

5. Material und Methoden

5.1 Zellkultur

Die Kultivierung von Neuroblastoma Neuro 2a-Zellen der Maus erfolgte in nach Dulbecco modifiziertem Eagle's Medium (DMEM) ergänzt durch 10% fötales Kälberserum, 100 µg/ml Streptomycin und 100 Einheiten/ml Penicillin bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂. Pheochromocytoma PC12-Zellen oder 615-Zellen der Ratte (letztere Zellen sind stabil mit der Rezeptortyrosinkinase TrkA, dem hochaffinen Rezeptor für NGF transfizierte PC12-Zellen, ein freundliches Geschenk von Dr. B. Hempstead, Dept. of Pathology, Cornell University Medical College, New York) wurden in DMEM ergänzt durch 5% fötales Kälberserum/10% Pferdeserum sowie 100 µg/ml Streptomycin und 100 Einheiten/ml Penicillin bei 37°C in befeuchteter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

5.2 Präparation von Zellkernen und Kernhüllen

5.2.1 Kern- und Kernhüllenpräparation aus Neuro 2a-Zellen

Kerne von Neuroblastoma Neuro 2A-Zellen wurden nach Emig et al. (1995) präpariert. Neuro 2a-Zellen von 15 Kulturschalen wurden nach Abnahme des Mediums mit 20 ml PBS/Schale gewaschen, abgeschabt und in je 20 ml PBS resuspendiert. Nach Zentrifugation für 5 min. bei 4°C und 500×g wurden die Zellen mit PBS (je 10 ml pro Zellen von einer Kulturschale) gewaschen, wie zuvor zentrifugiert und in je 2 ml STM 0,25 aufgenommen. Dies entsprach einem Gesamtvolumen von 30 ml Zellsuspension in STM 0,25. Die Zellsuspension wurde auf final 0,05% (w/v) Nonidet NP40 eingestellt. Die Zellen wurden in dieser Suspension durch 45 Züge in einem Glas-/Glasdouncer homogenisiert. Die Suspension in STM 0,25 (30 ml) wurde durch Zusatz eines adäquaten Volumens STM 2,1 (51,6 ml) auf 1,42 M Sucrose (STM 1,42) eingestellt und auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten geschichtet. Die Schichtung des Gradienten (pro Röhrchen) erfolgte folgendermaßen (von unten nach oben): 2 ml STM 2,1; 20,4 ml Zellhomogenat-STM 1,42; 2,5 ml STM 0,8; 2,5 ml STM 0,25. Die Proben wurden für 65 min. bei 4°C in einer Kontron-Ultrazentrifuge im Schwingrotor TST 28.38 bei 23000 rpm

zentrifugiert. Die Zellkerne werden dabei pelletiert, während Mikrosomen an der Phasengrenze zu STM 0,8 angereichert werden. Die Zellkernpellets wurden in insgesamt 2 ml STM 0,25 aufgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -70°C aufbewahrt.

STM-X-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4
5 mM MgSO_4
2 mM Dithioerythrit (DTE)
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin
10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin
1 mM Na_3VO_4
X M Sucrose

Kernmembranen wurden nach einer modifizierten Form der Methode von Otto et al. (1992) präpariert. Die Kerne (5-8 mg Protein) wurden auf Eis in 40 ml TP Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ pH 7.4, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin) in Gegenwart von 250 $\mu\text{g/ml}$ Heparin, 1 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF und 400 Einheiten von Benzon Nuclease (Merck) suspendiert. Die Suspension wurde 90 min bei 4°C gerührt. Die Kernmembranen wurden dann durch Zentrifugation für 30 min bei 10000g bei 4°C pelletiert und in STM 0.25 Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 0.25M Sucrose, 5 mM MgSO_4 , 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin) zu etwa 1 mg/ml resuspendiert. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (1976). In den Kernmembranpräparationen verblieben etwa 6-9% des gesamten Kernproteins.

5.2.2 Kern- und Kernhüllenpräparation aus PC12-Zellen

Kerne aus Ratten-Pheochromocytoma PC 12-Zellen wurden in Anlehnung an die Methode von Tang et al. (1996) präpariert. Die Volumina sind angegeben für Zellen auf einer Kulturschale (14 cm \varnothing). Die Zellen wurden durch Abschaben von den Kulturplatten geerntet und in 10 ml Puffer B (10 mM Tris/HCL pH 7,4, 0,32 M Sucrose, 3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂,) suspendiert und einmal mit dem gleichen Puffer gewaschen. Die Zellen wurden dann homogenisiert durch Douncen in einem Glas-Douncer (20 Züge) in 10 ml Puffer B ergänzt durch 1 mM Na₃VO₄ und die Proteaseinhibitoren 1 mM PMSF, 10 μ g/ml Aprotinin und 10 μ g/ml Leupeptin. Die Suspension wurde 10 min bei 4°C und 700g zentrifugiert. Das Pellet wurde aufgenommen in 2 ml des ergänzten Puffers B mit zusätzlich 0,2% (w/v) Triton X-100 und für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt konnte lichtmikroskopisch verfolgt werden, wie die Plasmamembran noch intakter Zellen solubilisiert wurde, die Zellkerne aber morphologisch unverändert blieben. Die Suspension wurde erneut für 10 min. bei 4°C und 700g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer A (1 mM Na_xH_xPO₄, pH 6,5, 0,32 M Sucrose, 3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ ergänzt durch Proteaseinhibitoren wie oben und 1 mM Na₃VO₄ resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten (je 3 ml 0,8 M, 1,2 M, 2M Sucrose in Puffer A) aufgetragen und für 60 min. bei 4°C und 28000 rpm (Schwingrotor TST.41) zentrifugiert. Dabei wurden die Kerne pelletiert, während eine Mikrosomenfraktion an der Phasengrenze zwischen 1,2 M Sucrose und 2 M Sucrose verblieb. Bei jedem Schritt wurde ein Aliquot für eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot zur Charakterisierung der Fraktionen entnommen. Die Kerne wurden in Puffer B ergänzt durch Proteaseinhibitoren und 1 mM Na₃VO₄ aufgenommen, bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die Kernhüllenpräparation erfolgte wie bei den Neuro 2a-Zellen.

5.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die zu vermessende Probe, die eine Proteinmenge zwischen 5-20 µg enthalten sollte, wurde mit H₂O bidest. auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Hinzugefügt wurden 500 µl des Bradford-Reagenz. Die Kalibrierung der Messung erfolgt über eine nach dem gleichen Schema parallel zu den Proben angesetzte Konzentrationsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) mit Proteinmengen zwischen 0-30 µg/Ansatz. Proben und Standards wurden photometrisch bei λ=595 nm vermessen und die Proteinmenge in den Proben mit der Kalibrierreihe korreliert. Die Methode eignet sich nicht für Proben, die Detergentien oder reduzierende Substanzen enthalten.

<u>Bradford-Reagenz:</u>	Coomassie Brilliant Blue G-250	0,06% (w/v)
	Perchlorsäure (70-72%)	42,8% (w/v)

5.3 Zellstimulierung und *In vitro* Phosphorylierung

5.3.1 Stimulierung von PC 12-Zellen und 615-Zellen mit NGF und Kultivierung von Neuro 2a-Zellen in Gegenwart von Kalium-(2,2'-Bipyridin)-oxobisperoxovanadat (V)

PC 12-Zellen oder 615-Zellen wurden nach der letzten Passage auf Kulturschalen oder nach Aussaat auf einem Poly-L-Lysin-beschichteten 15-Loch-Objektträger (s. Abschn. 5.4.6) für 24 h in Medium (Abschn. 5.1) kultiviert. Dem Kulturmedium der Hälfte der Zellen wurde dann für 24 h 50 ng/ml NGF (2,5 S, human, rekombinant) hinzugefügt. Die Zellen wurden dann entweder für die Kernhüllenpräparation geerntet oder für die indirekte Immunfluoreszenz (s. Abschn. 5.4.6) verwendet.

Neuro 2a-Zellen wurden nach der letzten Passage für 24 h kultiviert. Dem Kulturmedium der Hälfte der Zellen wurde für 20 min. 100 µM K[VO(O₂)₂]C₁₀H₈N₂ (Kalium-(2,2'-Bipyridin)-

oxobisperoxovanadat (V), BiPy) hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für die Kernhüllenpräparation geerntet oder für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Synthese von BiPy nach Posner et al. (1994)

1,95 g KOH-Pastillen wurden in 30 ml H₂O bidest. gelöst. 2,75g (15 mmol) Na₂V₂O₅ wurden unter Rühren bei Raumtemperatur (RT) hinzugefügt, danach 1,5 ml 30% (w/v) H₂O₂. Die Lösung wurde für weitere 5 min. bei RT gerührt. Die Lösung wurde dann filtriert, das Filtrat wurde für 30 min. bei RT stengelassen. 5g (32 mmol) Bipyridin in 20 ml Äthanol wurden unter Rühren dem Filtrat hinzugefügt und die Lösung für weitere 30 min. bei RT inkubiert. Tropfenweise wurden 100 ml Äthanol zur Lösung hinzugefügt, und das Reaktionsgefäß wurde zum Auskristallisieren des Produktes bei 4°C inkubiert. Verbliebenes Bipyridin sollte dabei in Lösung verbleiben. Das Produkt wurde durch Filtrieren unter Wasserstrahlpumpen-Vakuum gewonnen. Der Filterkuchen wurde mit weiteren 100 ml eiskalten Äthanol gewaschen und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Ausbeute betrug 5g (≈50%). Die Struktursicherung erfolgte über Molekulargewichtsbestimmung des Reaktionsproduktes mit massenspektrometrischen Methoden sowie mit Infrarot- und Ramanspektroskopie. Die Spektroskopie für die Struktursicherung wurde von Dr. W.-D. Hunnius, Institut für Anorganische und Analytische Chemie, FU Berlin, durchgeführt.

5.3 2 In vitro Phosphorylierung

0.5 mg Kernmembranprotein oder intakte Kerne wurden entweder direkt nach der Präparation oder nach zwischenzeitlichem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Lagerung bei -70°C mit Hilfe endogener Proteinkinasen *in vitro* phosphoryliert. Die Reaktion wurde bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mg/ml in 20 mM Tris/HCl pH7.4, 1 mM Ouabain, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 0.1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, und 10 µg/ml Leupeptin in Gegenwart von 10 µM γ-³²P-ATP (spezifische Aktivität ca. 1 µCi/nmol) für 15 min bei 30°C ausgeführt. Zum Stoppen der Reaktion wurde BAC-Probenpuffer im Volumenverhältnis 1:1 zum Reaktionsansatz hinzugefügt. In einigen Experimenten (s.Abschn. 3) enthielten die Reaktionsansätze zusätzlich 100 µM BiPy. Für die *in vitro* Phosphorylierung mit rekombinanter PKC α (23 Einheiten/Ansatz) wurde der Reaktionspuffer durch 100 nM Phorbol-

12-Myristat-13-Acetat-4-O-Methylester (PMA) ergänzt. In einem weiteren Experiment wurden anstelle von Kernmembranprotein 10 µg rekombinanten LAP 2β als PKC α-Substrat verwendet.

