% 10x Stammlösung II , 80% H₂O
- **Natrium-Peroxyvanadat:** 10 mM Natriumvanadat pH 10 werden mit 10 mM H₂O₂ versetzt und 15 min bei 22°C inkubiert (Bourgoin and Grinstein, 1992)
- **TE Puffer:** 10 mM Tris-HCl (Merck), 1 mM EDTA (Merck); pH 7,5
- **Lysislösung:** 8 M Urea (Sigma), 2 M Thiourea (Sigma), 4 % CHAPS (Sigma), 6,5 mM DTT (amresco), 0,5 % Ampholyte pH 3-10 (BioRad); aliquotieren 1 ml, frisch dazu 8 mM PMSF (Fluka), und nach Bedarf 0,1 µM Calyculin A und 0,1 µM Okadain Säure (Alexis)

2.2.5.2. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine aufgrund ihres relativen Gehalts an sauren und basischen Resten in einem elektrischen Feld nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Der isoelektrische Punkt (pI) eines Proteins ist als derjenige pH-Wert definiert, bei dem seine Nettoladung Null beträgt. Bei der Elektrophorese eines Proteingemischs in einem pH-Gradienten in einem Gel ohne SDS-Zusatz wird also jedes Protein so weit wandern, bis es eine Position im Gel erreicht, wo der pH-Wert seinem pI entspricht. Die pI Werte der Proteine variieren zwischen einem pH-Wert von 3 bis 12, der isoelektrische Punkt der Mehrzahl der Proteine liegt jedoch zwischen pH 4-7.

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit Hilfe von sogenannten IPG-Streifen der Firma BioRad durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Polyacrylamidgele mit einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG), die auf dünne Plastikstreifen aufgebracht sind (Gorg et al., 1988). Diese IPG-Streifen sind in verschiedenen pH-Gradienten und Streifenlängen erhältlich.

In dieser Arbeit wurden 17 cm bzw. 7 cm lange IPG-Streifen pH 3-10 (Fa. BioRad) verwendet.

2.2.5.3. Rehydratisierung

Da die Streifen in einem getrockneten Zustand erhältlich sind, müssen sie vor der eigentlichen Fokussierung erst rehydratisiert werden. Die Zusammensetzung der Rehydratisierungslösung ähnelt der Lysislösung, da Ziel ist, die Proteine bei der anschließenden Fokussierung weiter in Lösung zu halten. Statt DTT wurde Hydroxyethylidisulfid (DeStreak Reagent) verwendet, welches insbesondere im basischen Bereich des Gels die Anzahl der, durch unspezifische Oxidation der Proteine resultierenden, Spots und Streifen reduziert (Olsson et al., 2002; Pennington et al., 2004).

- **Rehydratisierungslösung:** 8 M Urea (Sigma), 2 M Thiourea (Sigma), 1 % CHAPS (Sigma); aliquotieren 1 ml, frisch dazu, 5,2 µl/ml Ampholyte pH 3-10 (Amersham Biosciences), 12 µl/ml “DeStreak Reagent” (Amersham Biosciences), eine Spur Bromphenolblau (Merck)

Die 17 cm IPG-Streifen wurden bei 20°C für 20h in jeweils 300 µl der Rehydratisierungslösung inkubiert.

Bei Verwendung der 7 cm IPG-Streifen wurde die Probe mit in die Rehydratisierungslösung gegeben (Endvolumen 125 µl/ Streifen) und die Streifen für ca. 14 h rehydratisiert. Für eine Phosphoproteinfärbung der Gele wurden pro Streifen 100 µg bzw. 150 µg Protein geladen.

Nach der Rehydratisierung folgte die eigentliche Fokussierung. Bei Verwendung der 17 cm Streifen wurde die Probe während der Fokussierung durch so genanntes „cup loading“ in unmittelbarer Nähe zur Anode appliziert. Die Probe wurde in einem Endvolumen von 50 µl Rehydratisierungslösung aufgenommen und in die entsprechende Tasche („cup“) gegeben und dann die Fokussierung gestartet. Für eine Silberfärbung wurden 55 µg der Probe geladen und für eine Coomassiefärbung 125 µg.

