

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Verfahren

4.1.1 Kultivierung von HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden in 250 ml Zellkulturflaschen (Greiner) in 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit bei 37°C in 20 ml DMEM mit 10 % (v/v) FKS und Antibiotika (Penicillin: 50 U/l, Streptavidin: 50 mg/l) kultiviert. Die Flaschen waren mit Collagen-S beschichtet. Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen mit Trypsin (2 mg/l) vereinzelt, 1 : 5 verdünnt und neu ausgesät. Die Zellen wurden maximal bis zur 20. Passage benutzt.

Für die weiteren Versuche mit HepG2-Zellen wurden jeweils 2/5 der HepG2-Zellen einer Flasche nach Inkubation mit Trypsin auf eine 150 mM Petrischalen (Greiner) gegeben und in 20 ml Medium weiterkultiviert. HepG2-Zellen waren nach 3 Tagen zu etwa 80 % konfluent und wurden in diesem Stadium geerntet.

4.1.2 Kultivierung von Sf9-Zellen

Sf9-Zellen wurden nach [253] in 75 ml-Zellkulturflaschen (Greiner) mit 20000 Zellen/ml angesetzt und bei 27°C in 20 ml Excell 401 mit 10 % (v/v) FKS, Antibiotika (Penicillin: 50 U/l, Streptavidin: 50 mg/l) sowie 2.5 µg/ml „Fungizone“ (Amphotericin B) kultiviert. Nach drei bis vier Tagen wurden die Zellen 1 : 3 verdünnt und subkultiviert. Die Vitalität der Zellkulturen wurde durch Trypanblaufärbung überprüft und Kulturen mit weniger als 95 % Vitalität ausgesondert.

4.1.3 Radioaktive Markierung von Zellen mit [³⁵S]-Sulfat

Die Zellen wurden zweimal mit 5 ml Sulfat-freiem Medium (S-MEM) gespült, 20 Minuten mit S-MEM bei 37°C vorinkubiert und anschließend 5 Minuten mit 4 ml S-MEM in Gegenwart von 1 mCi [³⁵S]-Sulfat bei 37°C markiert. Die Markierung wurde durch Eiskühlung gestoppt und die Zellen wie in Kap. 4.1.4.1 aufgearbeitet. Das radioaktive Medium wurde zur Markierung einer zweiten Schale verwendet.

4.1.4 Präparation von Golgimembranen

4.1.4.1 Reinigung von Golgimembranen aus HepG2-Zellen nach Westermann

Konfluente HepG2-Zellen wurden nach Westermann [165] zweimal mit 5 ml eiskalter 0,25 M Saccharose in HME gewaschen und mit einem abgeschrägten Silikonstopfen abgeschabt. Nach

Zugabe eines hundertstel Volumens Proteasen-Inhibitoren-Mix (Complete) wurde die Zellsuspension durch zwölfmaliges Passagieren durch einen Zellcracker (Spaltweite 18 μ m, EMBL-Werkstatt, Heidelberg) aufgebrochen (s. Abb. 6). Die Färbung mit Trypanblau zeigte einen nahezu hundertprozentigen Aufschluß der Zellen bei intaktgebliebenen Zellkernen.

Das HepG2-Zellhomogenat (1) wurde 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert, um Zellbruchstücke und Zellkerne zu pelletieren (PNS-Gewinnung). Je 2 ml des postnuklearen Überstandes (PNS) wurden in einem SW60-Zentrifugenröhrchen mit je 1 ml 0,8 M Saccharose in HME und 1,2 M Saccharose in HME unterschichtet. Größere Volumina PNS (à 4 ml) wurden in SW40-Zentrifugenröhrchen mit je 2 ml 0,8 M Saccharose in HME und 1,2 M Saccharose in HME unterschichtet.

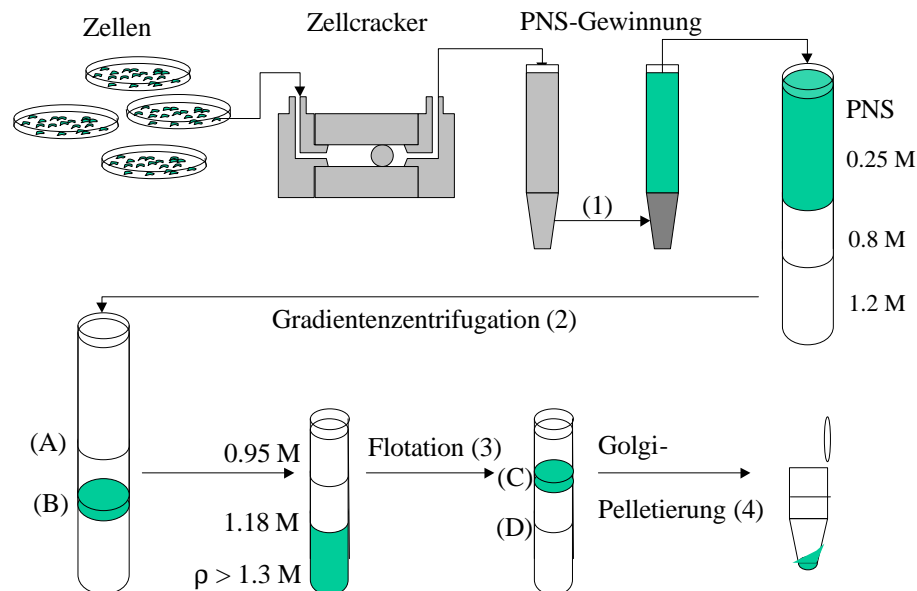


Abb. 6: Gewinnung angereicherter Golgimembranen aus HepG2-Zellen nach [165]

(1): PNS-Gewinnung.

(A): leichte Membranfraktion aus der Geschwindigkeits-Gradientenzentrifugation (2).

(B): Totalmembranfraktion aus der Geschwindigkeits-Gradientenzentrifugation (2).

(C): Golgifraktion aus der isopyknischen Zentrifugation.

(D): Schwere Membranfraktion aus der isopyknischen Zentrifugation.

(E): Golgipellet

Nach der Geschwindigkeits-Gradientenzentrifugation für 30 Minuten bei 100.000 x g und 4°C (2) wurde die Totalmembranfraktion (B) an der 0,8/1,2 M-Zwischenschicht gewonnen und mit Hilfe von 1,8 M Saccharose in HME auf eine Saccharosekonzentration von ca. 1,25 M eingestellt. Die verdünnte Totalmembranfraktion (TM) wurde unter einen Stufengradienten aus 0,95 M Saccharose in HME und 1,18 M Saccharose in HME gelegt und 2 Stunden bei 100.000 x g zentrifugiert (3).