5.4 Antikörper und Immunchemische Methoden:

5.4.1 Antikörper R1

Das polyklonale Antiserum R1 wurde gegen ein C-terminales Peptid von LAP 2β (Reste 438-451, GNPFTNFLQDTKIS) im Labor von Prof. Viktor Tsetlin, Shemyakin Ovchinnikov Institut für Bioorganische Chemie, Moskau, erzeugt. Das Antiserum erkennt (nach dem apparenten Molekulargewicht der Proteine in der Gelelektrophorese und, im Falle von LAP 2β and 2ε, der Analyse in der MALDI-Massenspektrometrie zufolge) die Lamina-assoziierten Polypeptide 2β, 2γ, and 2ε. Für Immunopräzipitations-Experimente wurden die Antikörper durch Dimethylsuberimidat mit Protein G-Sepharose (Pharmacia) vernetzt. 50 µl Protein G-Sepharose-gekoppelter R1-Antikörper wurden zu den Immunpräzipitationsansätzen hinzugefügt. Für Western Blots immunopräzipitierter Proben wurden Protein G-Sepharose-gereinigte Antikörper mit Sulfo-NHS-Biotin (Pierce) biotinyliert. Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin (Sigma) wurde zur Visualisierung durch verstärkte Chemolumineszenz (ECL) eingesetzt, wenn die Western Blots mit dem biotinylierten primären Antikörper analysiert wurden. Dieses Detektionssystem wurde gewählt, weil LAP 2β in der Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) mit der schweren Antikörperkette komigriert. Der biotinylierte R1-Antikörper (zur Verfügung gestellt von Dr H. Otto, FU Berlin) wurde in einer Verdünnung von 1:200 für Western Blots eingesetzt. Im anti-LAP 2β-Western Blot nach BAC-Gelelektrophorese wurde der Antikörper R1 in einer Verdünnung von 1:2000, in der indirekten Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt.

Kopplung der Antikörper an Protein G-Sepharose:

In einem typischen Experiment wurde 1 ml R1-Antikörper-Stocklösung auf 10 ml mit Puffer A (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) verdünnt, 0,5 ml mit Puffer A äquilibrierte Protein G-Sepharose wurden hinzugefügt, und die Suspension wurde für 1 h bei 4°C

unter Schütteln inkubiert. Nach Abzentrifugieren (alle Zentrifugationsschritte: 1 min. bei 4°C und 1000 rpm in der Zell-Zentrifuge) wurden die Beads 5× mit je 10 ml Puffer A und 2× mit je 10 ml 0,2M Natriumborat pH 9 (Boratpuffer) gewaschen. Dazwischen erfolgten jeweils Zentrifugationsschritte. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Protein G-Sepharose-gebundenen Antikörper in 10 ml Boratpuffer resuspendiert. Die kovalente Kopplung der Antikörper an die Protein G-Sepharose erfolgte durch Zusatz von 60 mg Dimethylsuberimidat (DMS, final 22 mM). Es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln. Die Vernetzungsreaktion wurde durch den Zusatz von Substanz mit primären Aminen gestoppt. Nach der Reaktion wurden die Beads pellettiert und der Überstand der Vernetzungsreaktion daher durch 10 ml 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 ersetzt und die Suspension für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Beads 4× mit je 10 ml TBS (20 mM Tris/HCl pH 7,4, 137 mM NaCl) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Beads im Verhältnis 1:2 ihres abgeschätzten Volumens in TBS unter Zusatz einer Spatelspitze Natriumazids resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt.

5.4.2 Antiphosphotyrosin-Antikörper

Für Western Blots wurden verschiedene monoklonale Antikörper gegen Phosphotyrosin getestet: PY 20 und RC 20 (Dianova), 4G10 (Upstate Biotechnologies) sowie PY 99 (Santa Cruz Biotechnologies). Die Antikörper wurden als Meerrettichperoxidase-Konjugat eingesetzt und mit verstärkter Chemolumineszenz (ECL) detektiert. Seit der Erhältlichkeit des Antikörpers PY 99 wurde ausschließlich dieser verwendet, da dieser Antikörper im Vergleich zu den anderen verwendeten anti-Phosphotyrosin-Antikörpern in Gegenwart physiologischer Salzkonzentrationen in allen Anwendungen (Western Blot, Immunpräzipitation und indirekte Immunfluoreszenz) reproduzierbare Signale lieferte. Für die Immunpräzipitation wurden zunächst biotinylierte RC 20-Antikörper eingesetzt, die durch Streptavidin-Agarose präzipitiert wurden, später Agarose-konjugierte PY 99-Antikörper. Im Western Blot wurden die Antikörper 1:2000 verdünnt eingesetzt, in der Immunpräzipitation wurden 5µg Antikörper pro Ansatz eingesetzt. Für die indirekte Immunfluoreszenz (IF) wurde ausschließlich der Antikörper PY 99 verwendet (Verdünnung von 1:50).

5.4.3 Sonstige verwendete Antikörper

Als primäre Antikörper wurden in verschiedenen Experimenten eingesetzt: anti-Lamin A/C (1:1000 im Western Blot, WB), der freundlicherweise von Dr. F. McKeon (Dept. of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston) zur Verfügung gestellt worden ist, als sekundäre Antikörper: anti-Maus alkalische Phosphatase-Konjugat (1:2000, WB), anti-Maus- Meerrettichperoxidase-Konjugat, (1:2000, WB), anti-Kaninchen-alkalische Phosphatase-oder Meerrettichperoxidase-Konjugat (jeweils 1:2000), anti-Maus Texas Red (1:200, IF), anti-Maus Cy³ (1:200, IF), anti-Kaninchen Cy², (1:1000, IF), Streptavidin-Meerrettichperoxidase (1:1000, WB).

5.4.4 Versuchsbedingungen der Immunpräzipitation

150 µg Kernmembranprotein wurden initial in 0.5%(w/v) SDS, 2%(w/v) Triton X-100, 0.3 M NaCl, and 20 mM Tris/HCl pH 7.4 in Gegenwart von 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin, and 10 µg/ml Leupeptin für 15 min. solubilisiert. Die Proben wurden dann auf die finalen Immunopräzipitationsbedingungen von 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% (w/v) Triton X-100, 0.1%(w/v) SDS, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin and 10 µg/ml Aprotinin (IP-Puffer) verdünnt und für weitere 30 min bei 4°C solubilisiert. Die Proben wurden dann für 10 min. bei 13000 rpm in einer Biofuge (Heraeus) zentrifugiert. Antikörper-Agarose- oder -Protein G-Sepharose-Konjugate wurden zum Überstand hinzugefügt und über Nacht unter Schütteln (≥1400 rpm) inkubiert. Die Antigen-Antikörper Komplexe (IP-Pellet) sedimentierten danach durch Schwerkraft und wurden dreimal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen. Die Proteine wurden dann mit 2× Laemmli Probenpuffer von den Beads eluiert. Der Erfolg der Immunpräzipitation wurde nach SDS-PAGE im Western Blot nachgewiesen, im Falle der Immunpräzipitation von LAP 2β außerdem durch massenspektrometrische Analyse von Peptiden aus dem in-Gel-Verdau parallel aufgearbeiteter Proben.

5.4.5 Western Blot

5.4.5.1 Antikörper-Inkubationen

Die Blotmembran nach dem Transfer der Proteine aus dem jeweiligen Gel wurde für 2 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4 °C mit 5% (w/v) Magermilch in TBS-T blockiert. Danach wurde die Membran für 3 x 10 min. mit TBS-T gewaschen und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Erneut wurde für 3 x 10 min. mit TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper je nach Detektionssystem inkubiert. Die Blotmembran wurde nochmals 3 x 10 min. mit TBS-T gewaschen, bevor eine Entwicklungsreaktion durchgeführt wurde.

<u>TBS-T:</u>	20 mM	Tris-HCl pH 7,4
	137 mM	NaCl
	0,1% (w/v)	Tween-20

5.4.5.2 Entwicklungsreaktionen

5.4.5.2.1 Detektionssystem alkalische Phosphatase

In diesem Detektionssystem wurde ein alkalische-Phosphatase-gekoppelter IgG als sekundärer Antikörper eingesetzt (s. Abschn. 5.4.3). Nach dem letzten Waschgang wurde die Blotmembran für 10 min. in Entwicklungspuffer inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation in Färbelösung für eine Dauer nach Bedarf. In der Reaktion, die bis zum Auftreten von Banden durchgeführt wurde, bildete sich auf der Höhe der Banden, die vom primären Antikörper erkannt worden waren, ein bläulicher Farbstoff. Die Reaktion wurde mit 10 mM EDTA gestoppt.

<u>Sekundärer Antikörper:</u>	IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Verdünnung 1:1000 oder 1:2000 in TBS-T mit 5% (w/v) Magermilch
-------------------------------	---

Spatelspitze NaN₃

Entwicklungspuffer: 0,1 M NaHCO₃ pH 9,8

1 mM MgCl₂

Färbelösung: 5% (v/v) Nitroblue-Tetrazoliumchlorid-Lösung (NBT)

5% (v/v) 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-*p*-Toluidinsalz
(BCIP)

in Entwicklungspuffer

NBT: 3% (w/v) in 70% Dimethylformamid (DMF)

BCIP: 1,5% (w/v) in DMF

5.4.5.2.2 ECL-Blot

Der sekundäre Antikörper war hier mit Meerrettichperoxidase gekoppelt. Mit einem geeigneten Substrat wurde eine Chemolumineszenz hervorgerufen, deren Position auf der Blotmembran durch Schwärzung eines speziellen Films während der Exposition in einer Autoradiographiekassette detektiert wurde.

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde 3 x 10 min. mit TBS-T gewaschen. Danach wurde für 1 min. in 125 µl/cm² der Blotmembran des Detektionsreagenz (SuperSignal, Pierce) inkubiert und die Blotmembran sofort nach dem Abtropfen gegen einen Hyperfilm-ECL exponiert. Die Entwicklung erfolgte nach Standardmethode wie in der Autoradiographie.

sekundärer Antikörper: Meerrettichperoxidase-gekoppelter IgG (s. Abschn. 5.4.3),

1:2000

in TBS/5% Magermilch

5.4.6 indirekte Immunfluoreszenz

Für indirekte Immunfluoreszenz wurden Neuro 2A-Zellen oder 615-Zellen in Medium wie beschrieben auf Poly-L-Lysin-beschichteten 15-Loch-Objektträgern für 24 h kultiviert. Je nach Experiment wurden die Zellen dann stimuliert. Die Fixierung erfolgte durch 3% (w/v) Paraformaldehyd (PFA) für 30 min. bei Raumtemperatur. Isolierte Zellkerne wurden in einer geeigneten Konzentration auf 15-Loch-Objektträger pipettiert. Dort sedimentierten sie für 30 min. durch Schwerkraft, bevor sie nach Abnahme des Überstands durch PFA fixiert wurden (für 30 min. Inkubation).

