

### 3 Material

#### 3.1 Computerprogramme

Canvas (Macintosh, Adobe Systems, USA)

Coral Draw (Macintosh, Coral Corporation, USA)

Microsoft Office (Macintosh english version, Microsoft Deutschland)

Photoshop 5.5 (Macintosh + Windows, Adobe Systems, USA)

TINA Version 2.08 (raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Deutschland)

Reference Manager Professional Edition 9 (Research Information Systems, USA)

#### 3.2 Geräte

BAS-III Folie und Belichtungskassetten (20 x 40 cm, Fuji Photo Film Co. LTD, Japan)

Biofuge 28RS (Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland)

Bio Imaging Analyzer (Fuji Photo Film Co. LTD, Japan),

Brutkühlschrank BK 6160 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland),

CO<sub>2</sub>-Inkubator für Zellzucht (Forma Scientific Steri-cult 200 Incubator),

Horizontalelektrophoresekammer Multiphor (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA),

Maxi-Elektrophorese-Kammer (23 x 24 cm, MDC) mit Abstandshaltern aus Teflon (1 mM, MDC),

Microcomputer Elektrophorese Power Supply (Renner GmbH, Darmstadt, Deutschland),

Mini-Gelelektrophorese Apparaturen (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland),

Mini rocking platform WT14 (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland),

peristaltische Pumpe (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA),

Semi-Dry blotting-Apparaturen Pegasus (PHASE Gesellschaft für Phorese, Analytik und Separatoren mbH, Lübeck, Deutschland),

Spannungsgeber (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA),

Ultraschallprozessor UP 200S (Dr. Rielcher GmbH, BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Deutschland)

Zellcracker (EMBO Laboratory Workshop, Heidelberg, Deutschland),

Zellkultur-Werkbank (BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland),

Zentrifuge J6-H6- (Beckman Instruments Inc., Pablo Alto, USA),

Hochgeschwindigkeitszentrifuge Optima TLX 120000 RPM (Beckman Instruments Inc., Pablo Alto, USA),

Hochgeschwindigkeitszentrifuge Optima LE-80K (Beckman Instruments Inc., Pablo Alto, USA),

Hochgeschwindigkeitszentrifuge TLX 100 inklusive der Hochgeschwindigkeitsrotoren TLX 100.2-, TLX 120.2-, TLA 45- und TLX100.4-Rotoren (Beckman Instruments Inc., Pablo Alto, USA)

Miniblotter 014-300 (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland)

Fluoreszenzmikroskop (Zeiss-Axioskop, Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos, Deutschland),

UV-Photometer CADAS 100 (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland),

Fotoklemmen (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland),  
Magnetrührer (Ika Werke Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland),  
Gradientenmischer mit Verdränger und Magnetfisch (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA)  
Konfokales Laser scanning Mikroskop (Nikon Diaphot, Bio-Rad MRC 1024, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)  
Laborboy (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland),  
Niederdruck-Chromatographie-Anlage mit UV-Monitor, Fraktionssammler (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland),  
Temperiereinheit G/D1 (Haake Mess-Technik GmbH u. Co., Karlsruhe, Deutschland)

### 3.3 Verbrauchsmaterial und Zellkultur

Bradford-Reagenz (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Dialyseschlauch Ausschlußgrenze 10 kD (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland),  
DMEM (GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland),  
Excell 401 (JRH Biosciences, Lenexa, USA),  
FKS (GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland),  
Fungizone (Amphotericin B, GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland),  
Glasfaserfilter GF/C (Whatmann),  
Glutathion-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA),  
Kodak X-OMAT AR-Filme (XAR 5, 8 x 10 inch, Sigma, Saint Louis, USA)  
Küvetten (Ratiolab),  
Nitrocellulose für Western Blot (HybondC, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA; Protan BA, Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland),  
Penicillin (GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland),  
Phototop-HRP Western Blot Detection Kit (New England Biolabs, Beverly, USA)  
S-MEM (GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland),  
Streptavidin (GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland),  
SW40-, SW60-, TL 100.2-, TL 120.2- und Microfuge-Zentrifugenröhrchen (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA),  
Sigma Fast DAB Tablet set (Sigma, Saint Louis, USA),  
Trypsin (GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland),  
Zellkulturpetrischalen (150 mM) und -flaschen (250 und 75 cm<sup>2</sup>, Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland),