Die Golgimembranen sammeln sich durch Flotation an der Grenzschicht zur 0,95 M Saccharose in HME (C, Golgifraktion). Die Golgifraktion wurde isoliert und nach Verdünnen mit 0,25 M Saccharose in HME für 15 Minuten bei 14.000 x g pelletiert (E, Golgipellet), in 0,25 M Saccharose in HME resuspendiert und entweder sofort weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

4.1.4.2 Anreicherung von TGN im Verlauf der Golgi-Präparation nach Westermann

Zur Ermittlung der TGN-Anreicherung im Verlauf der Golgi-Präparation nach Westermann (s. Kap. 4.1.4.1, [165]) wurden die Fraktionen A-D isoliert, mit 0,25 M Saccharose in HME verdünnt und für 15 Minuten bei 14.000 x g pelletiert. Die Pellets wurden mit SDS-PP extrahiert (s. Kap. 4.2.1.1). Das Cytosol wurde wie in Kap. 4.1.5 gewonnen und aufgearbeitet (s. Kap. 4.2.1.1).

4.1.5 Gewinnung cytosolischer Proteine aus HepG2-Zellen

Cytosolische Proteine (Cytosol) wurden durch Zentrifugation des Überstands der Geschwindigkeitsgradienten-Zentrifugation ((2) s. Abb. 6) für 30 Minuten bei 100000 x g erhalten. Das Cytosol wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.1.5.1 ATP-inkubiertes Cytosol (ATP-Cytosol)

Zur Gewinnung von ATP-Cytosol wurde das bereits aliquotierte Cytosol aufgetaut und mit 10 µl/ml einer 10 mM ATP-Lösung vermischt. Anschließend wurde die Mischung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und 30 Minuten bei 100000 x g (45000 rpm in TLA45) und 2°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde für weitere Versuche eingesetzt.

4.1.5.2 Isolierung von Proteinkomplexen aus dem ATP-Cytosol

ATP-Cytosol wurde mit 830 µM ATP, 166 µM MgCl₂, 1,66 mM Kreatinphosphat, 0,1 mg/ml Kreatinkinase und 40 µM GTP in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (Complete) für 30 Minuten bei 37°C erneut inkubiert. Ein Kontrollexperiment erfolgte in Gegenwart von 2,2 mM EGTA. Nach Inkubationsende wurden die Lösungen mit 100 µL 0,5 M Saccharose in HME unterschichtet und 15 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt simuliert die Rückgewinnung der Golgimembranen nach erfolgter in-vitro-Phosphorylierung eines Gemisches aus Cytosol und Golgimembranen (s. Kap. 4.2.4.2). Der Zentrifugationsüberstand wurde in SW40-Zentrifugenröhrchen auf einen linearen 0,5 bis 1,8 M Saccharosegradienten in HME geschichtet und nach einstündiger Geschwindigkeits-Gradientenzentrifugation bei 30000 rpm (100000 x g_{max}) und 2°C mit einer peristaltischen Pumpe unter gleichzeitiger Messung der UV-Adsorption bei 280 nm fraktioniert. Die gewonnenen 11 Fraktionen wurden jeweils mit 2 ml 0,25 M Saccharose in

HME verdünnt und nochmals bei 200000 x g (650000 rpm) und 2°C für 20 Minuten in einem TLX100.4 Rotor (Beckman, USA) pelletiert. Die pelletierten Proben wurden mittels SDS-PAGE nach Kap. 4.2.1.2 analysiert.

4.1.6 Vesikelbildung am TGN in zellfreien Systemen

Zur in vitro-Biogenese konstitutiver post-Golgi-Vesikel aus HepG2-Zellen wurde ein von Tooze und Huttner [254] für PC12 Zellen entwickeltes Verfahren und das System nach Ohashi und Huttner [96] so modifiziert, daß ein auf Golgizisternen basierendes System entstand [26]. Prinzipiell wird dabei die konstitutive Vesikelbildung am TGN von HepG2-Zellen durch Messung der Verpackung von [³⁵S]-Sulfat-markierten GAGs in post-Golgi-Vesikeln bestimmt [192,255].

4.1.6.1 Vesikelbildung an gereinigten Golgimembranen

Dazu wurden HepG2-Zellen wie in Kap. 4.1.3 beschrieben mit [³⁵S]-Sulfat markiert und hochgereinigte Golgimembranen (s. Kap. 4.1.4.1) präpariert.

Pro Ansatz wurden je 100 µl Cytosol (ca. 300 µg Protein aus unmarkierten Zellen), 35 µL ATP-REG sowie zusätzliche Agentien vorgelegt, mit 0,25 M Saccharose in HME auf 250 µL aufgefüllt und nach Zusatz von 50 µl Golgimembranen (markiert mit ca. 5.000 - 10.000 cpm) kurz gemischt. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert, mit je 200 µl 0,5 M Saccharose in HME unterschichtet und die nicht umgesetzten Golgimembranen durch 15 minütige Zentrifugation bei 14.000 x g pelletiert. Von dem so gewonnenen Überstand mit den neu gebildeten Vesikeln wurden 250 µL entnommen und die markierten HSPGs bestimmt.

4.1.6.2 Bestimmung des [³⁵S]-Sulfat-markierten HSPG

Die nach der Inkubation (s. Kap. 4.1.6.1) isolierten Golgipellets wurden mit 450 µl 1 % (w/v) Triton X100 in HME resuspendiert und 5 Minuten bei 37°C lysiert. Die Vesikelüberstände wurden mit 50 µL 10 % (w/v) Triton X100 in HME versetzt und ebenfalls 5 Minuten bei 37°C lysiert. Nach Zugabe von 10 µl Chondroitinsulfat (10 mg/ml) und 150 µl Cetylpyridiniumchlorid (CPC) wurden die Ansätze eine Stunde bei 37°C inkubiert und die präzipitierten HSPGs über ein Nitrocellulosefilter (0,45 µm Porenweite) abgesaugt und mit GAG-Waschlösung gewaschen. Die Filter wurden getrocknet, in Szintillatortröhrchen mit 5 ml Toluol-Szintillator versetzt und die gebundene Radioaktivität bestimmt.

4.1.7 *Proteinüberexpression*

4.1.7.1 Plasmid, Expressionssystem

Das Gen für PKC α lag in Form des Plasmids pBluescriptKS(+)-pkc α vor [148] und wurde vor Beginn der Arbeit in den Baculovirus-Transfervektor pACGHLT-B-pkc α umkloniert und die Expression des insertierten pkc α -Gens als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in Sf9 nachgewiesen [191].