Anschließend wurden die Objektträger für 2×15 min. in 0.1 M Glycin in PBS zum Abreagieren eventueller Überreste von PFA inkubiert, bevor die Zellen bzw. Zellkerne in 80% (v/v) Methanol in PBS für 20 min. Bei -20 ° C permeabilisiert wurden. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen für Antikörper durch 5% (v/v) Normal-Ziegen Serum (NGS) in PBS für 30 min. bei Raumtemperatur blockiert. Es folgte die Inkubation der Zellen mit primärem Antikörper (jeweilige Verdünnung in 3% (v/v) NGS-PBS) für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde 4× mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in NGS-PBS) für 30 min. inkubiert wurden (für die verwendeten Antikörper s. Abschn. 5.4.3). Nochmals wurde dann 4× mit PBS gewaschen, 5 min mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) inkubiert (dieser Schritt erfolgte nur bei der Vorbereitung ganzer Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz, nicht bei der Vorbereitung isolierter Kerne), 1× mit PBS und 1× mit H₂O bidest. gewaschen. Dann wurden die trocken gesaugten Objektträger in Gegenwart von Fluoromount G versiegelt. Die Zellen oder Zellkerne wurden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Die Bedienung des Mikroskops erfolgte durch Dr. Torsten Schöneberg, Institut für Pharmakologie, FU Berlin.

5.5 Trennmethode für Proteine und Peptide

5.5.1 Trennmethode für Proteine

5.5.1.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Mit dieser Methode können Proteine unter denaturierenden Bedingungen der relativen Molekülmasse nach aufgetrennt werden. Die Gelmatrix besteht aus Polyacrylamid nach einer Radikalketten-Polymerisation von Acrylamid/Bisacrylamid, wobei die Porenweite des Gels über das Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid und deren Konzentration relativ zu den anderen Komponenten der Gellösung gesteuert werden kann. Die radikalische Reaktion wird durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) unter Stabilisierung der Radikale durch N',N',N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin (TEMED) gestartet.

Die Denaturierung der Proteine erfolgt über die Reduktion von Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol sowie durch Anlagerung von Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Proteine, wobei angenommen wird, daß ca. 1,4 g SDS/g Protein binden. Die Proteine erhalten dabei unter idealisierender Annahme vollständiger Entfaltung negative Ladungen näherungsweise proportional zu ihrer Molekülmasse.

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird über das Trenngel ein Sammelgel mit niedrigerem pH als im Trenngel geschichtet. Im Sammelgel besitzen die Chloridionen aus dem Laufpuffer eine erheblich höhere Mobilität als das ebenfalls enthaltene Glycin, wodurch es hinter der Cl⁻-Front zu einer Verarmung an Ladungsträgern und dadurch zu einer Verstärkung des elektrischen Feldes kommt. Die Proteine werden quasi zwischen Chloridionen und Glycin "eingeklemmt" und laufen daher als scharfe Front in das Trenngel ein.

SDS-PAGE im Flachgel

Zur Auftrennung von Kernmembranproteinen wurden die Proben nach Zugabe des Probenpuffers 30 min. bei 50 °C inkubiert. Die Flachgele wurden im Hoefer-Gelsystem (14 × 16 × 0,075 cm, 15 ml Trenngellösung und ca. 5 ml Sammelgellösung pro Gel) oder im Biorad-Gelsystem (6,5 × 8,0 × 0,15, 6,6 ml Trenn- und 2 ml Sammelgellösung pro Gel) hergestellt. Es wurden Gele mit 7,5% Acrylamid/Bisacrylamid, 10% AA/Bis sowie 15% AA/Bis im Trenngel sowie 3% oder

4,5% AA/Bis im Sammelgel verwendet. Die Gele im Hoefer-System liefen bei 100 V im Sammelgel und 250 V im Trenngel oder alternativ bei 4 mA pro Gel (konstanter Strom) über Nacht. Die Gele im Biorad-System liefen bei 40 V im Sammel- und 110 V im Trenngel.

Trenngel (10%): 10% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,1% (w/v) SDS
1 mg/ml APS
1 µl/ml TEMED

Sammelgel (3%): 3% (w/v) AA/Bis (37,5:1)
125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,1% (w/v) SDS
1 mg/ml APS
1 µl/ml TEMED

Laufpuffer: 25 mM Tris
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
pH 8,3 (nicht nachträglich zu titrieren)

Probenpuffer: 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8
10% (w/v) Glycerin
5% (w/v) β-Mercaptoethanol
3% (w/v) SDS
0,0025% (w/v) Bromphenolblau

5.5.1.2 BAC-Gel-Elektrophorese

Die BAC (Benzyltrimethyl-Hexadecyl-Ammoniumchlorid)-Gelelektrophorese in Kombination mit herkömmlicher SDS-PAGE (Hartinger et al., 1996) ist die erste Dimension eines zweidimensionalen Gelsystems. Proteine werden hier nach Anlagerung des kationischen Detergenz 16-BAC unter Verwendung eines sauren Puffersystems in umgekehrter Polarität wie in der SDS-PAGE aufgetrennt. Das Ergebnis einer Trennung in beiden Dimensionen ist ein etwa Halbmond-förmiges Proteinmuster, in dem die Proteine nach Färbung näherungsweise punktförmig erscheinen. Die Trennleistung ist damit erheblich höher als in einer eindimensionalen Trennung. Da ionische Detergenzien in beiden Dimensionen verwendet werden, ist das System besonders für Proben mit Membranproteinen geeignet.

Verwendet wurde für die erste Dimension ein 6%-10% (w/v) Acrylamid-Gradientengel. Das Trenngel wurde auf pH 2,1 gepuffert, das Sammelgel (4% w/v) auf pH 4,1. Die Proben wurden in 2 × BAC-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min. bei 60°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 mA bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel, danach bei 25 mA konstanten Stroms.

Für die zweite Dimension wurden Polyacrylamidgele wie in der Elektrophorese nach Laemmli (1970) verwendet. Eingesetzt wurden Gradientengele mit 7,5% (w/v)-15% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) und einem 4%-Sammelgel. Das Gel aus der ersten Dimension wurde nach der Coomassie-Färbung/Entfärbung über Nacht in 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8 auf die Bedingungen für das Sammelgel der zweiten Dimension äquilibriert. Jeweils eine Gelspur aus der ersten Dimension wurde horizontal auf das Sammelgel der zweiten Dimension gelegt und mit 2×Laemmli-Probenpuffer (s.oben) überschichtet. Nach zehn Minuten Inkubation wurde die Elektrophorese (10 mA im Sammelgel, 25 mA im Trenngel) gestartet.

Zusammensetzung des Gels und der Puffer für die erste Dimension:

Trenngel: 6% bzw 10% (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid 80:1 (AMBA)
Bisacrylamid 1:126 im Verhältnis zu AMBA
75 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 2,1
3 M Harnstoff
0.1%(w/v) 16-Benzyl-dimethyl-Hexadecyl-Ammoniumchlorid
(16-BAC)
0.4 mM Ascorbinsäure
8 μM FeSO_4
0.00012% H_2O_2

Sammelgel: 4% AMBA
Bisacrylamid 1:17 im Verhältnis zu AMBA
125 mM $\text{Na}_x\text{H}_x\text{PO}_4$, pH 4,1
1.67 M Harnstoff
0.07% 16-BAC
0.416 mM Ascorbinsäure
5.5 μM FeSO_4
0.00021% H_2O_2

Probenpuffer (2x): 250 mM 16-BAC
8.3 M Harnstoff
10% (w/v) Glycerin
75 mM
0.01% (w/v) Pyronin Y

Laufpuffer: 2.5 mM 16-BAC
150 mM Glycin
50 mM Ortho-Phosphorsäure

5.5.1.3 Blaue Native Elektrophorese (Schägger und Jagow, 1991)

Die Blaue Native Elektrophorese ist ein Trennsystem für native Proteinkomplexe, bei der auf denaturierende ionische Detergentien wie SDS im Gel oder im Laufpuffer verzichtet wird. Die Triebkraft für die gerichtete Migration der Proteinkomplexe zur Anode wird durch den Zusatz des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 zum Proben- und Laufpuffer bereitgestellt. Der negativ geladene Farbstoff lagert sich an basische Aminosäurereste an, jedoch ohne Protein-Protein-Interaktionen zu brechen.

Für die Auftrennung von Kernhüllenproteinen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 5%-16% (Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1) Gradientengele verwendet.

Gel: 5 M 6-Aminocapronsäure
 50 mM BisTris
 adäquate Menge an Acrylamid/Bisacrylamid
 für 16%-Gel: 16,7% (w/v) Glycerin

Die Polymerisation des Gels wurde mit APS, final 0,03% (w/v) und TEMED final 0,07% (w/v) gestartet.

Anodenpuffer: 50 mM BisTris,
 eingestellt auf pH 7,0 mit HCl

Kathodenpuffer: 50 mM Tricin
 15 mM BisTris
 0,005% (w/v) Coomassie blue G-250
 eingestellt auf pH 7,0

Die Proben wurden unter folgenden Bedingungen in Puffer aufgenommen und aufgetragen:

50 mM BisTris

10 mM DTT

1% (w/v) Dodecylmannosid

0,25% (w/v) Coomassie blue G-250

250 mM 6-Aminocapronsäure

10% (w/v) Glycerin

Um Protein-Interaktionen unter stringenteren Bedingungen zu untersuchen, wurde den Proben 0,1% (w/v)-1,0% (w/v) SDS hinzugefügt. Die Elektrophorese von Proben auf Minigelen wurde bei 100 V durchgeführt.

5.5.2 Trennmethode für Peptide

5.5.2.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Peptidgemische von in-Gel-verdauten Proteinen wurden auf einer SMART-Mikro-HPLC-Anlage (Pharmacia) getrennt. Als Trennsäule wurde eine C2/C18-Säule (μ RPC) mit 2 mm Innendurchmesser verwendet. Das Chromatographieprinzip ist dabei eine Trennung der Peptide nach ihrer Hydrophobizität. Die Peptide werden zunächst an das hydrophobe Trägermaterial adsorbiert und dann mit steigender Konzentration an organischem Lösemittel eluiert (Umkehrphasen-HPLC).

Die Detektion der Peptide erfolgte parallel bei 215 nm, 270 nm und 280 nm aufgezeichnet in Intervallen von 0,64 sec.. Die Fraktionen wurden manuell in 0,5 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt und sofort lyophilisiert. Das Puffersystem bestand aus den Lösungen A (2% (v/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure) und B (70% (v/v) Acetonitril, 0,085% (v/v) Trifluoressigsäure). Die Flußrate betrug 50 μ l/min. Die Injektion erfolgte 30 min. nach Start des Gradienten-Programms, unmittelbar zuvor wurde die UV-Absorption durch die AutoZero-Funktion auf null gesetzt.

<u>Gradient:</u>	<u>Zeit in min.</u>	<u>% Lösung B</u>
	0	100
	10	100
	15	0
	Probeninjektion bei 30 min.	
	45	0
	73	16
	140	60
	155	100
	170	100

Die Acetonitrilkonzentration stieg zunächst bis zu einer Konzentration von 11,2% kontinuierlich um 0,4%/min. an, danach bis zu einer Konzentration von 45% kontinuierlich um 0,35%/min., danach bis zu einer Konzentration von 70% kontinuierlich um 1,7%/min. Die meisten Peptide aus dem tryptischen Verdau von Proteinen eluierten bei einer Acetonitril-Konzentration von 15%-45% von der Trennsäule.