Die isoelektrische Fokussierung wurde für die 17 cm Streifen mit der „Multiphor II Electrophoresis Unit“ (Amersham Biosciences) durchgeführt, wobei folgendes Spannungsprofil zum Einsatz kam:

- 1) lineare Zunahme von 0 - 300 V in 30min
- 2) 300 V für 30min
- 3) lineare Zunahme von 300 - 500 V in 1h
- 4) 500 V für 1h
- 5) lineare Zunahme von 500 - 3500 V in 1 h 30 min
- 6) 3500 V für 4 h 30 min

Bei allen Schritten betrug die Stromstärke 2 mA, die Leistung 5 W und die Temperatur 20°C.

Für die 7 cm IPG-Streifen erfolgte die isoelektrische Fokussierung mit der „Protean IEF Cell“ (BioRad). Folgendes Spannungsprofil kam zum Einsatz:

- 1) 250 V für 30 min
- 2) lineare Zunahme von 250 - 400 V in 30 min
- 3) lineare Zunahme von 400 - 3500 V in 1 h 50 min
- 4) 3500 V für 1 h 30 min

Alle Schritte fanden bei 20 °C statt und die Stromstärke betrug pro Streifen $\leq 50 \mu\text{A}$.

Nach der Fokussierung wurden die Streifen equilibriert.

2.2.5.4. Equilibrierung der IPG-Streifen

Die Equilibrierung dient dazu die Streifen für die zweite Dimension der Auftrennung in einem SDS-Puffer System vorzubereiten.

Dazu wurden die Streifen nacheinander für jeweils 15 min in je 10 ml der Equilibrierungslösung I und II inkubiert. Die Equilibrierungslösung I enthält als Reduktionsmittel DTT und die Equilibrierungslösung II Iodoacetamid, welches durch Alkylierung von Thiolgruppen die Reoxidation von Proteinen während der Elektrophorese verhindern und unerwünschte Reaktionen von Cysteinresten minimieren soll.

- **Equilibrierungslösung I:** 0,375 M Tris HCl pH 8,8; 6 M Urea (Sigma); 20 % Glycerol (Sigma); 2 % SDS (BioRad), frisch dazu 3,5 mg/ml DTT (amresco)
- **Equilibrierungslösung II:** 0,375 M Tris HCl pH 8,8; 6 M Urea (Sigma); 20 % Glycerol; 2 % SDS (BioRad); frisch dazu 25 mg/ml Iodoacetamid (Amersham Biosciences); eine Spur Bromphenolblau (Merck)

Unmittelbar nach dem zweiten Equilibrierungsschritt wurden die IPG-Streifen horizontal auf SDS-Polyacrylamidgele gelegt mit 0,5 %iger Agarose oder einem schnell auspolymerisierenden Polyacrylamidgel überschichtet und eine vertikale Elektrophorese durchgeführt.

2.2.5.5. Zweite Dimension: SDS-PAGE

In der Zweiten Dimension werden die fokussierten Proteine in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt, was zu einem zweidimensionalen Punktmuster führt.

Für die 17 cm IPG-Streifen wurden 26 cm x 20 cm große 12,5 %ige Polyacrylamidgele ohne Sammelgel verwendet. Die Auftrennung erfolgte unter Kühlung (15°C) mit der „Ettan Dalt Twelve Electrophorese Unit“ (Amersham Biosciences) für 30 min bei 12 W pro Gel, gefolgt von ca. 7 h bei 15 W pro Gel. Meistens wurden 6 Gele (3x KO-Probe, 3x WT-Probe) gleichzeitig aufgetrennt.

Für die 7 cm IPG-Streifen wurden 12 %ige Polyacrylamidgele ohne Sammelgel verwendet und diese mit der „Mini Protean II“-Apparatur (BioRad) bei RT für 10 min bei 80 mV und ca. 1 h bei 180 mV aufgetrennt. Pro Apparatur konnten maximal 2 Gele gleichzeitig aufgetrennt werden (eine KO-Probe und eine WT-Probe).