Für die Expression von GST-PKC α wurden je 2×10^6 Sf9-Zellen pro 6 cm-Platte oder je 10^7 Zellen pro 75 cm²-Flasche ausgesät. Die Virusamplifikation erfolgte bei einer MOI von < 1 , wogegen zur Proteinproduktion eine MOI > 5 eingesetzt wurde. Die infizierten Zellen wurden 3-4 Tage nach der Infektion geerntet oder zur Virusamplifikation weiterkultiviert.

4.1.7.2 Aufarbeitung von GST-PKC α

Als Aufarbeitungsmethoden wurden sowohl die Säulenaufreinigung als auch die Batchreinigung verwendet. Zur Beendigung der Proteinexpression von GST-PKC α wurden die adhärennten Zellen mit Medium abgespült und durch fünfminütige Zentrifugation bei 2500 x g pelletiert. Pro 4×10^6 Sf9-Zellen wurde je 1 ml Lysepuffer zugegeben und die Zellsuspension anschließend für 45 Minuten auf Eis inkubiert. Eine dreimalige Ultraschallbehandlung für 5 Sekunden reichte, um die Zellen fast vollständig aufzuschließen. Das Lysat wurde 30 Minuten bei 40000 x g zentrifugiert und der Überstand mit einem affinitätschromatographischen Schritt von Verunreinigungen befreit.

4.1.7.2.1 Affinitätsreinigung nach dem Säulenreinigungsverfahren

Im Säulenreinigungsverfahren erfolgte dieser Reinigungsschritt mit Hilfe einer Niederdruck-Chromatographie-Anlage auf einer selbstgepackten 5 ml Chromatographiesäule, die mit Glutathion-Sephrose gefüllt war. Das geklärte Lysat aus Kap. 4.1.7.2 wurde auf die Säule aufgetragen und die Säule anschließend bei einem Durchsatz von 0,5 ml/min mit dem fünf- bis zehnfachen Säulenvolumen an Waschpuffer gespült. Die Elution des gebundenen Fusionsproteins erfolgte durch Spülung der Chromatographiesäule mit 5 mM Glutathion in Elutionspuffer. Eine zweite Konzentrationsstufe mit 200 mM Glutathion in Elutionspuffer kam zum Einsatz, um die Säule vollständig zu eluieren. Die Elution des Fusionsproteins wurde photometrisch bei 280 nm verfolgt. Ein typisches Chromatogramm der **Säulenaufreinigung** ist in Abb. 7 wiedergegeben.

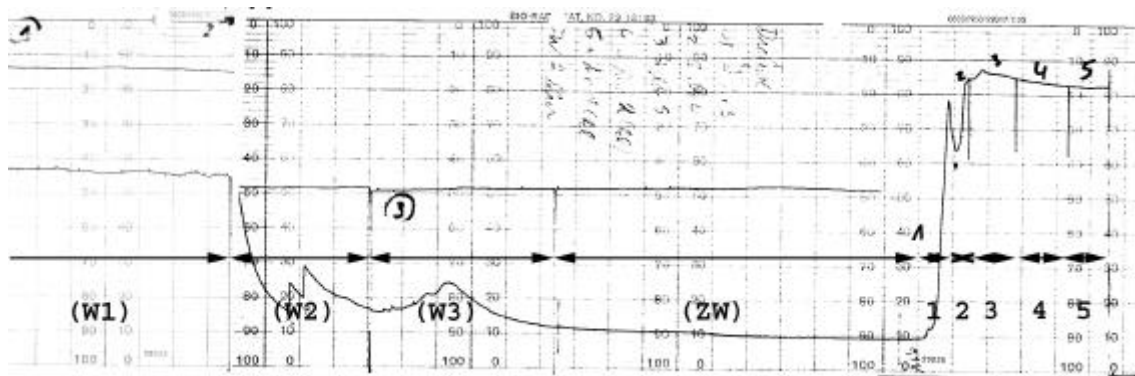


Abb. 7: Chromatogramm der Säulenaufreinigung von PKC α

(W1)-(W3): Waschfraktionen nach Auftrag des Zellaufschlußüberstandes.

(ZW): verworfene Waschfraktion.

1-5: Fraktionen der Glutathion-Elution mit 5 mM Glutathion im Elutionspuffer.

Die Reinheit der Fraktionen wurde durch SDS-PAGE (Kap. 4.2.1.1) und Nachweis des Fusionsproteins mit anti-PKC α kontrolliert (in Abb. 8 exemplarisch dokumentiert).

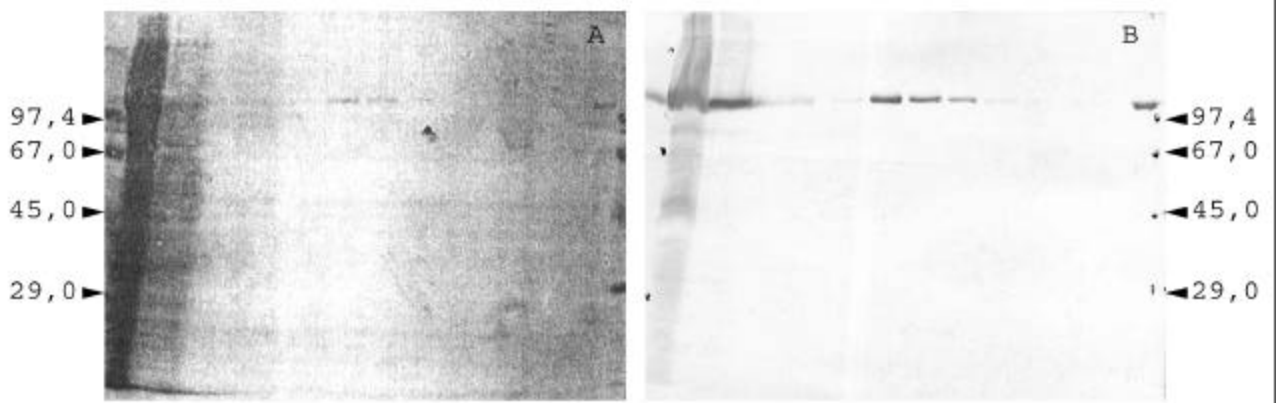


Abb. 8: Nachweis von GST-PKC α in den Fraktionen der Säulenaufreinigung.

A: Proteinanfärbung der Proteintransfermembran mit PonceauS.

B: DAB-Anfärbung des Nachweises von anti-PKC α .

Alle Fraktionen der Glutathion-Elutionsschritte sind aufgrund des hohen Glutathiongehaltes vor SDS-PAGE und Antigen-Nachweis über Nacht dialysiert worden.