5.5.2.2 Dünnschichtelektrophorese

Bei der hier angewendeten Variante der Dünnschichtelektrophorese wurden Peptide eindimensional auf Celluloseplatten (Format 10 x 10 cm, ohne fluoreszierenden Farbstoff, Trägermaterial Glas) in einer horizontalen Hochspannungselektrophorese auf einer Apparatur der Fa. Pharmacia aufgetrennt. Die Substanzen werden dabei aufgrund ihrer eigenen Ladung unter den gewählten Pufferbedingungen sowie aufgrund ihrer Größe getrennt.

Als Pufferreservoirs wurden in Laufpuffer getränkte Filterpapierstreifen (zugeschnitten auf 10 x 1 cm) verwendet, die auf die Ränder der Celluloseplatte gelegt wurden. Dort wurden die Elektroden aufgesetzt.

Die lyophilisierten Proben wurden in Volumina von je 2 µl Laufpuffer aufgenommen, 3 min. sonifiziert und in der Tischzentrifuge kurz zentrifugiert. Dann wurden die Proben nach und nach

vorsichtig mit einer geeigneten Pipette auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Neben der Probe wurde ein Farbmarker (DNP-Lysin und Xylencyanol) aufgetragen.

Anschließend wurde die Dünnschichtplatte mit einer mit Laufpuffer für die Dünnschichtelektrophorese getränkten Filterpapiermaske, in die konzentrische Aussparungen für die Auftragspunkte von Proben und Marker gestanzt waren, befeuchtet. Der Bereich der Auftragspunkte wurde durch manuellen Druck auf das Filterpapier befeuchtet, wodurch Proben und Marker zusätzlich konzentriert wurden.

Die Elektrophorese wurde mit 350V/10mA durchgeführt.

Als Kühlvermittler zwischen der von Wasser durchströmten Kühlplatte und der Celluloseplatte wurde Bayol F verwendet.

Marker: 5 mg/ml-Dinitrophenyl-Lysin (DNP-Lysin)
 1 mg/ml Xylencyanol FF
 in H₂O/pH 1,9-Laufpuffer 1:1

2 D-Phosphopeptidkartierung nach Boyle et al., 1991)

Die Probenvorbereitung erfolgte mit einem tryptischen Verdau von je 10 µg (geschätzt nach Blotfärbung) radioaktiven LAP 2β nach Trennung der Kernhüllenproteine in der BAC-Gelelektrophorese, Elektroblothing auf eine PVDF-Membran, Autoradiographie, India Ink-Färbung und Ausschneiden der zu LAP 2β korrespondierenden Spots aus der Membran.

Die lyophilisierten Peptide wurden in 5 µl Laufpuffer, pH 1,9, aufgenommen und auf eine Celluloseplatte pipettiert und in einer Dünnschichtelektrophorese bei 350 V/ 10 mA für 20 min. in der ersten Dimension aufgetrennt. Danach wurde die Celluloseplatte mit einem Fön unter Kaltluft getrocknet.

Nach dem Auftragen des Farbmarkers für die zweite Dimension (DNP-Lysin/Xylencyanol) wurde in der zweiten Dimension für 3 h (bis die Lauffront 0,5 cm unter dem oberen Plattenrand angelangt war) durchgeführt.

Die Celluloseplatte wurde erneut sofort getrocknet und einer Autoradiographie zugeführt. Anhand der Schwärzung des aufgelegten Röntgenfilm konnte die genaue Position der ³²P-markierten Peptide auf der Dünnschichtplatte festgestellt werden. Mit einem Spatel konnten diese Regionen von der Platte gekratzt werden.

Die Peptide ließen sich durch den Laufpuffer der ersten Dimension unter Ultraschallbehandlung (5 min.) und kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge von der Cellulose eluieren. Die Ausbeute wurde nach Lyophilisierung der Überstände durch die Zählrate der Cerenkov-Strahlung verfolgt.

<u>Laufpuffer 1. Dimension (pH 1,9, für 2 l):</u>	50 ml	Ameisensäure (96-98%)
	156 ml	Eisessig
	1794 ml	deionisiertes Wasser

<u>Laufpuffer 2. Dimension (pH 5,5, für 1 l):</u>	375 ml	n-Butanol
	250 ml	Pyridin
	75 ml	Eisessig
	300 ml	deionisiertes Wasser

5.6 Elektrobloiting

Diese Methode diente dem Transfer von in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine PVDF-Membran, um weitere Untersuchungen im Immunoblot oder die Durchführung der Phosphoaminosäureanalyse bzw. die 2D-Phosphopeptidkartierung vorzubereiten.

Angewendet wurde die Semi-dry-Methode in einer Carbonglas-Blotkammer.

Bei der Semi-dry-Methode wurden drei Lagen mit Transferpuffer getränkten Filterpapiers auf die anodische Carbonglasplatte gelegt und Luftblasen zwischen Platte und Filterpapier entfernt. Auf das Filterpapier wurde die zuvor in Methanol eingelegte Transfermembran aufgelegt und darauf das ungefärbte Gel. Darauf wurden weitere drei Lagen in Transferpuffer getränkten Filterpapiers gelegt und die Apparatur mit einem Deckel, in den die kathodische Carbonglasplatte integriert war, verschlossen. Der Deckel wurde mit 2 kg beschwert.

Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm^2 der Transfermembran für 2 h. Filterpapier, Gel und Membran hatten jeweils die gleichen Abmessungen.

<u>Transferpuffer:</u>	48 mM	Tris
	39 mM	Glycin

0,1% (w/v)	SDS
20% (v/v)	Methanol

5.7 Färbetechniken

5.7.1 Coomassie-Färbung von gelelektrophoretisch getrennten Proteinen

Das zu färbende Gel wurde direkt nach Ende der Elektrophorese für 1 h in Färbelösung überführt und mild geschüttelt. Danach erfolgte der Transfer des Gels in Entfärbelösung.

<u>Färbelösung:</u>	0,1% (w/v)	Servablau R-250
	30% (v/v)	Isopropanol
	10% (v/v)	Essigsäure

Die Zusammensetzung der Entfärbelösung war identisch, jedoch ohne Servablau R-250.

5.7.2 Silberfärbung gelelektrophoretisch getrennter Proteine nach Shevchenko et al. (1996)

Bei dieser Variante der Silberfärbung von Proteinen im Gel wird auf einen Fixierungsschritt mit Glutardialdehyd (wie er bei anderen Protokollen üblich ist) verzichtet. Dadurch können interessierende Proteine später tryptisch im Gel gespalten werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele 50% Methanol, 5% Essigsäure (v/v) für 20 min. inkubiert, danach für 10 min. in 50% (v/v) Methanol und für weitere 10 min. in H₂O (HPLC-Grad). Für die Sensibilisierung erfolgte dann eine Inkubation für 1 min. in 0.02% Na₂S₂O₃. Das Gel wird 2×1 min. mit H₂O (HPLC-Grad) gespült. Dann erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 4 °C im Dunkeln in 0,1% (w/v) AgNO₃. Nachfolgend wurde 2×1 min. mit H₂O (HPLC-Grad) gespült und die Färbung in 0,04% Formalin, 2% Na₂CO₃ (w/v) entwickelt. Die Entwicklung wurde gestoppt mit 5% AcOH, das Gel konnte bei 4°C in H₂O (HPLC-Grad) gelagert werden.

5.7.3 Ponceau-Färbung von Proteinen auf der Blotmembran

Die Blotmembran wurde gegebenenfalls nach dem Transfer der Proteine erneut in Methanol befeuchtet. Dann wurde sie in Ponceau-S-Lösung überführt und 5 min. gefärbt. Anschließend wurde die Membran mit H₂O bidest. abgespült. Die Proteine erschienen als rötlich gefärbte Banden oder Punkte.

<u>Färbelösung:</u>	2% (w/v)	Ponceau S
	30% (w/v)	Trichloressigsäure (TCA)
	30% (w/v)	Salicylsäure

5.7.4 India ink-Färbung von Proteinen auf der Blotmembran

Diese Kolloidalfärbung wurde nach Kamps und Sefton (1989) mit Proteinen auf Blotmembranen durchgeführt, die nach der Färbung auf der Membran proteolytisch gespalten und in der 2 D-Phosphopeptidkartierung untersucht werden sollten. Die Membranen wurden nach der Autoradiographie gefärbt und zunächst 1 min. in Methanol befeuchte. Es folgte eine zehnmünütige Inkubation in Vorbehandlungslösung. Dann wurde die Membran 1,5 h in der Färbelösung geschüttelt. Zum Schluß wurde 2 min. in Entfärbelösung inkubiert und die Membran in einem Luftstrom getrocknet.

<u>Vorbehandlungslösung:</u>	50 mM	Tris/HCl pH 7,4
	150 mM	NaCl

<u>Färbelösung:</u>	50 mM	Tris/HCl pH 6,5
	150 mM	NaCl
	0,2% (w/v)	Tween-20
	1 µl/ml	India Ink

Die Entfärbelösung entsprach der Färbelösung ohne India Ink.

5.8 Proteolytische Spaltung von Proteinen

5.8.1 Tryptischer Verdau von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Nach dem Färben/Entfärben eines Gels wurden die Gelstücke mit den interessierenden Proteinen mit einem Skalpell ausgeschnitten, in Würfel von etwa 1 mm³ zerteilt und in 0.5ml Eppendorfgläser überführt. Es folgte eine Inkubation für 15 min in H₂O (HPLC-Reinheitsgrad). Das Wasser wurde anschließend abgenommen und durch Verdauopuffer ersetzt (ca. 50 µl für eine Bande aus einem Minigel).

Entfernung von Coomassie Blue und SDS: Nach 15 min Schütteln wurde Acetonitril im Verhältnis 1:1 zu Wasser hinzugegeben und wieder für 15 min unter Schütteln inkubiert. Bei diesem Schritt schrumpfen die Gelstücke und Farbe tritt aus. Der Überstand wurde abgenommen und durch 100% Acetonitril ersetzt. Die Inkubation erfolgte, bis die Gelstücke milchig trüb geworden waren. Danach wurde der Überstand wieder abgenommen, Verdauopuffer wie oben wurde hinzugefügt und die Prozedur nochmals wiederholt, bis die Gelstücke entfärbt (und neutralisiert) waren.

Reduktion/Carbamidomethylierung: Die Gelstücke wurden nach dem letzten Acetonitrilsschritt lyophilisiert. Anschließend wurde Reduktionlösung hinzugefügt und für 30 min bei 56⁰C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Gelstücke durch Zugabe von Acetonitril wieder geschrumpft. Nach Entfernung des Acetonitrils wurden die Gelstücke für 20 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Iodacetamidlösung inkubiert. Die Lösung wurde anschließend abgenommen und durch Verdauopuffer ersetzt. Acetonitril im Verhältnis 1:1 zum Verdauopuffer wurde nach weiteren 15 min hinzugefügt. Schließlich wurden die Gelstücke in reinem Acetonitril geschrumpft und danach lyophilisiert. Die Überstände wurden jeweils verworfen.