- **Laufpuffer:** 25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS
- 40% ige Acrylamidlösung (AppliChem) und 2% ige Bisacrylamidlösung (AppliChem) bzw. 30 % Acrylamid und 0,8 % PDA (BioRad),
- SDS (BioRad); Tris-HCl, pH 8,8; Ammoniumpersulfat (BioRad); TEMED (BioRad)

Im Anschluß an die zweite Dimension wurden die Gele sofort fixiert und entweder einer Silber-, Coomassie- oder Phosphoprotein-Färbung unterzogen.

2.2.5.6. Färbung der 2D Gele

2.2.5.6.1. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Färbung wurde modifiziert nach Bloom et al durchgeführt (Bloom and Goodpasture, 1976). Das Gel wurde für mindestens eine Stunde oder über Nacht fixiert und dann zweimal für je 20 min in 50 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Gel 1 min sensitiviert, dreimal je 20 s mit Aqua dest. gewaschen und für 20 min in der Färbelösung geschüttelt. Nach zwei je 20 sekundigen Waschschrinen mit Aqua dest. wurde das Gel bis zur gewünschten Farbreaktion entwickelt und diese mit 1 % Glycin für 30 s gestoppt. Danach wurde weitere 30 s mit Aqua dest. gewaschen, gefolgt von 10-30 min mit 1 % Glycin und mind. 30 min mit Aqua dest.

- **Fixierlösung:** 50 % Ethanol, 12 % Essigsäure, 500 µl/l 37 % Formaldehyd
- **Sensitivierungslösung:** 0,8 mM Na₂S₂O₃
- **Färbelösung:** 2 g/l AgNO₃, 750 µl/l 37 % Formaldehyd
- **Entwicklerlösung:** 30 g/l K₂CO₃, 16 µM Na₂S₂O₃, 500 µl/l 37 % Formaldehyd
- **Stopplösung:** 1 % Glycin

2.2.5.6.2. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie

Die Coomassie Färbung wurde leicht modifiziert nach Neuhoff et al. durchgeführt (Neuhoff et al., 1988). Das Gel wurde für mindestens eine Stunde fixiert und zweimal für je 10 min mit Aqua dest. gewaschen. Die Färbung erfolgte über Nacht. Abschließend wurde das Gel mehrmals mit Aqua dest. gewaschen und dann dokumentiert.

- **Fixierlösung:** 50 % Ethanol, 10 % Essigsäure
- **Colloidale Coomassie Stocklösung:** 5 g Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva) / 100ml H₂O dest., Lagerung bei 4°C

- **Färbelösung:** 10 ml Colloidal Coomassie Stocklösung; 50 g $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$; 6 ml 85 % Ortho-Phosphorsäure; auf 500 ml mit H_2O dest., auffüllen und 125 ml Methanol zugeben

2.2.5.6.3. Phosphoproteinfärbung von Polyacrylamidgelen

Um phosphorylierte Proteine im Gel zu detektieren wurde der Farbstoff „Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain“ (Molecular Probes) verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff erlaubt die direkte Detektierung von Phosphatgruppen der Aminosäuren Serin, Tyrosin und Threonin im Gel (Steinberg et al., 2003). Die Färbung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Gele wurden für 45 min fixiert, die Fixierlösung ausgetauscht und nochmals über Nacht fixiert. Nach zwei je 10 minütigen Waschschrinen mit Aqua dest. wurden die Gele für 1 h 40 min gefärbt. Anschließend wurde dreimal für jeweils 1 h entfärbt. Unmittelbar danach wurden die Gele dokumentiert (siehe Dokumentation und Auswertung der Gele) und im direkten Anschluss daran für die Detektion der Totalproteine einer Coomassie-Färbung unterzogen. Dazu wurde die Gele in Wasser gewaschen, und ohne weiteren Fixierschritt direkt die Coomassie Färbelösung zugegeben (siehe Kapitel 2.2.5.6.2.).

- **Fixierlösung:** 10 % Trichloressigsäure, 50 % Methanol
- **Entfärbelösung:** 50 mM Natriumacetat pH 4,0; 4 % Acetonitril

2.2.5.7. Dokumentation und Auswertung der 2D Gele

2.2.5.7.1. Dokumentation

Mit „Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain“ gefärbte Gele wurden mit Hilfe des Camilla CCD Kamera Systems (Fa. Raytest) bei einer Exzitation von 530-560 nm und dem Emissionsfilter Cy3 (610/75 nm) visualisiert und mit einer Auflösung von 100 μm als 16 bit Tif-Datei dokumentiert.