### 3.4 Chemikalien

Acrylamid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
29,2 % (w/v) Acrylamid /0,8 % (w/v) Bisacrylamid -Lösung (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland),  
APS (Ammoniumperoxodisulfat, Ferak Berlin),  
Ascorbinsäure (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland),  
ATP (Sigma, Saint Louis, USA),  
[<sup>32</sup>P]-γATP (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA; NEN Life Science products Inc, Boston, USA),  
16-BAC (Benzyltrimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Bisacrylamid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Bradford-Reagenz (Sigma, Saint Louis, USA),  
Bromphenolblau (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
BSA (Albumin Fraktion V, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
CaCl<sub>2</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Calphostin C (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland),  
CHAPS (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland),  
Chondroitinsulfat (Sigma, Saint Louis, USA),  
Collagen S (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland),  
Complete (Proteasen-Inhibitoren Cocktail, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland),  
Coomassie brilliant blue G250 (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Cetylpyridiniumchlorid (CPC, Sigma, Saint Louis, USA),  
DTE (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Digitonin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
EDTA (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
EGTA (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland),  
Essigsäure (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Ethanol (MDC, Berlin),  
FeSO<sub>4</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Formaldehyd (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Fuchsin basisches (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Glycin (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Glycerin (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Glutardialdehyd (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Gö 6976 (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland),  
GTP (Sigma, Saint Louis, USA),  
GTPγS (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland),  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ferak Berlin),

---

HEPES (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland),  
Harnstoff (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Iodacetamid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Immobilone™ DryStrips pH 3-10 NL, 180\*3\*0,5 mM (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA),  
KCl (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Kreatinkinase (Sigma, Saint Louis, USA),  
Kreatinphosphat (Sigma, Saint Louis, USA),  
MgCl<sub>2</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
β-Mercaptoethanol (Ferak, Berlin),  
Methanol (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Natriumacetat (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
NaCl (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
NaF (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
NaHCO<sub>3</sub> (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
NaN<sub>3</sub> (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)  
Natriumthiosulfat (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Paraformaldehyd (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Pharmalyte (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA),  
Phorbolmyristataacetat (PMA, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland),  
Ponceau S (Sigma, Saint Louis, USA),  
Proteinmarker 6-165 kD (biotiniert, New England Biolabs, Beverly, USA),  
Proteinmarker 6,5-175 kD (prestained, New England Biolabs, Beverly, USA),  
Proteinmarker Protein Test Mixture 4 + 5 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)  
Ro 31-8220 (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland),  
Saccharose (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Salzsäure (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
SDS (Natriumdodecylsulfat, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Silbernitrat (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Strataclean resin (Harz zur Proteinfällung, Stratagene, La Jolla, USA),  
Sulfosalicylsäure (Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
Szintillator für wäßrige Proben (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland),  
Trichloressigsäure (TCA, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland),  
TEMED (Acris Feinchemikalien GmbH, Heidelberg, Deutschland),  
Thioharnstoff (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland),

---

Toluol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland),

TRIZMA (Tris, Sigma, Saint Louis, USA),

Triton X100 (Acris Feinchemikalien GmbH, Heidelberg, Deutschland),

Trypanblau (0,4 %, GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland),

Tween-20 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Alle Chemikalien waren vom Grad p.a., wenn nicht anders angegeben.

### 3.5 Biologische Materialien

in vitro kultivierte Zellen:

- HepG2 - Stammsammlung DSMZ Braunschweig Nr. ACC180 (Labor M. Strauss, MDC Berlin):  
Zellen, Cytosol, Golgimembranen, schwere Membranfraktion, Vesikelfractionen
- MT-1 Zellen (Brustkrebszellen der Maus)
- Spodoptera frugiperda (Sf9, Pharmingen, USA):  
Zellen, Zellextrakt