4.1.7.2.2 Affinitätsreinigung nach dem Batchverfahren

Während der Zellernte von infizierten Sf9-Zellkulturen wurde die Hauptmasse der Zellkultur als feuchtes Zellpellet bei -80°C eingefroren. 200 μL der jeweiligen Zellsuspension wurden pro Kultur abzentrifugiert und mit 100 μL 2x SDS-PP lysiert. Der Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation bei 15000 \times g für eine SDS-PAGE bei -20°C eingefroren. Nach Ansammlung einer

ausreichenden Anzahl von Proben wurde mittels SDS-PAGE, Proteintransfer auf NC und anti-PKC α die Expression des Fusionsproteins in den einzelnen Chargen überprüft. Eine derartige Kontrolle der Sf9-Zellpellets auf Expression von GST-PKC α zeigt Abb. 9.

Nach Überprüfung der Expression wurden mehrere Infektionsansätze nach Lyse der Chargen analog zu Kap. 4.1.7.2.1 vereinigt. Zehn Volumina Zellysate wurden in einer zweistündigen Inkubation mit jeweils einem Volumen Glutathion-S-Sepharose bei 4°C an die Affinitätsmatrix gebunden. Danach wurde die Matrix sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Matrix fünfmal mit 5 Volumen Waschpuffer gewaschen.

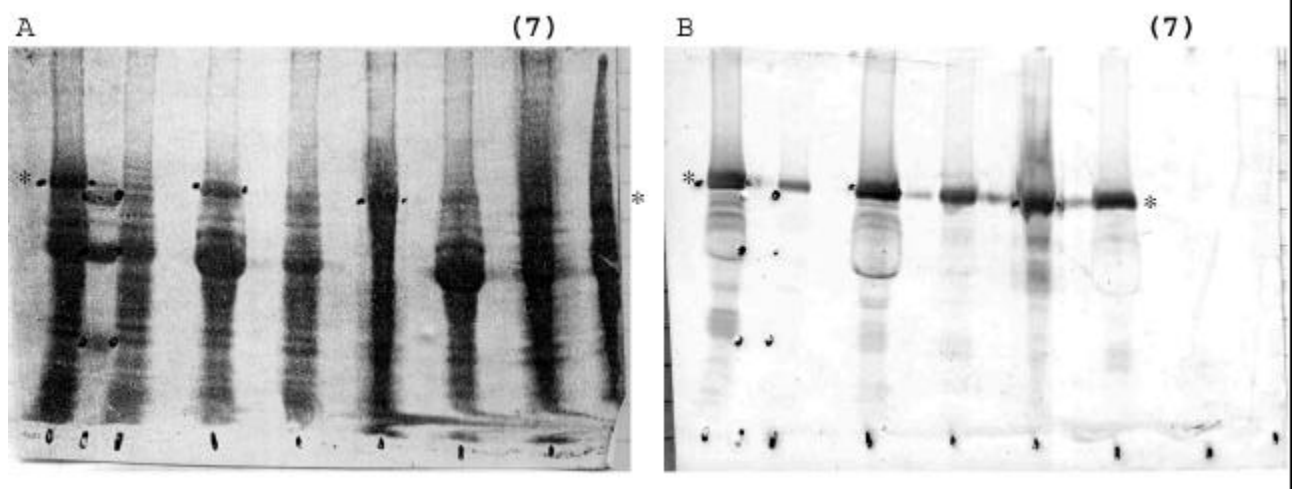


Abb. 9: Nachweis der PKC α -Expression in Aliquots der geernteten Sf9-Zellkulturen

A: Proteinfärbung der Transfermembran mit PonceauS.

B: DAB-Anfärbung des anti-PKC α -Nachweises.

Spur 7 markiert eine Sf9-Kultur ohne Infektion durch das Bacculo Viren-Konstrukt (Kontrolle).

Sterne (*) markieren die Position des Fusionsproteins.

Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mehrmals mit einem Volumen Elutionspuffer. Einen typischen Verlauf der Aufkonzentration während des Batchverfahrens präsentiert das Elektropherogramm in Abb. 10.

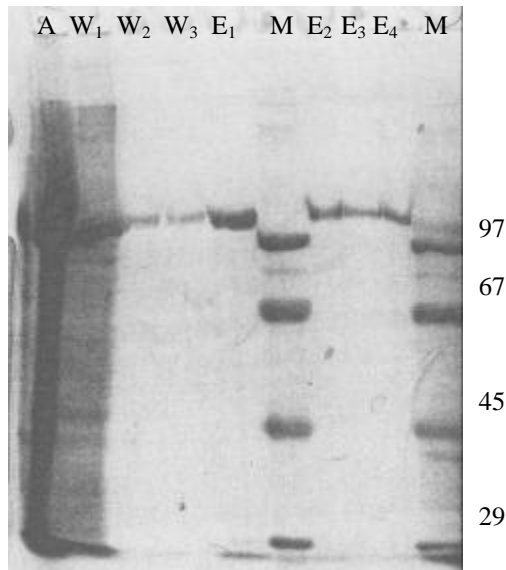


Abb. 10: PKC α Reinigung nach dem Batchverfahren.

Die Abbildung zeigt die Silberfärbung der Proteine nach [256].

A: Zellextrakt vor Bindung an Glutathion-Sepharose.

W₁ - W₃: Waschschrte mit Waschpuffer.

E₁ - E₄: Fraktionen der Glutathionelution.

M: Molekulargewichtsstandards in kD.

4.1.7.3 Dialyse und Aufbewahrung der Fusionsproteine

Die Eluate der Affinitätsreinigung wurden eine und drei Stunden gegen 100 Volumen Dialysepuffer dialysiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Dialyseschritt gegen 10 Volumen 55 % (w/v) Glycerin im Dialysepuffer über Nacht. Die Dialysate wurden aliquotiert und zur Aufbewahrung bei – 80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.1.7.4 Aktivitätsbestimmung von GST-PKC α

Im analytischen Filterassays wurde die enzymatische Aktivität der Dialysate mit Histon III als Kinasesubstrat ermittelt (s. Kap. 4.2.4.1). Dargestellt ist exemplarisch die Bestimmung des linearen Bereiches der Kinasereaktion für ein PKC α -Präparat mit 2,5 μ g/ml Proteingehalt (Abb. 11).