Tryptische Spaltung: Die Gelstücke wurden dann in Trypsinlösung rehydratisiert, zunächst für 30 min auf Eis. Überschüssige Flüssigkeit wurde danach verworfen und durch soviel Verdauopuffer ersetzt, daß die Gelstücke gerade mit Puffer bedeckt waren. Der Verdau wurde für 24 h unter mildem Schütteln bei 37⁰C durchgeführt. Nach 12 h wurden 1 µl-Aliquots aus den Verdauüberständen entnommen und mit MALDI-MS unter Verwendung einer *fast evaporation/nitrocellulose (FENC)* Matrixpräparation vermessen.

Elution der Peptide: Zu den Verdauansätzen wurde das fünffache Volumen an Verdauopuffer hinzugefügt. Nach 15 min Schütteln wurde ein gleiches Volumen an Acetonitril hinzugefügt. Die

Überstände wurde nach weiteren 15 min abgenommen. Die Gele wurden nochmals mit Acetonitril geschrumpft, die Überstände mit den jeweiligen des ersten Elutionsschrittes vereinigt. Die Gelstücke wurden in 5%iger Ameisensäure erneut für 15 min rehydratisiert, bevor nochmals ein gleiches Volumen Acetonitril zugesetzt wurde. Diese Überstände wurden wiederum nach 15 min abgenommen und mit den Überständen der jeweiligen Proben aus den vorangegangenen Elutionsschritten vereinigt und anschließend lyophilisiert.

Reduktionslösung: 10 mM DTT in
100 mM NH_4HCO_3

Carbamidomethylierung: 55 mM Iodacetamid in
100 mM NH_4HCO_3

Verdaupuffer: 50 mM NH_4HCO_3

Trypsinlösung: 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Trypsin (bovin, Sequenzierungs-Reinheitsgrad) in
50 mM NH_4HCO_3

Alle Lösungen wurden in H_2O (HPLC-Reinheitsgrad) angesetzt.

5.8.2 Verdau von Proteinen auf der Blotmembran

Die Methode wurde mit Proteinen nach *in vitro* Phosphorylierung, Trennung über BAC-Gelelektrophorese und Elektroblothing auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran durchgeführt. Nach India Ink-Färbung und Autoradiographie wurden die interessierenden Proteine mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Vorbereitung des Verdaus wurden die Membranstücke 30 sec. in Methanol befeuchtet und dreimal 1 min. in je 1 ml H_2O bidest. gewaschen. Die Effizienz aller Verdauschritte wurde über die Messung der Cerenkov-Strahlung, die vom eingebauten ^{32}P hervorgerufen wurde, quantifiziert.

Blockierung: Zum Blockieren wurde die Membran bei 37 °C für 30 min. in 0,5% Polyvinylpyrrolidon mit durchschnittlicher M_r von 40 kD (PVP-40) in 100 mM Essigsäure in einem 0,5

ml-Reaktionsgefäß inkubiert. Die Membranstücke wurden dreimal in je 1 ml H₂O bidest. sowie einmal in 1 ml 50 mM NH₄HCO₃ gespült, um überschüssiges PVP-40 zu entfernen.

Tryptische Spaltung: Die Membranstücke wurden in soviel 50 mM NH₄HCO₃ mit Trypsin (bovin, Sequenzierungs-Reinheitsgrad, im geschätzten Massenverhältnis von 1:4 zur Menge an Substratprotein) inkubiert, daß sie gerade mit der Lösung bedeckt waren. Der Verdau wurde für 2 h bei 37 °C unter mildem Schütteln ausgeführt. Danach wurde 1 µl des Verdauüberstandes für die Analyse in der MALDI-MS abgenommen. Anschließend wurde nochmals die gleiche Menge wie oben (final 1:2) an Trypsin hinzugefügt und weitere 2 h unter gleichbleibenden Bedingungen gespalten. Unter diesen Bedingungen gehen die generierten Peptide in Lösung. Anschließend wurde je 150 µl H₂O bidest. zu den Proben gegeben, 5 min. ultraschallbehandelt, kurz in der Tischzentrifuge zentrifugiert und die Überstände, die ca. 80% der ³²P-Aktivität enthielten, in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Membranstücke wurden noch zweimal mit je 50 µl H₂O bidest. und einmal mit 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in H₂O bidest. gewaschen und sonifiziert. Die Überstände wurden mit den ersten Überständen vereinigt. Die Ausbeute an Peptiden lag letztlich bei ca. 90%. Die Proben wurden so oft lyophilisiert, bis die Pellets annähernd salzfrei waren. (Es wurden außer den Proteinen nur flüchtige Agenzien eingesetzt.)

5.9 Messung von β-Strahlung

Die Detektion von Proben, die mit ³²P markiert waren, erfolgte indirekt über die Zählung der Cerenkov-Strahlung, die durch die β-Strahlung im umgebenden Medium angeregt wurde, oder in der Autoradiographie.

Cerenkov-Strahlung: Die Cerenkov-Strahlung beruht auf der Wechselwirkung der bei der β-Strahlung emittierten Teilchen mit den Elektronen der Substanzen des umgebenden Mediums. Detektiert wurde über einen Photoelektronen-Vervielfacher. Flüssige oder lyophilisierte Proben oder getrocknete Blotmembranstücke wurden in 10 ml-Szintillationsgefäßen vermessen.

Autoradiographie: Zur Erkennung von Banden radioaktiv markierter Proteine auf Blotmembranen und in getrockneten Gelen wurden diese in einer Kodak X-Omatic Filmkassette mit DuPont-Cronex Lightning Plus-Verstärkerfolie gegenüber einem Kodak X-OmatAr-

Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeiten richteten sich nach den Radioaktivitätsmengen in den Proben.

5.10 Massenspektrometrische Methoden

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptionsionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS, Karas und Hillenkamp, 1988) und die Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS, Yamashita und Fenn, 1984; Alexandrov et al., 1984) sind derzeit die wichtigsten massenspektrometrischen Methoden in der Proteinanalytik. Beide Ionisierungsmethoden erlauben das Überführen intakter Makromoleküle in die Gasphase ("weiche Ionisierung").

Beide Methoden lassen die Identifizierung von Proteinen im Subpicomolbereich zu, routinemäßig allerdings nur in Kombination mit durch geeignete Computerprogramme wie PeptideSearch, MS-Fit, MS-Tag, Mascot oder ProFound (s. nächster Abschnitt) gestützte Datenbanksuche. Damit wächst das Potential massenspektrometrischer Proteinanalytik parallel zum Fortschreiten von Genom-Sequenzierungsprojekten.

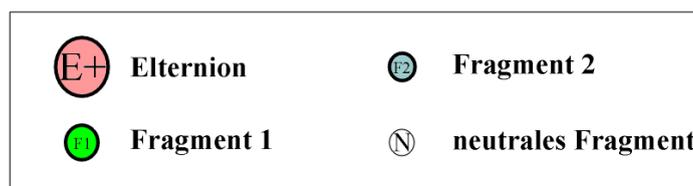
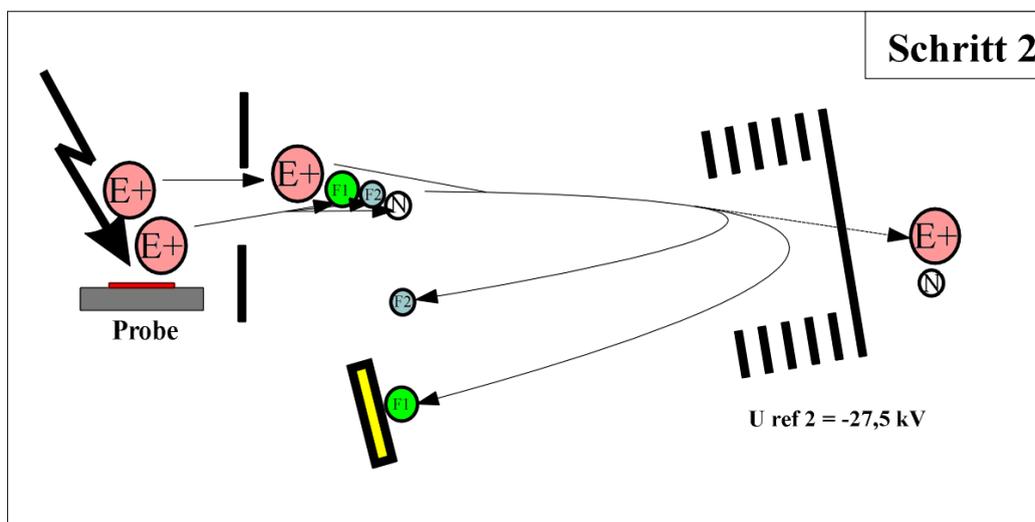
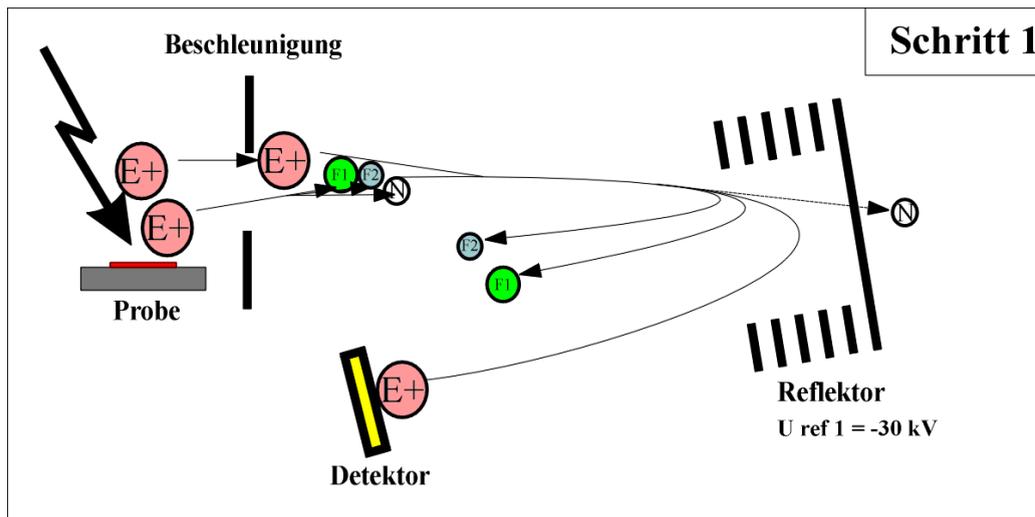
5.10.1 Prinzipien der MALDI-MS

Im Falle der MALDI-MS erfolgt die Ionisierung der Analytmoleküle aus der festen Phase durch Laserbeschuß der mit einer absorbierenden Matrixsubstanz kokristallisierten Probe (Laserdesorption).