### 3.6 Lösungen

SDS-PP SDS-Probenpuffer nach Lämmlli [252]	1 % (w/v) SDS + 50 mM Tris (pH 6,5) + 1 % (v/v) $\beta$ -ME + 10 % (w/v) Glycerin + Bromphenolblau
SDS-EP	25 mM Tris-HCl (pH 6.8) + 192 mM Glycin + 0,1 % (w/v) SDS
IPG-PP 2D-Probenpuffer	2,5 g Harnstoff + 0,2 g CHAPS + 100 $\mu$ L 0,5 M DTE + 25 $\mu$ L Pharmalyte 3-10 auf 5 ml
IT-PP Thioharnstoff-haltiger 2D-Probenpuffer	IPG-PP + 0,76 g Thioharnstoff auf 5 ml
PP30	SDS-PP mit 30 % (w/v) Glycerin
HME	10 mM Hepes + 1 mM $MgCl_2$ + 1 mM EDTA
HMEP	HME+ 5 mM Ammoniumvanadat + 1,2 $\mu$ M Microcystin + 5 mM NaF + 50 $\mu$ M $AlCl_3$ + 10 $\mu$ M Ammoniummolybdat + 0,5 x Complete
4xRKT+Ca	200 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 4 mM $CaCl_2$ und 10 mM $MgCl_2$
4xRKT-Ca	200 mM Tris-HCl (pH 7,5) + 2 mM EGTA (pH 7,5) + 10 mM $MgCl_2$
HMEPZ	HME+ 20 mM KAc (pH 4,8) + 5 mM Ammoniumvanadat + 0,25 $\mu$ M Microcystin + 5 mM NaF + 50 $\mu$ M $AlCl_3$ + 10 $\mu$ M Ammoniummolybdat + 0,5 x Complete
10 mM $GTP\gamma S$	10 mM $GTP\gamma S$ + 20 mM HEPES (pH 7,5) + 0,2 mM DTE
ATP-REG ATP regenerierendes System für Kinase-Assays	5,3 mM ATP + 1,5 mM $MgCl_2$ + 8,5 mM Kreatinphosphat + 0,4 mg/ml Kreatinkinase
BAC-FIX	35 % (v/v) Isopropanol + 10 % (v/v) Eisessig
BAC-PP Probenpuffer nach Hartinger	22,5 % (w/v) Harnstoff + 5 % (w/v) 16-BAC + 1 % (w/v) Glycerin + 75 mM DTE + Krümel basisch Grün
10 x BAC-EP Elektrodenpuffer nach Hartinger	25 mM 16-BAC + 1,50 M Glycin + 0,50 M $H_3PO_4$
Calphostin C	50 $\mu$ g/ml in DMSO
CPC	10 % (w/v) Cetylpyridiniumchlorid
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) + 5 mM Glutathion
GAG-Waschlösung	12,88 g/l $Na_2SO_4$ + 5 g/l Cetylpyridiniumchlorid
Gö 6976	0,5 mg/ml
HistonIII	0,25 mg/ml
Lysepuffer	10 mM Tris-HCL (pH 7,5) + 130 mM NaCl + 1 % (w/v) Triton X100 + 10 mM NaF + 10 mM $Na_2HPO_4$ + 10 mM $Na_2H_2P_2O_7$
Microcystin	0,5 $\mu$ g/ $\mu$ L
PBS	100 mM NaCl + 20 mM $Na_xH_{3-x}PO_4$ (pH 7,2)
PMA	1mg/ml in DMSO
Ponceau S	2 mg/ml Ponceau-S + 0,3 % (v/v) Perchlorsäure + 10 % (v/v) Essigsäure
TBS-T	137 mM NaCl + 20 mM Tris-HCl (pH 7,1) + 0,1% (v/v) Tween-20
Toluol-Szintillator	4 g/l PPO + 50 mg/l POPOP in Toluol
Trypanblau (10x)	20 mM $Na_xH_{3-x}PO_4$ (pH 7,4) + 137 mM NaCl + 0,4 % (w/v) Trypanblau
Waschpuffer	10 mM $Na_2HPO_4$ (pH 7,4) + 1,8 mM $KH_2PO_4$ . 140 mM NaCl + 2,7 mM KCl

### 3.7 Antikörper

#### Primäre Antikörper:

Antikörper	Quelle
Aktin	Sigma, Saint Louis, USA
Annexin IV	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Cab45	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Clathrin (Coated vesicle sampler kit)	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Cytokeratin Antibody sampler kit	ONCOGENE Research Products, Cambridge, USA
Furin	Alexis Deutschland GmbH, Grünberg, Deutschland
$\gamma$ -Adaptin (Coated vesicle sampler kit)	Transduction Laboratories, Lexington, USA
GRP78	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Lysozym	ICN, Aurora, USA
MARCKS	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
PKC-Sampler Kit	Transduction Laboratories, Lexington, USA
PKC $\alpha$ (anti-catalytic domain, Typ III)	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
Profilin I	Dr. Jokusch, TU Braunschweig
Rab4 (Coated vesicle sampler kit)	Transduction Laboratories, Lexington, USA
Rab6	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Rab7	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Rab8	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
VAMP2	Calbiochem-Novabiochem Corp, San Diego, USA

#### sekundäre Antikörper:

anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat P0260	Dako A/S, Denmark