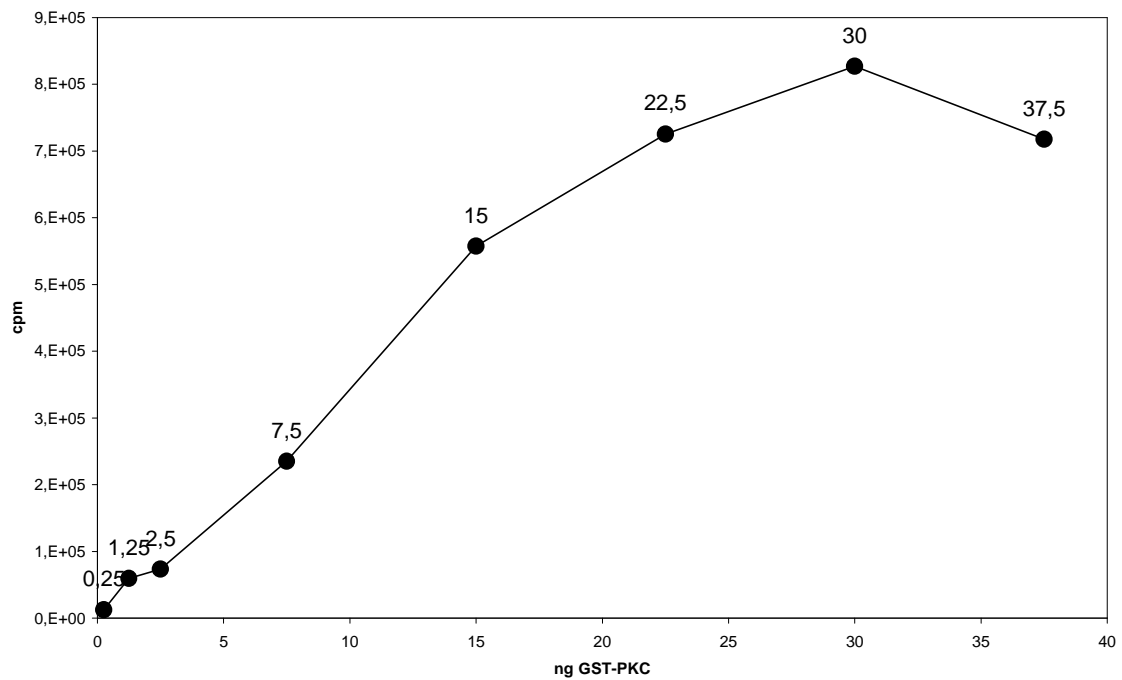


Abb. 11: Linearer Aktivitätsbereich eines PKC-Präparats mit 2,5 µg/ml GST-PKCα.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford [257]. Die Rohdaten sind in Tab. 10 wiedergegeben.

Die Kinasespezifität der Enzympräparate wurde durch den Einfluß des spezifischen PKC-Hemmers Calphostin C im analytischen in-vitro-Phosphorylierungsansatz überprüft (s. Abb. 12), da Calphostin C spezifisch mit der regulatorischen Domäne der PKC-Isoformen [258] interagiert. Im Kinase-Assay kamen 2,5 µg GST-PKCα und 10 µg Histon III pro Ansatz zum Einsatz.

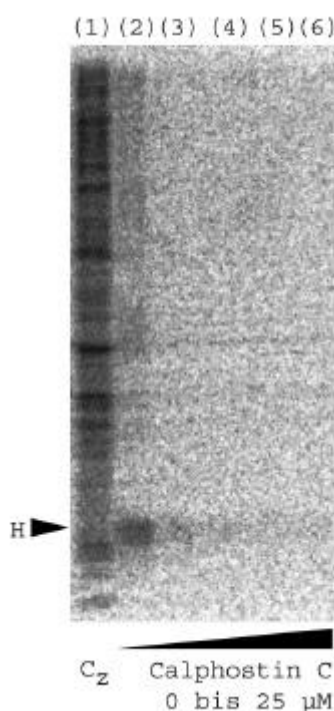


Abb. 12: Ermittlung der Kinasespezifität der Enzympräparate durch spezifische Hemmung der Kinaseaktivität im analytischen Kinaseassay (s. Kap. 4.2.4.1).

Die Kinasehemmung in den Ansätzen (2)-(6) erfolgte in Schritten von 0, 2,5, 6,25, 12,5 und 25 µM Calphostin C-Zugabe.

H: Position der Histonphosphorylierung.

C_z: endogene Kinaseaktivität von HepG2-Cytosol in Abwesenheit von Histon und GST-PKCα.

Da bereits bei einer Konzentration von 2,5 μM Calphostin C eine spezifische Kinasehemmung zu erkennen war, konnte davon ausgegangen werden, daß damit die Kinasespezifität ausreichend nachgewiesen wurde.

4.2 Biochemische Verfahren

4.2.1 Elektrophorese

4.2.1.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli

10 bis 100 μg Golgiproteine wurden mit 60 μL SDS-PP nach Laemmli [252] versetzt und 10 Minuten bei 98 °C inkubiert. 10 bis 100 μg cytosolische Proteine wurden mit 10 μL Strataclean für 10 Minuten inkubiert und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit 50 μL SDS-PP eluiert. Unlösliche Proteine oder Strataclean wurden abzentrifugiert und der Überstand durch Elektrophorese in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS bei 80-100 V aufgetrennt. Die Polyacrylamidkonzentration des Trenngels betrug 10 % (w/v) PAA, die des Sammelgels 4 % (w/v) PAA, wenn keine anderen Angaben gemacht sind.

4.2.1.2 SDS-PAGE mit kontinuierlichem Polyacrylamid-Gradienten

Bei der SDS-PAGE mit kontinuierlichem PAA-Gradienten wurde die gleiche Probenaufarbeitung beibehalten wie unter Kap. 4.2.1.1. Die Proben wurden allerdings zusätzlich weitere 10 Minuten mit je 4 mg Iodacetamid bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend 30 Minuten bei 100000 x g in einem 120.2 Rotor bei 20°C zentrifugiert, um unlösliche Proteine vollständig abzutrennen. Das Sammelgel wurde beibehalten, das Trenngel jedoch durch einen 7,5 bis 17,5 % (w/v) kontinuierlichen PAA-Gradienten ersetzt. Die Durchführung der Elektrophorese verlief analog zu Kap. 4.2.1.1.