Die Massenanalyse erfolgt bei der MALDI-MS in der Regel durch Flugzeitmessung ("time of flight, TOF") nach der Beschleunigung der Analytionen bis zum Auftreffen auf den Detektor. Dabei hat die Technik, die Analytionen erst verzögert nach der Desorption zu beschleunigen ("delayed extraction", Brown und Lennon, 1995; Whittal und Li, 1995) die Beschleunigung unmittelbar nach der Desorption ("continuous extraction") abgelöst, da bei der verzögerten Extraktion eine Massengenauigkeit um 10-50 ppm bei einem Auflösungsvermögen von $m/\Delta m \approx 10000$ gegenüber einer Massengenauigkeit von 500-1000 ppm bei einem Auflösungsvermögen von $m/\Delta m \approx 500-1000$ bei der kontinuierlichen Extraktion erzielt werden kann.

Peptidsequenzierung mit MALDI-MS

Für die Sequenzierung von Peptiden mittels MALDI-Massenspektrometrie wird der metastabile Zerfall eines Teils der Analytionen nach der Beschleunigung ausgenutzt (Spengler et al., 1992; Kaufmann et al., 1993). Dabei erfolgen insbesondere Bindungsbrüche entlang des Peptidrückgrats. Im linearen Detektionsmodus wird dieser Zerfall nicht detektiert. Im Reflektormodus jedoch erfolgt eine Abbremsung und erneute Beschleunigung der Analytionen sowie ihrer Fragmente. Wird die Reflektorspannung schrittweise abgesenkt (z.B. in mehreren Schritten von -30 kV auf -1,27 kV), so treffen auch die Fragmente am Reflektor-Detektor auf (Graphik 4) So kann eine Serie von Fragmentationenspektren aufgenommen werden, welche auf der Grundlage des Fragmentationenspektrums einer bekannten Substanz kalibriert und zu einem Gesamt-Fragmentationenspektrum zusammengesetzt werden können. Aus diesem Spektrum kann die Peptidsequenz abgeleitet werden.



Graphik 4: Schematische Darstellung der ersten beiden Teilschritte bei der Aufnahme eines Post source decay-Fragmentationenspektrums. Die Reflektorspannung wird mit jedem Teilschritt weiter abgesenkt, wodurch Fragmente unterschiedlicher Größe nach metastabilem Zerfall des Elternions am Reflektordetektor detektiert werden können.

5.10.2 Prinzipien der ESI-MS

Bei der ESI-MS wird die Probe dem Massenspektrometer kontinuierlich in Lösung mit einem geeigneten Lösemittel (z.B. 50% (v/v) Methanol) unter Zusatz von Säure (z.B. Ameisensäure) oder Base (z.B. Ammoniak) zugeführt, bei der herkömmlichen ESI-MS mit Hilfe einer Motorspritzenpumpe oder einer HPLC-Pumpe bei einer Flußrate von 0,2-1 $\mu\text{l}/\text{min}$. Über die

Sprühnadel wird die Probe in der Ionenquelle versprüht und durch die Potentialdifferenz zwischen Nadel und Eingang des Massenspektrometers beschleunigt. Nach dem Versprühen verdampft das Lösungsmittel und das Volumen der Flüssigkeitströpfchen schrumpft, bis die wachsende Ladungsdichte an ihrer Oberfläche zur "Explosion" in viele kleinere Tröpfchen führt. Dieser Vorgang wiederholt sich und letztlich treten "nackte" Analytionen in das Massenspektrometer ein. Die Massenanalyse erfolgt in der Regel über Quadrupol-Massenfilter oder, zur Verbesserung der Massengenauigkeit, durch einen Quadrupol-Massenfilter und ein orthogonal dazu angeordnetes Flugzeitmeßrohr ("Q-TOF", Morris et al. 1996).

Ein Quadrupol-Massenfilter besteht aus vier parallel (entsprechend den Kanten eines Quaders) zueinander angeordneten Metallstäben. Durch das Anlegen einer Gleichspannung und Überlagerung einer Wechselfrequenz an diese Metallstäbe (von denen sich die jeweils gegenüberliegenden Stäbe in Phase und die beiden anderen 180° zu diesen in Gegenphase befinden) wird ein Spannungsfeld erzeugt, das hindurchfliegende Analytionen auf eine elliptische Flugbahn zwingt. Diese Flugbahn ist bei gegebenen Spannungsparametern nur für Teilchen mit distinktem m/z -Wert so stabil, dass diese Teilchen den Massenfilter durchqueren können. Da innerhalb eines definierten Zeitintervalls (z.B. 4 sec) ein definierter Spannungsbereich überstrichen wird, sind zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Flugbahnen für Teilchen von unterschiedlichem m/z stabil. Auf diese Weise wird ein nach m/z aufgelöstes Massenspektrum aufgenommen.

Der prinzipielle Vorteil der Nanoelektrospray-Technik gegenüber herkömmlichen ESI-Massenspektrometern liegt in der erheblich größeren Empfindlichkeit der Messungen und in der längeren zur Verfügung stehenden Meßzeit pro Probe (Wilm und Mann, 1996). Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Sprühnadel in der Nanoelektrospray-Ionenquelle unmittelbar (1 mm) vor die Eintrittsöffnung zum Massenspektrometer justiert werden kann, wodurch die Probe nahezu quantitativ den Massenanalysator erreicht. Zudem kann die Probe unmittelbar in die Sprühnadel gefüllt werden, der sonst bei ESI-Massenspektrometern übliche Weg der Probe durch eine Kapillare getrieben von den HPLC-Pumpen oder einer Motorspritzenpumpe entfällt. Die Potentialdifferenz zwischen Nadelspitze und Eingang des Massenspektrometers über die beschriebene kurze Distanz reicht aus, um die Probe ohne Pumpvorrichtung ins Massenspektrometer zu sprühen. Dabei werden geschätzte Flußraten von ca. 20 nl/min. gegenüber 0,2-5 µl/min. bei herkömmlichen ESI-Massenspektrometern erreicht. Dies ermöglicht bei einem Probenvolumen von 1-2 µl eine Meßzeit von 30 min. oder mehr für eine Probe.

Beim Detektionsmodus, in dem die Massentrennung im ersten Quadrupol erfolgt und die anderen Quadrupole von den Analytionen unbeeinträchtigt durchquert werden konnten, wird von einem "Q1-Scan" gesprochen. Bei der Auftrennung von Fragmentionen in Q3 nach Selektion in Q1 und nach Kollision in Q2 (s.unten) wird von einem "Q3-Scan" gesprochen.

Parent ion scan (Vorläuferionen-Scan):

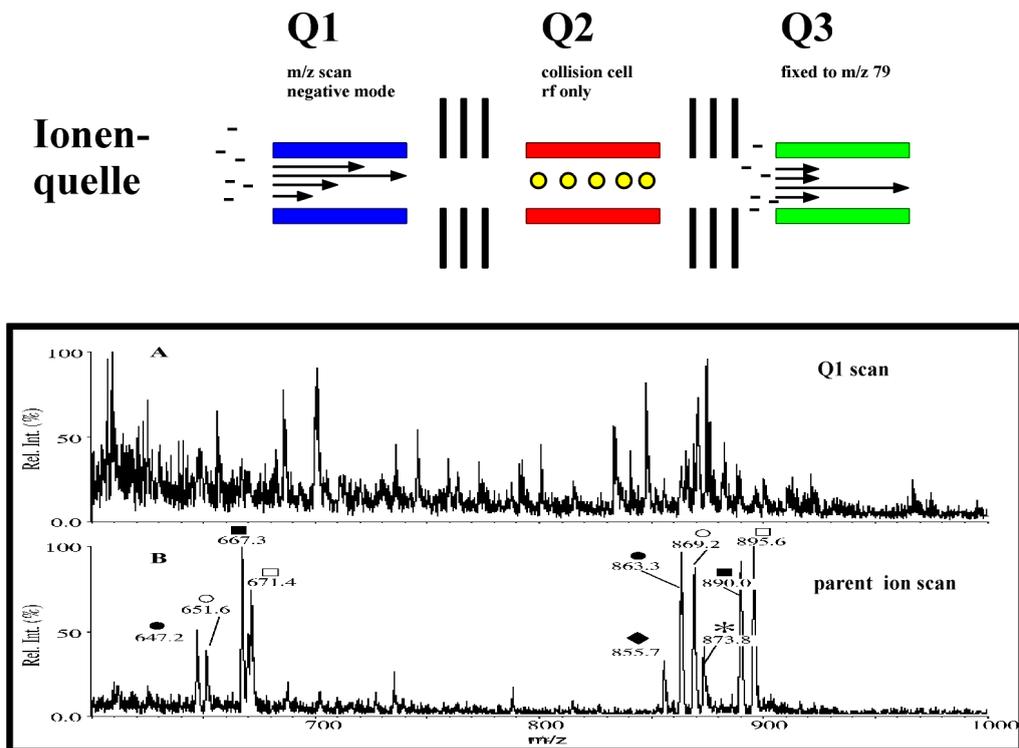
Bei Parent ion scan-Messungen (Carr et al., 1993; Carr et al., 1996; Wilm et al., 1996) erfolgt im ersten Quadrupol (Q1) eine Auftrennung der Peptide nach m/z. Im zweiten Quadrupol (Q2) erfolgt die Kollision der Peptide mit einem inerten Stoßgas (Argon), der dritte Quadrupol wird auf die Detektion eines Fragmentions von 79 Da (PO_3^- , "Reporterfragment" im Falle der Analytik von Phosphopeptiden, Wilm et al., 1996, Neubauer et al., 1999) fixiert (Graphik 5). Aufgrund der Korrelation mit der Massenauftrennung aus Q1 kann das Analytion (Parent Ion), das nach der Kollision in Q2 ein Fragmention der Masse 79 Da hervorbringt, identifiziert werden. Im Falle von Phosphopeptiden ist diese Meßtechnik im Negativ-Modus besonders empfindlich.

Product ion scan (Produkt- Ionen-Scan)

Zur Sequenzierung der Peptide wird mit dem ersten Quadrupol (Q1) ein Peptid aus dem Gemisch selektiert und im zweiten Quadrupol zur Kollision mit dem Stoßgas gebracht. Mit dem dritten Quadrupol werden die entstandenen Fragmente (Produkt-Ionen) nach m/z aufgetrennt und im Massenspektrum dargestellt.

Diese Art der Fragmentierung wird auch als kollisionsinduzierte Dissoziation (collision induced dissociation, CID) bezeichnet.

Bei der Fragmentierung von Peptiden sowohl durch PSD in der MALDI-MS als auch durch CID in der ESI-MS treten bevorzugt Bindungsbrüche im Peptidrückgrat auf. Im Fragmentionenspektrum zeigen sich Serien sowohl N- als auch C-terminaler Fragmentionen, die als A-, B- und C-Ionen (abgeleitet vom N-Terminus) und als X-, Y- und Z-Ionen (abgeleitet vom C-Terminus) bezeichnet werden (Biemann, 1990). Die prominentesten Serien sind die B-Ionenserie und die Y-Ionenserie in Fragmentionenspektren, die mittels MALDI-PSD aufgenommen werden, bzw. die Y-Serie in Fragmentionenspektren mit ESI-CID. Daten aus Fragmentionenspektren wurden mit Hilfe der Programme PeptideSearch, MS-Tag oder PepFrag analysiert.