Nach einer Silber- bzw. Coomassie-Färbung wurden die Gele auf einem Flachbettscanner Arcus 1200 (Agfa) mit Hilfe der Software Agfa Foto Look 3.5 gescannt (16 bit, 600ppi) und als Tif Datei gespeichert.

2.2.5.7.2. Auswertung und Quantifizierung

Die Auswertung und Quantifizierung der Gele erfolgte mit der Software Delta 2D 3.3 der Firma Decodon (Lizenz: AG Dr. Michael Gotthardt, MDC, Berlin). Dabei wurde jeweils ein WT-Gel mit einem KO-Gel (insgesamt drei Gelpaare) hinsichtlich der Phosphoproteinfärbung bzw. der Totalproteinfärbung (Coomassie oder Silber) verglichen (Abb. 5).

Eine Quantifizierung wurde nur bei mit Coomassie- und Phosphoprotein-gefärbten Gelen durchgeführt. Im Rahmen der Quantifizierung ermittelte die Software von jedem Proteinspot das Volumen sowie den prozentualen Anteil des Spotvolumens am Gesamtvolumen aller Spots (% Volumen). Die durch diese Normalisierung erhaltenen Volumenprozentwerte der KO-Spots und WT-Spots eines Gelpaares wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt ($\% \text{ Volumen KO} / \% \text{ Volumen WT}$) und nach herunterregulierten und hochregulierten Proteinspots gefiltert. Als herunterreguliert (stärkere Expression im WT als im KO) wurden Spots mit einem Volumenprozentverhältnis $\leq 0,5$ angesehen. Als hochreguliert (stärkere Expression im KO als im WT) galten Spots mit einem Volumenprozentverhältnis $\geq 1,5$. Für die Ergebnisse wurden nur solche Spots berücksichtigt, die in allen drei Gelpaaren hoch- bzw. herunterreguliert waren. Proteinspots die in zwei von drei Gelpaaren reguliert waren, wurden nur bei einer sehr deutlichen Regulation berücksichtigt. Ausgeschlossen wurden des weiteren Spots, die in den äußersten Randregionen des Gels (im sehr basischen oder sauren Bereich, sowie im hochmolekularen Bereich) lagen, da die Auftrennung in diesen Bereichen relativ variabel ist, sowie Spots die in lokal schlecht aufgetrennten Regionen (z.B. Schmier oder Streifenbildung) lagen.