4.2.1.3 2D-Elektrophorese nach Hartinger

10 bis 100 μg Golgiproteine und andere feste Proben wurden nach der Methode von Hartinger [259] mit 50 μl BAC-PP Protein versetzt, 5 Minuten bei 62°C und zur Endgruppenmethylierung durch Iodacetamid (c_{end} ca. 0,2 M) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand elektrophoretisch aufgetrennt. Das PAA-Gel der 1. Dimension nach Hartinger setzt sich aus einem 4 %igen (w/v) PAA-Sammelgel mit 10 % (w/v) Harnstoff und 125 mM Kaliumphosphat (pH 4,1) sowie einem 7,5 %-15 %igen (w/v) PAA-Gradientengel als Trenngel in Gegenwart von 18 % (w/v) Harnstoff und Kaliumphosphat (pH 2,1) zusammen. Die Elektrophorese des 14 x 16 cm großen Geles erfolgte in BAC-EP, startete bei

< 100 V und wurde mit einer Spannung von 140 V fortgesetzt, sobald der Farbmärker in das Trenngel eingewandert war. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele in BAC-FIX für 30 Minuten inkubiert, anschließend mit 0,15 % (w/v) Coomassie R 250 in BAC-FIX über Nacht gefärbt und für 1-2 Stunden entfärbt. Die gewünschten Gelstreifen wurden ausgeschnitten und für die zweite Dimension vorbereitet. Dazu wurden die Gelstreifen 10 Minuten in 10 ml SDS-PP inkubiert und anschließend 10 Minuten mit PP30 behandelt. Anschließend wurden die Gelstreifen mit einem Teflonkamm vorsichtig auf das Sammelgel des SDS-PAGE-Gradientengeles gedrückt (s. Kap. 4.2.1.2), das als zweite Dimension nach Hartinger zum Einsatz kam. Die Elektrophorese erfolgte wie in Kap. 4.2.1.2 beschrieben über Nacht bei einer Spannung von 100 V.

4.2.1.4 2D-Elektrophorese nach Görg

Die hier angewandte Variante der 2D-Elektrophorese nach Görg [260] bedient sich in der ersten Dimension eines trockenen PAA-Gelstreifens mit einem immobilisierten nichtlinearen pH-Gradienten von pH 3-10 (IPG-Streifen), der sich mit Probe-haltigem IT-PP rehydratisieren läßt. 10 bis 500 µg Golgiprotein wurden 30 Minuten bei 25°C auf einem Schüttler in 400 µL IT-PP inkubiert und weitere 30 Minuten bei 25°C im TLA45-Rotor bei 45000 rpm ($> 100000 \times g_{\max}$) zentrifugiert. Je 350 µL des Überstandes wurden pro trockenen 18 cm-IPG-Streifen aufgetragen, mit dünnflüssigem Parafin überschichtet und über Nacht rehydratisiert. Die isoelektrische Fokussierung startete mit einer Stunde bei 400 V und wurde über Nacht bei 3500 V fortgesetzt. Nach 84,5 kWh (25 h) wurde die isoelektrische Fokussierung beendet. Die Gelstreifen wurden zur Vorbereitung der anschließenden SDS-PAGE nach Kap. 4.2.1.2 als 2. Dimension folgendermaßen umequilibriert:

Tab. 4 : Protokoll der isoelektrischen Fokussierung

| Schritt | Spannung (V) | Stromstärke (mA) | Leistung (W) |
|--------------------|--------------|------------------|--------------|
| Vorlaufphase | 400 | 1 | 4 |
| Fokussierungsphase | 3500 | 1 | 4 |

Die Werte geben die maximal zu erreichenden Leistungsvorgaben an

Zuerst wurden die Gelstreifen für 15 Minuten in 10 ml PP30 und danach 15 Minuten in 10 ml PP30 + 481 mg Iodacetamid inkubiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Spannung von 100 V über Nacht und wurde am nächsten Tag bei bis zu 400 V abgeschlossen.

4.2.2 Western Blotting

Nach der ein- oder zweidimensionalen Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine 90 Minuten bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ auf Nitrocellulose (NC) nach dem Semi-Dry-Verfahren (Western-

Blotting) transferiert. Der Transfer wurde durch Färbung mit Ponceau S (s. Kap. 4.2.6.2.2) überprüft. Die NC wurde mit 5 % (w/v) BSA in TBS-T über Nacht abgesättigt und anschließend 1 bis 2 Stunden mit dem primären Antikörper in 1 % (w/v) BSA in TBS-T inkubiert. Nach Inkubation mit den an Meerrettichperoxidase gekoppelten sekundären Antikörpern im selben Puffer wurde die Peroxidase entweder mit Sigma Fast oder mit Chemilumineszenz nachgewiesen. Sämtliche Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4.2.3 Andere Antikörperreaktionen

4.2.3.1 1D- und 2D-„Overlay assay“ nach Newton

4.2.3.1.1 1D-Overlay

10 – 100 µg Golgiproteine wurden eindimensional in 7,5 - 15 % (w/v) Polyacrylamid-Gradientengelen aufgetrennt (s. Kap. 4.2.1.2), auf NC transferiert (s. Kap. 4.2.2), mit 5 % (w/v) BSA blockiert und nach einer von Chapline and Jaken [214] entwickelten Methode eine Stunde in einer Mini-Inkubationskammer (Fa Biometra) mit 10 µg/ml GST-GST-PKCα in TBS-T in Gegenwart von 1 µM Ca²⁺, 20 µg/ml PS und 100 ng/ml PMA inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne die Aktivatoren. Nach zwanzigminütiger Fixierung mit 0,5 % (v/v) Formaldehyd in PBS und Neutralisierung des überschüssigen Formaldehyds mit 2 % (w/v) Glycin in PBS für weitere 20 Minuten wurde der Blot in Gegenwart von TBS-T und 1 % (w/v) BSA mit einem PKCα-spezifischen Antikörper (Fa. Upstate, USA) eine Stunde inkubiert, mit Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat behandelt und das gebundene GST-PKCα indirekt durch die Chemiluminiszenzreaktion des Peroxidase-Konjugats mit Luminol nachgewiesen. Ein typisches Beispiel der eindimensionalen Overlaytechnik zeigt Abb. 13.