Graphik 5: Parent ion scan auf einem Tripelquadrupol-Massenspektrometer: **oben**: schematische Darstellung der Funktion der drei Quadrupole: negativ geladene Analytionen werden in Q1 nach m/z aufgetrennt. In Q2 erfolgt die Kollision mit dem inerten Stoßgas. Q3 ist fix eingestellt auf die Detektion des Fragmentions m/z=79 Da korrespondierend zu PO_3^- . Im Spektrum erscheinen die Elternionen, die nach Fragmentierung das Fragmention 79 Da bilden. **unten**: Vergleich zwischen einem Q1-Scan im Negativionenmodus und dem Spektrum des Parent ion scans, das ausschließlich Phosphopeptide zeigt.

5.10.3 Kriterien für die massenspektrometrische Proteinidentifizierung

Die Datenbanksuche zur Identifizierung von Proteinen anhand massenspektrometrischer Daten erfolgt in der Regel nach proteolytischem Verdau des zu analysierenden Proteins anhand des Abgleichs gemessener Peptidmassen mit theoretisch vorhergesagten Peptidmassen von Proteinen in Protein-Datenbanken (z.B. SwissProt, EMBL-Datenbank, NCBI non-redundant database). Der Abgleich erfolgt unter Zuhilfenahme im Internet zugänglicher Analyseprogramme, die diejenigen Proteine als beste Treffer bewerten, die die größte Anzahl von Übereinstimmungen zwischen gemessenen und vorhergesagten Peptidmassen aufweisen. Ähnlich kann mit Fragmentionmassen aus Fragmentierungionenspektren zur Gewinnung von Sequenzinformation verfahren werden. Die Stringenz der Suche (z.B. die tolerierte Abweichung der gemessenen Massen von den theoretischen Massen) wird dabei vom Anwender bestimmt.

Aufgrund der begrenzten Massengenauigkeit des für vorliegende Arbeit genutzten MALDI-Massenspektrometers mit kontinuierlicher Extraktion (Auflösungsvermögen ca. 1000 im Reflektormodus, Massengenauigkeit $\pm 0,05-0,1\%$ bei interner Kalibrierung auf Produkte des tryptischen Eigenverdaus bei Messungen von Proben, die mit der Dünnschicht-/ Nitrocellulose-Matrix präpariert waren), erfolgte die Proteinidentifizierung möglichst unter Zuhilfenahme von mindestens einem Fragmentationsspektrum pro Proteinverdau. Ein Protein galt dann als identifiziert, wenn zusätzlich zu einem mit der Datenbanksequenz konsistenten Fragmentationsspektrum (analysiert mit Hilfe der Programme MS-Tag oder PepFrag) die dominierenden Peptidsignale im Gesamtspektrum durch vorhergesagte tryptische Peptide desselben Proteins erklärbar waren. Aufgrund von Fragmentationsspektren ermittelte Sequenzen wurden in mehreren verschiedenen Datenbanken auf ihre Einmaligkeit hin überprüft. In den Fällen, in denen die Probenmenge nicht zur Aufnahme von Fragmentationsspektren ausreichte, wurden die Erfüllung der Signifikanzkriterien der verschiedenen Datenbank-Suchprogramme (Mascot, ProFound, MS-Fit, PeptideSearch) der Identifizierung zugrunde gelegt.

Mascot: <http://www.matrixscience.com/cgi/index.pl?page=/home.html>

Das Programm wurde für die Analyse von Peptidgemisch-Spektren angewendet. Als Ergebnis wird eine Bewertung der Treffer vorgenommen, die zwischen signifikanten und nichtsignifikanten Treffern unterscheidet.

ProFound: <http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>

Das Programm dient der Analyse von Peptidgemisch-Spektren. Als Ergebnis wird eine Bewertung der Treffer vorgenommen. Signifikanzkriterien müssen selbst erstellt werden. Als signifikant wurden Treffer bewertet, deren

Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit mindestens um zwei Zehnerpotenzen größer als die für den nächstbesten Treffer war.

PeptideSearch:

<http://www.mann.embl-heidelberg.de/Services/PeptideSearch/PeptideSearchIntro.html>

Das Programm wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit überwiegend für die Analyse von Peptidgemisch-Spektren verwendet. Als Ergebnis stellt das Programm die Anzahl übereinstimmender gemessener und vorhergesagter Peptidmassen für die Proteine mit den

meisten Übereinstimmungen dar. In einem zweiten Analyseschritt kann überprüft werden, ob die nicht übereinstimmenden Peptidmassen durch artifizielle Peptidmodifikationen während der Probenvorbereitung oder durch das Auslassen einer größeren Anzahl von Spaltstellen während der Proteolyse erklärbar sind. Als signifikant erachtete Treffer sollten eine deutlich höhere Anzahl von Übereinstimmungen aufweisen als die nächstbesten Treffer.

MS-Fit: <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/msfit.htm>

Das Programm liefert ähnliche Ergebnisdaten wie PeptideSearch.

MS-Tag: <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/mstag.htm>

Das Programm ermöglicht die Suche mit Fragmentionenmassen aus

Fragmentierungsexperimenten zur Gewinnung von Sequenzinformation. Der Abgleich erfolgt zwischen gemessenen und theoretisch vorhergesagten

Fragmentionenmassen. Das Programm ist optimal für die Analyse von MALDI-Fragmentionenspektren geeignet. Eine Peptidsequenz galt als eindeutig identifiziert, wenn alle im Spektrum prominenten Fragmentionenmassen mit der aufgrund der Datenbanksuche vorgeschlagenen Sequenz konsistent waren.

PepFrag: <http://prowl1.rockefeller.edu/prowl/pepfragch.html>

Das Programm ermöglicht ähnliche Datenbankrecherchen wie MS-Tag.

Jedes dieser Programme wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet, da die Programme die Suche in unterschiedlichen Datenbanken (mit teilweise unterschiedlichen Einträgen) ermöglichen, unterschiedliche Optionen für die Einbeziehung möglicher Peptidmodifikationen in die Suche bieten und unterschiedliche Optionen zulassen, in taxonomischen Untergruppen der Datenbankeinträge zu suchen.

Eine zusätzliche Information für die Proteinidentifizierung lieferte das Auftreten oxidiertes Methioninreste in Peptiden, die in Reflektormodus-Spektren durch die Abspaltung vermutlich von OSCH₂ ($\Delta 64$ Da, Abb.18) charakteristisch erkennbar waren. Mögliche Phosphopeptide wären im Falle von Ser/Thr-phosphorylierter Peptiden aufgrund des Verlustes von 79 Da (PO₃⁻) oder, sehr viel prominenter, von 98 Da (Phosphorsäure) im Reflektormodus zu detektieren gewesen. Im Falle Phosphotyrosin-haltiger Peptide wurde eine Abspaltung von 79 Da (PO₃⁻) erwartet

(Abb.18). Zu Beginn der Experimente zu der vorliegenden Arbeit waren diese Fragmentierungsmuster noch nicht systematisch charakterisiert.

Der Grad der Sequenzabdeckung der in Spektren von Verdauungsmischen gefundenen Signale wurde als im Vergleich zu den oben genannten Signifikanzkriterien und dem Anteil zugeordneter Peptidmassen an allen im Spektrum beobachteten Peptidmassen als nachrangiges Kriterium gewertet, lag aber im Fall beispielsweise von LAP 2 β im Bereich von bis zu 60% der Gesamtsequenz.

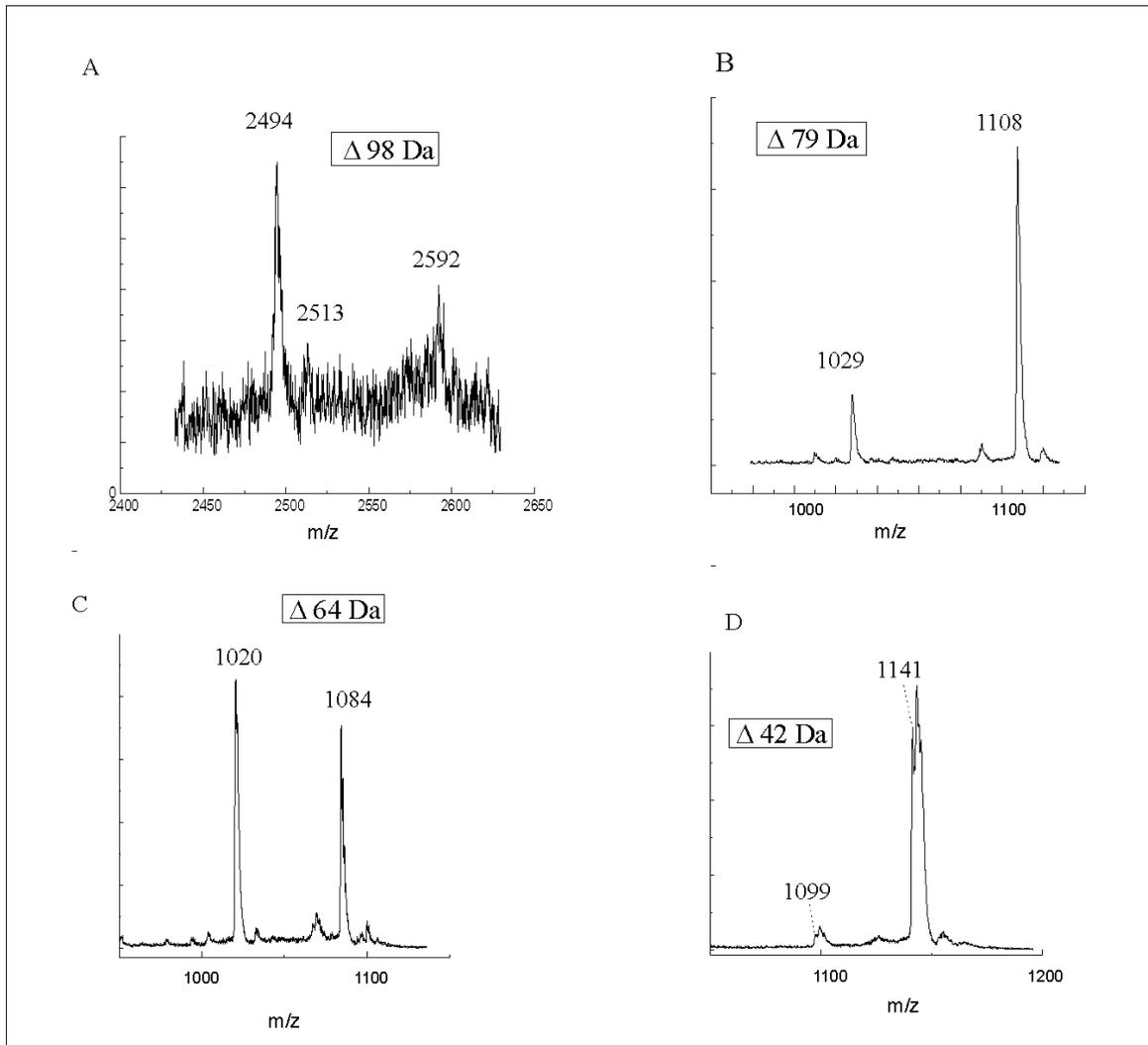


Abb.18: Einige charakteristische im Reflektormodus der MALDI-MS detektierbare Fragmentierungsmuster modifizierter Peptide: **A:** Phosphoserin, **B:** Phosphotyrosin, **C:** Methionin-Sulfoxid, **D:** Acetylierter N-Terminus