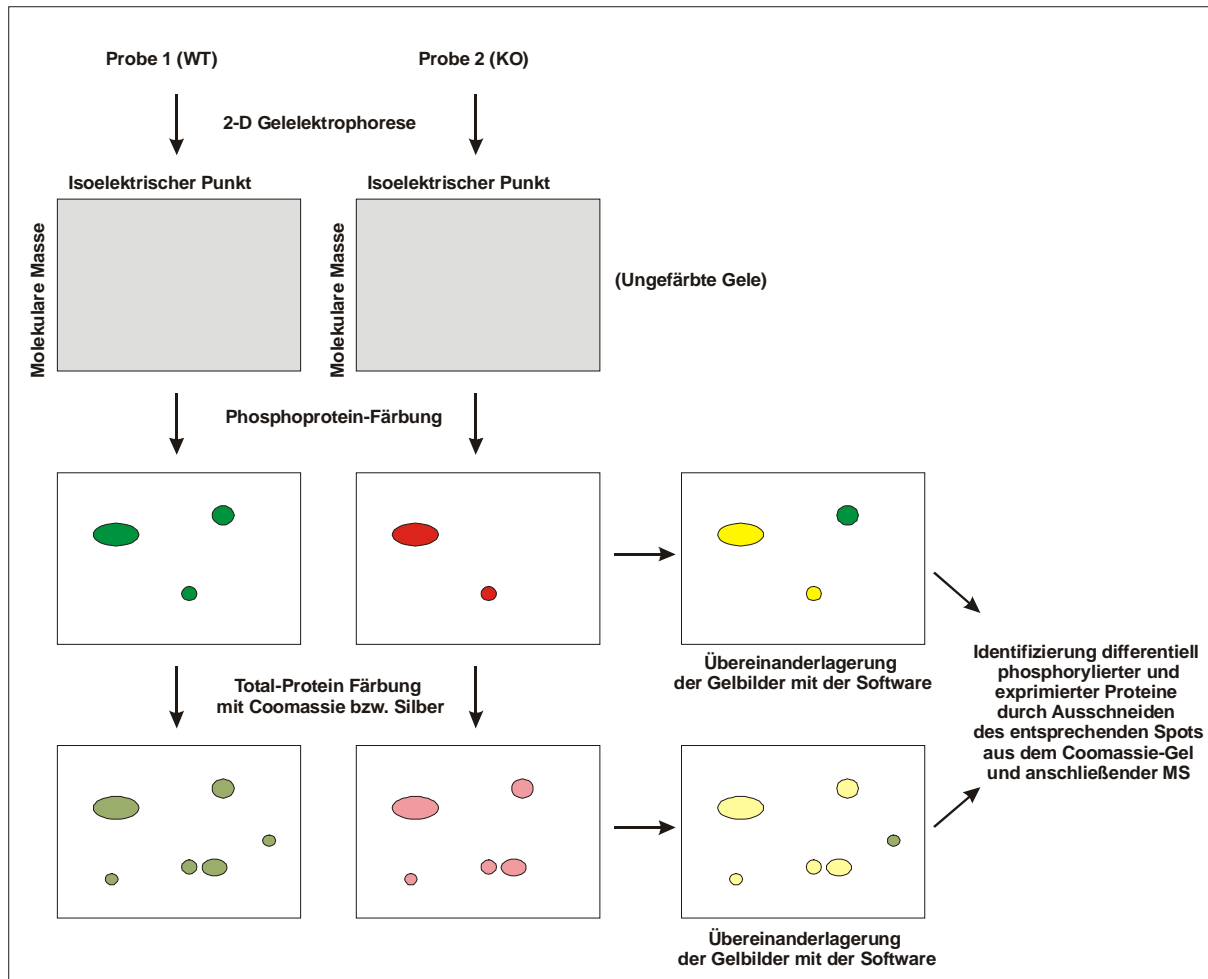


Abb. 5: Schematische Übersicht über den allgemeinen Ablauf zur Untersuchung des Proteinexpressionsmusters und des Phosphorylierungsmusters zweier verschiedener Proteingemisch-Proben mittels 2D-Gelelektrophorese. Zwei verschiedene Proben werden in zwei verschiedenen Gelen mittels der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und dann mit Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain gefärbt und dokumentiert. Im Anschluss daran (oder als alleinige Färbung) werden die gleichen Gele zur Detektion des Totalproteins mit Coomassie (bei alleiniger Färbung auch mit Silber) gefärbt und dokumentiert. Die gewonnenen Bilder der verschiedenen Gele aus beiden Färbungen werden anschließend Software-unterstützt künstlich eingefärbt und übereinander gelagert. Des Weiteren wird eine Spoterkennung durchgeführt und eine Spotquantifizierung. Unterschiede in der Phosphorylierung und in der Proteinexpression werden aufgrund der Dominanz einer Einzelgelfarbe (WT: grün, KO: rot) statt der Mischfarbe (gelb) erkannt und durch die Quantifizierungsdaten. Entsprechende Spots wurden aus den Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten und mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) identifiziert.

2.2.5.7.3. Proteinspotidentifizierung

Die zu identifizierenden Proteinspots wurden aus mit Coomassie-gefärbten Gelen per Hand ausgeschnitten. Die eigentliche Spotidentifizierung wurde von Dr. Albrecht Otto und Dr. Eva-Christina Müller, AG Wanker, MDC, Berlin durchgeführt. Dazu wurden die Gelstücke mit Trypsin verdaut und die erhaltene Peptidmischung mit einem MALDI ToFSpec2E Massenspektrometer (Micromass) analysiert. Zur Proteinidentifizierung wurde das Mascot-Software Paket (Matrix Science) verwendet.