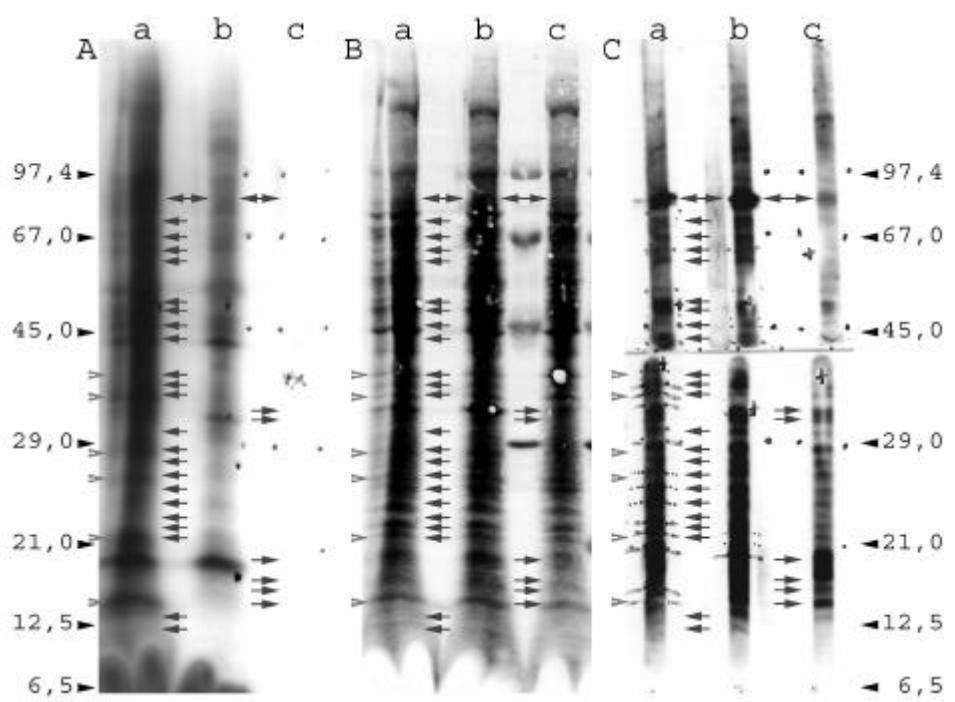


Abb. 13: 1D-Overlay von Golgi-angereicherten Membranproteinen mit aktivierter GST-PKC α in Gegenwart von PS und PMA

A.: Phosphorylierungsmuster der Golgi-proteine nach in-vitro-Phosphorylierung in Gegenwart von PMA (a) und Ro 31-8220 (b).

B.: PonceauS-Proteinfärbung der Proteintransfermembran vor dem Overlayversuch.

C.: Overlaysignale nach Bindung von PMA-stimulierter GST-PKC α (a+b) und unstimulierter GST-PKC α (c).

Die Bruchkante in C. kommt durch die Teilung der NC für den Bindungsversuch in einer Mini-Inkubationskammer zustande.

Der Kontrollversuch ist nicht abgebildet.

Hohle Pfeilspitzen bezeichnen die markantesten PKC-abhängigen Phosphorylierungen der in-vitro-Phosphorylierung.

Der Doppelpfeil markiert die Position endogener PKC α (s. auch C.a und C.b, wo das Overlaysignal breiter als die Inkubationsspur ist).

Alle linksgerichteten Pfeile markieren spezifische Bindungsproteine PMA-aktivierter GST-PKC α .

Rechtsgerichtete Pfeile markieren Bindungsproteine unstimulierter GST-PKC α .

4.2.3.1.2 2D-Overlay

100 bis 500 μ g Golgi-proteine wurden zweidimensional aufgetrennt (s. Kap. 4.2.1.4), auf NC transferiert, angefärbt und über Nacht in 5 % (w/v) BSA in TBS-T blockiert. Die weiteren Schritte wurden wie unter Kap. 4.2.3.1.1 durchgeführt, allerdings mit 1 μ g/ml GST-PKC α im Overlayassay.

4.2.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 20 mM PIPES (pH 6,8) und 20 μ g/ml Digitonin für zehn Minuten bei 25 °C permeabilisiert und mit PBS

abgespült. Anschließend wurde mit 3 % (v/v) Paraformaldehyd in 0,1 M Natriumphosphat-Lösung (pH 7,0) für dreißig Minuten fixiert, mit Tris-Glycin Puffer (pH 7,5) überschüssiges Paraformaldehyd neutralisiert und mit 1 % (w/v) BSA und 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS blockiert. Anschließend wurden folgende Inkubationsschritte der Reihe nach durchgeführt:

1. Inkubation mit einem monoklonalen Antikörper gegen das nachzuweisende Protein (Spender Maus),
2. Reaktion mit einem Cy2-markierten anti-Maus Immunglobulin G (IgG) Antikörper,
3. Inkubation mit einem polyclonalen Antikörper gegen TGN38 (Spender Kaninchen, [26]) und
4. Reaktion mit einem Cy3-markierten anti-Kaninchen IgG-Antikörper.

Die Fluoreszenz wurde mit einem konfokalen „Laser Scanning“-Mikroskop bestimmt.

4.2.4 Phosphorylierungsansätze

4.2.4.1 Filterassay adaptiert nach Hannun et al. 1985

Im Filterassay nach Hannun et al. 1985 [261] wurden die Kinaseaktivität der PKC-Präparationen überprüft. Dazu wurde eine 1 µL Probe mit 39 µL Kinasepremix mit Ca^{2+} (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 12,5 mM MgCl_2 , 125 mM CaCl_2 , 12,5 µM [^{32}P]- γATP (ca $1,5 \times 10^6$ cpm/nmol), 0,25 µg/µL Histon III-S, 66 µM PS und 16 µM DAG) für 10 Minuten bei 27°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 0,1 % (w/v) BSA und 1 ml eiskalter 25 % (w/v) TCA gestoppt und zur Proteinfällung weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Whatman GF/C-Filtern abgesaugt und die eingebaute Radioaktivität der Proteine auf den getrockneten Filtern im Szintillationszähler bestimmt.

4.2.4.2 Analytische Phosphorylierungsansätze

Golgiembranen mit 10 bis 100 µg Golgiprotein wurden zusammen mit der fünffachen Menge Cytosol in einem Reaktionsansatz von 40 µL Gesamtvolumen in Gegenwart von 10 mM Vanadat, 2,5 µM Microcystin, 10 mM NaF, 100 µM Ammoniummolybdat, 20 µM ATP, Complete, 10 µL 4*RKT+Ca, 25 µM GTP γ S und 82,5 µM PMA für 30 Minuten bei 37 °C phosphoryliert.

Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 100 µL 0,5 M Saccharose in HME unterschichtet und 15 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Überstand und Golgipellet wurden wie im Kap. 4.2.1.1 beschrieben aufgetrennt und auf Einbau von Radioaktivität analysiert.

Um den Effekt der verschiedenen Komponenten zu testen, wurde auf entsprechende Zusätze verzichtet.

4.2.4.3 Präparative Phosphorylierungsansätze

Golgi pellets (200 - 900 µg Protein) wurden in 50 µL 0,25 M Saccharose in HMEP resuspendiert. Von dieser Suspension wurden pro 400 µL Reaktionsansatz ca. 200 µg Golgi protein-haltige Suspension in HMEP mit 1000 µg cytosolischer Proteine in Gegenwart von 10 µM ATP, [³²P]-ATP, 12,5 µM GTPγS und 42 µM PMA für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrollexperiment dienten Ansätze in Gegenwart von 2,5 µg/ml Ro 31-8220. Nach der Phosphorylierung wurden zwei gleichartige Ansätze vermischt und bei 45000 rpm für 30 Minuten bei 2°C zentrifugiert. Der Überstand (cytosolische Proteine) wurde verworfen und das Pellet mit 0,6 ml 0,25 M Saccharose in HMEP in Gegenwart von 16 µM GTPγS erneut resuspendiert und weitere 30 Minuten bei 45000 rpm und 2°C pelletiert. Die herunterzentrifugierten Phosphoproteine wurden entweder durch SDS-PAGE nach Kap. 4.2.1.2 oder durch 2D-Elektrophorese nach Kap. 4.2.1.3 oder Kap. 4.2.1.4 analysiert.