5.10.4 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

5.10.4.1 Probenvorbereitung für die MALDI-MS

Die Aliquots der Verdauüberstände und Phosphopeptide nach zweidimensionaler Phosphopeptidkartierung wurden generell nach einer Variante der Matrix-Dünnschichtpräparation (fast evaporation/nitrocellulose matrix, FENC, Shevchenko et al., 1996) für die Messung präpariert. Dazu wird eine gesättigte Lösung von α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure (CCA) in Aceton im Verhältnis 4:1 (v/v) mit Nitrocellulose (10 mg/ml in Aceton:Acetonitril 1:1 (v/v)) gemischt. 0,4 μ l der FENC-Lösung werden auf den MALDI-Proben-träger aufgetragen und bilden nach dem schnellen Verdampfen der Lösemittels einen dünnen Matrixfilm. 0,6 μ l 5% (v/v) Ameisensäure werden dann vorgelegt und 0,4 μ l der Probe hinzugemischt. Nach dem Trocknen wird der Auftragspunkt einmal mit 5 μ l 5% (v/v) Ameisensäure und einmal mit 5 μ l H₂O bidest. gewaschen. HPLC-Fractionen wurden nach der Standardmatrix-Methode präpariert, bei der die Probe in 30% Acetonitril/0.1% Trifluoressigsäure (TA-Lösung) aufgenommen und 1:1 (v/v) mit einer gesättigten Lösung von CCA in TA gemischt wurde.

Seit der kommerziellen Erhältlichkeit (Dezember 1998) wurden Pipettenspitzen, die mit Säulenmaterial für die Umkehrphasen-HPLC gefüllt waren (0,5 μ l Bettvolumen) zur Entsalzung von Verdauemischen eingesetzt (ZipTips, Millipore). Diese Prozedur bot dann Vorteile, wenn die Peptide schrittweise (in je ca. 1 μ l 20% (v/v), 50% (v/v) und 80% (v/v) Acetonitril mit jeweils 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure) eluiert wurden. Dadurch gelang die Identifizierung von Proteinen in Verdauemischen, deren Gesamtspektrum zuvor durch Peptide aus dem Trypsin-Eigenverdau dominiert waren. Dies betraf regelmäßig Verdauemische von großen Proteinen mit Peptiden, die überwiegend ein C-terminales Lysin trugen, und Verdauemische von Proteinen in extrem geringer Menge.

5.10.4.2 Probenvorbereitung für die Nanoelektrospray-Massenspektrometrie

Da eine Nanoelektrospray-Vorrichtung für das Elektrospray-Massenspektrometer in unserem Labor nicht zur Verfügung stand und daher Messungen im geforderten Empfindlichkeitsbereich

mit der Elektrospraytechnik in unserem Labor nicht durchgeführt werden konnten, wurde die Nanoelektrospray-Massenspektrometrie im Rahmen einer Kooperation von Dr. Gitte Neubauer, Protein & Peptid-Gruppe, EMBL Heidelberg, durchgeführt. Die Probenvorbereitung ging von lyophilisierten Peptidgemischen nach in-Gel-Verdau von Proteinen aus. Die Proben wurden in 5% (v/v) Ameisensäure aufgenommen und über zu Nadeln ausgezogenen Glaskapillaren, in die 0,5 µl Säulenmaterial für die Umkehrphasen-HPLC (POROS R2 oder POROS R3, Perseptive Biosystems) gefüllt war, entsalzt. Die Peptide wurden in der Regel schrittweise mit je 2 µl 20% (v/v), 50% (v/v) und 80% (v/v) Methanol direkt in die Nanospray-Nadeln eluiert. Je nach Bedarf (Messungen im Positiv-oder Negativ-Modus) wurden die Proben in der Sprühnadel auf 5% (v/v) Ameisensäure oder 5% (v/v) Ammoniak-Lösung eingestellt.

5.10.5 Durchführung der massenspektrometrischen Messungen

5.10.5.1 MALDI-MS

Die Proben wurden auf einem Bruker REFLEX-Massenspektrometer gemessen. Das Massenspektrometer arbeitete mit kontinuierlicher Extraktion, d.h. die Analytmoleküle wurden sofort nach der Desorption beschleunigt. Die Beschleunigungsspannung betrug 28,5 kV, die Reflektorspannung 30 kV. Für die Aufnahme von Spektren der Fragmente, die durch den Zerfall "nach der Quelle" (post source decay, PSD) aus einem Elternion entstanden, wurde die Reflektorspannung in zwölf Schritten von 30 kV auf 1,27 kV gesenkt. Die normalisierten Teilspektren wurden nach der "FAST"-Methode (Fa. Bruker-Daltonik, Bremen) zu einem Fragmentationenspektrum zusammengesetzt. Für die Isolierung einzelner Peptide für die Sequenzierung wurde eine Vorrichtung zum Setzen von Zeitfenstern (ion gate, "FAST pulser") zugeschaltet.

Die Kalibrierung erfolgte extern mittels der Peptide Angiotensin II oder Adenocorticotropes Hormon (ACTH). Bei der Messung von Peptidgemischen nach typtischem in-gel-Verdau wurde intern mit Hilfe von Produkten aus dem Trypsin-Eigenverdau kalibriert.

5.10.5.2 Nanoelektrospray-Massenspektrometrie

Das Meßgerät war ein API Tripel-Quadrupol-Elektrospraymassenspektrometer mit einer Nanoelektrospray-Ionenquelle, die in der Protein & Peptid-Gruppe am EMBL Heidelberg entwickelt und konstruiert wurde (Wilm und Mann, 1996). Q1-Messungen wurden in Schritten von 0,1 Atommasseneinheiten bei einer Verweilzeit von 1 msec pro Meßpunkt aufgelöst, Parent- und Produktionen-Scan in Schritten von 0,3 Atommasseneinheiten bei einer Verweilzeit von 3 msec. Argon als Kollisionsgas wurde auf eine Gasdicke von $2,8-3,0 \times 10^{14}$ Moleküle/cm² eingestellt bei einer Kollisionsenergie von 50V für Parent ion scans. Die Kollisionsenergie für Produktionen-Scans wurden individuell angepaßt.

5.11 Materialien-Nachweis

5.11.1 Zellkultur

Neuro 2a-Zellen und PC 12-Zellen wurden über die American Tissue Culture Collection (ATCC) bezogen. 615-Zellen waren ein Geschenk von Dr. Barbara Hempstead, Cornell University Medical College, New York. Das Kulturmedium wurde über Life Technologies, Eggenstein, bezogen.

5.11.2 Verbrauchsmaterialien

Immobilon P-Membran	Millipore (Eschborn)
Nitrocellulose-Membranen	Hybond-C Amersham-Buchler (Braunschweig)
Dünnschichtplatten	Merck (Darmstadt)
Entwicklungslösung für ECL-Blot	Amersham-Buchler
Filmmaterial	Hyperfilm-ECL (Amersham-Buchler) Kodak X-Omat Ar-Röntgenfilm (Kodak)
ZipTips	Millipore

5.11.3 Chemikalien

Acetonitril (HPLC-Grad)	Fluka, (Buchs, Schweiz)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma (München)
Ameisensäure	Fluka
Bayol F	Serva (Heidelberg)
BCIP	Biomol (Hamburg)
16-BAC	Sigma
Bipyridin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Butanol	Roth

Coomassie brilliant blue	Serva (Heidelberg)
α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure	Sigma
ϵ -DNP-Lysin	Serva
DTT	Sigma
India ink	Pelikan (Hannover)
Iodacetamid	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
NBT	Biomol
Ouabain	Sigma
PMSF	Serva
Ponceau S	Sigma
Pyridin	Roth
Trifluoressigsäure	Fluka
Vanadiumpentoxid	Sigma-Aldrich
Xylencyanol	Serva

Die übrigen verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Boehringer, Sigma, Serva, Merck (Darmstadt) sowie Fluka und Roth.

5.11.4 Proteine und Peptide

Trypsin (Sequenzierungsgrad)	Sigma
BSA	Sigma
NGF (human, rekombinant)	Sigma
Proteinmarker (high und low)	Pharmacia (Freiburg)

5.11.5 Antikörper

Antikörper R1	Hergestellt im Labor von Prof.Dr.V.Tsetlin, Shemyakin Ovchinnikov Institut für Bioorganische Chemie, Moskau
mAb anti-Phosphotyrosin RC20	Dianova, Hamburg
mAb anti-Phosphotyrosin PY99	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg

anti-Maus / alk. Phosphatase	Sigma
anti-Maus / Peroxidase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
anti-Maus-Cy ³	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen-Cy ²	Dianova, Hamburg
anti-Maus-Texas	Dianova, Hamburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia

5.11.6 Radioaktive Substanzen

γ - ³² P-ATP	NEN DuPont (Dreieich)
--------------------------------	-----------------------

5.11.7 Geräte

Massenspektrometer	API III (Perin-Ellmer/Sciex, Thornhill, Ontario, Kanada) (Nanoelektrospray-MS am EMBL, Heidelberg) Bruker Reflex (Bruker Daltonik, Bremen) (MALDI-TOF-Massenspektrometer mit Reflektor und kontinuierlicher Extraktion)
HPLC-Anlage	SMART System, Pharmacia verwendete Trennsäule: C2/C18 (μ RPC), Pharmacia
konfokales Mikroskop	Zeiss Axiovert
Ultrazentrifuge	TGA-65, Kontron, München
Kühlzentrifuge	Centricon H-401, Kontron-Hermle, München
Tischzentrifuge	Modell 5415S, Eppendorf, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg BioFuge, Heraeus
Photometer	Modell UV-1202, Shimadzu Corp., Kyoto / Japan
Peristaltische Pumpe	Gilson Abimed Miniplus 2, Abimed Düsseldorf
Elektrophorese-Systeme	Flachgelapparatur BioRad, Richmond, Californien Dünnschichtelektrophorese-Apparatur FBE 3000 Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala / Schweden

Blot-Apparatur	Schleicher & Schuell, Dassel
Spannungsquellen	Modell 380, ISCO, Lincoln / Nebraska Modell ECSP 3000/150, Pharmacia
pH-Meßgerät	Modell 643, Knick, Berlin mit Elektrode N 5700 A (Schott, Hofheim)
Radioaktivitätsmessung:	
β-Zähler	Modell 1209 Rackbeta Fa. Wallac
Vakuumkonzentrator	Evaporatorzentrifuge Univapo VUC 150 H, Lyophilisator GT 2 Leybold-Heraeus, Köln