4.2.4.4 In-situ-Phosphorylierung permeabilisierter HepG2-Zellen

Die HepG2-Zellen aus drei 150 mM Petrischalen wurden 3x mit 3,5 ml eisgekühlter 0,25 M Saccharose in HMEPZ gespült, abgeschabt und durch zweimaliges Passagieren durch den Zellcracker permeabilisiert. Die Überprüfung durch Trypanblau zeigte mehr als 90 % Permeabilisierung. Pro Reaktionsansatz wurden 580 µL PNS in HMEPZ in Gegenwart von 2 µL MC (0,5 µg/µL), 2 µL GTPγS (10 mM), 4 µL PMA (1mg/ml) und 8,33 µL [³²P]-γATP in einem Reaktionsansatz von 600 µL für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In einem Kontrollversuch wurde 4 µL Gö 6976 (0,5 mg/ml) statt PMA zugesetzt.

Nach der Phosphorylierung wurden die Phosphorylierungsansätze mit unmarkiertem PNS aus sieben 150 mM Petrischalen mit HepG2-Zellen gemischt und durch 12 maliges Passagieren im Zellcracker vollständig aufgeschlossen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Kap. 4.1.4.1. Die gewonnenen Golgi-Pellets wurden durch zur 2D-Elektrophorese nach Görg (Kap. 4.2.1.4) analysiert.

4.2.4.5 Proteinsequenzierung

Nach Autoradiographie oder Phosphoimaging wurden Phosphoprotein-haltige Gelstücke ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut [262]. Die dabei entstandenen Peptide wurden durch Bindung an RP18 und Elution mit 5- 10 µL 60 % (v/v) Acetonitril / 0,1 % (w/v) TFA entsalzen. Für die MS-MS-Analyse der Peptide diente ein Q-TOF der Fa. Micromass (Manchester, UK) mit Nanoflow Z-spray Vorrichtung. Zur Identifikation der Peptide wurde der Sequence Taq mit anschließender Datenbankrecherche in einer nichtredundanten translatierten Nucleotid-Datenbank genutzt. [262]

4.2.5 Nachweis potentieller PKC-Substrate als Bestandteil von post-Golgi-Vesikeln

4.2.5.1 Nachweis im Geschwindigkeitsgradienten

Die fast konfluenten HepG2-Zellen aus vier 150 ml Petrischalen wurden wie in Kap. 4.1.3 beschrieben, mit 2 mCi [³⁵S]-SO₄ metabolisch markiert und die angereicherten [³⁵S]-HSPG-markierten Golgimembranen nach Kap. 4.1.4.1 isoliert. Die in-vitro-Vesikelbiogenese wurde in 900 µL-Ansätzen in Gegenwart von 48 µL Golgisuspension, 700 µL Cytosol, 0,8 mM ATP, 165 µM MgCl₂, 1,65 mM Kreatinphosphat, 0,1 mg/ml Kreatinkinase, Complete, 4 µL GTP oder GTPγS durchgeführt. Nach Reaktionsende wurde der Reaktionsansatz mit 100 µL 0,8 M Saccharose in HME unterschichtet und 15 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Der Golgimembranfreie Überstand wurde mit unmarkiertem Überstand gemischt und in SW40 Zentrifugenröhrchen überführt und bei 30000 rpm at 2°C für eine Stunde zentrifugiert. Beim Auspumpen des Gradienten wurden 1 ml Fraktionen gesammelt. Fällbare Proteinkomplexe wurden nach Vermischung der Gradienten-Fraktionen mit 2 ml 0,25 M Saccharose in HME durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 2 °C und 200000 x g (650000 rpm) in einem TLX 100.4-Rotor sedimentiert (Beckman, USA). Die Pellets wurden durch SDS-PAGE (Kap. 4.2.1.2) analysiert.

4.2.5.2 Nachweis mittels isopyknischer Zentrifugation

Aus zwei 150 mM Petrischalen mit HepG2-Zellen wurden wie in Kap. 4.2.5.1 durch in-vitro-Vesikelbiogenese eine markierte Vesikelphase gewonnen und von Golgimembranen getrennt.

Die Vesikelphase wurde nach Vermischung mit 2 Volumen 2 M Saccharose in HME, in SW60-Zentrifugenröhrchen unter einen Stufengradienten bestehend aus 0,5 ml 0,25 M Saccharose in HME and 0,5 ml 1,2 M Saccharose in HME geschichtet und 2 Stunden bei 30000 rpm und 2 °C fraktioniert. Die gewonnenen Fraktionen wurden mit 2 Volumen 0,25 M Saccharose in HME vermischt und für 22 min bei 200000*g (650000 rpm) und 2 °C in einem TLX 100.4-Rotor pelletiert. Die gewonnenen Überstände wurden über Nacht mit Aceton gefällt und die Pellets mit SDS-PP zur anschließenden SDS-PAGE vorbereitet.

4.2.6 Sonstige Methoden

4.2.6.1 Proteinbestimmung

Die Proteinmenge wurde nach der Methode von Bradford bestimmt [257].

Die Probe (1 - 10 µg Protein in 50 µl) wurde mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und nach 5 Minuten die Lichtabsorption bei 595 nm bestimmt. Zur Korrelation des Proteingehalts mit der Absorption wurde eine Eichkurve mit BSA erstellt.

4.2.6.2 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen und auf Nitrocellulose

4.2.6.2.1 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau

Polyacrylamidgele wurden 30 Minuten mit 10 % (v/v) Essigsäure und 30 % (v/v) Ethanol fixiert und anschließend 10 - 20 Minuten mit 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau in 10 % (v/v) Essigsäure/30 % (v/v) Ethanol gefärbt. Nach mehrstündigem Entfärben der Gele in 10 % (v/v) Essigsäure/30 % (v/v) Ethanol wurden die Gele 1 Stunde in 4 % (w/v) Glycerin / 25 % (v/v) Methanol stabilisiert und anschließend bei ca. 70°C unter Vakuum getrocknet.

4.2.6.2.2 Proteinfärbung mit Ponceau S

Um Proteine nach ihrem Transfer auf NC nachzuweisen, wurden sie mit Ponceau S angefärbt. Dazu wurde eine Stammlösung aus 2 % (w/v) Ponceau S in 30 % (w/v) Trichloressigsäure und 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure in Wasser hergestellt. Zum Gebrauch wurde die Stammlösung mit 9 Volumen Wasser verdünnt. Die NC wurde 2 bis 3 Minuten mit der Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen.