3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien / Enzyme / "Kits"

- **American Radiolabeled Chemicals (ARC)**, St. Louis, MO , USA: [^{3}H]-Palmitoyl-Coenzym A
- **Amersham**, Braunschweig: [9,10-^{3}H]Palmitinsäure (50 Ci/mmol)
- **Bio 101 Inc.,** LaJolla, USA, RPM' Plasmidpräparation
- **Bio-Rad Laboratories**, Richmond, USA: DC Protein Assay Kit (Protein-Assay nach Lowry):, N,N,N,N',N'–Tetramethylethylenediamine (TEMED), Ammoniumpersulfat (APS).
- **Beton-Dickinson**, Frankreich, USA: FALCON-Plastikröhrchen.
- **Boehringer**, Mannheim; AcylCoA-Synthetase, Ampicillin, ATP, Aprotinin, CoEnzym A, Dnase, Dithiothreitol (DTT), Ethidiumbromid, Isopropyl–1–thio–β–D–Galactopyranosid (IPTG), Kanamycin, Leupetnin, Pepstatin, RNase A, Sodiumdodecylsulfat (SDS), Triton X–100, Trypsin.
- **Diagen**, Hilden: Qiagen " Plasmid Midi Kit", Ni^{2+}NTA-Agarose.
- **FMC**, Rockland, USA: Sea Plaque" Agarose
- **Gibco/BRL**, U.K.: Bacto-Tryptone, Bact-Yeast Extract, 2-YT Bouillion, Select Agar.
- **Greiner**, Frickhausen: Petrischalen (Durchmesser 3,5cm, 10cm, 14cm)
- **Jerini Bio Tools** GmbH, Berlin: SPOT-Membrane
- **Merck**, Darmstadt: Acetonitril, Butanol, Chloroform, Dünnschicht-Chromatographie Fertigplatten (Kieselgel 60), Dimethylsulfoxid (DMSO), Essigsäure, Ethanol, Methanol, $MgCl_2$, $MgSO_4$, Sucrose, Toluol.
- **New England Biolabs (NEB),** Schwalbach/Taunus und Toronto, Canada: Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP), Restriktionsenzyme, Molekulargewichtsstandard, Vent-DNA-Polymerase.
- **NEN Du Pont**, Boston, USA: En^{h}ance-Spray,
- **Packard**, Frankfurt/ Main: Ultima Gold Szintillations Flüssigkeit
- **Pharmacia Biotech**, Uppsala, Schweden: C10/20 Säule, C16/70 Säule, Mono Q HR5/5, PD-10 Gelfiltrationssäule.
- **Roth**, Karlsruhe: Acrylamid, Bisacrylamid, Glycin, Harnstoff, Salzsäure, Tris-(hydrox-ymethyl)-aminomethan Ultra Qualität (Tris).
- **Serva**, Heidelberg, Bromphenolblau, Lysozym aus Hühnereiweis, NaCl, $NaH_2PO_4xH_2O$.
- **Sigma**, Dudenhausen u. St. Louis, USA: Blue Sepharose, Bovines Serumalbumin (BSA), Cibachrom Blue, DEAE-CL6B-Sepharose, DEAE-Sepharose *fast flow*, Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA), Ethidiumbromid, Isopropanol,

2–Mercaptoethanol, [^{3}H-9,10(n)]-Palmitinsäure, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Proteinmarker (prestained SDS-PAGE standard solution), Salicylat, N,N,N,N',N'–Tetramethylethylenediamine (TEMED).

Alle hier nicht genannten Substanzen wurden von der Firma Roth, Karlsruhe bzw. der Firma Fisher Scientific (Canada) bezogen.

3.1.2 Zellinien / Viren / Gene / Gewebe

3.1.2.1 Zellinien

- **BHKC**, Baby hamster kidney cells: IMB Bestand
- **COS-7**, American Type Culture Collection (USA)
- **CV1**, Nierenzellinie aus der afrikanischen Grünen Meerkatze: IMB Bestand
- **E.coli Stämme**:
  ENS134, ENS134ams- (Iost und Dreyfus, 1994 u. 1995): Luc Berthiaume, U. of Alberta
  BL21DE3: Novagen, USA
  DW5α: Life Technologies, USA
  M15: IMB Bestand

3.1.2.2 Viren

- **SFV**, Semliki Forest Virus: IMB Bestand

3.1.2.3 Gene / Plasmide

- **Green Flourescent Protein** (GFP), Mutante S65T: Clontech, USA
- **pET19b:** Novagen, USA
- **pETFynSH432hNMT** (Berthiaume and Resh, 1995): Luc Berthiaume, U. of Alberta
- **cDNA SNAP25** in Plasmid: Michael Veit, IMB, Berlin

3.1.2.4 Gewebe

- **Humane Plazenta** wurde uns freundlicherweise aus dem Kreißsaal der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin, zur Verfügung gestellt.
- **Rattengewebe** überließ uns freundlicherweise die Arbeitsgruppe Pharmakologie (G. Lopaschuk, PhD) der University of Alberta, Edmonton, nachdem die registrierten Versuchstiere im Rahmen kardiopharmakologischer Experimente geopfert worden waren.

3.1.3 Besondere Geräte / Dokumentation

- **Blender**
  Typ 4142 (**Braun**, Kronberg/Taunus)
  Polytron PTA 10/35 (Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, NY, USA)

- **Computergestützte Densitometrie der Fluorogramme**
  Epson GT-9000 Scanner
  Scan-Pack Version 3.0 Software (Biometra, Göttingen)

- **Geräte für SDS-PAGE**
  Minigel- und Midigelausrüstung für vertikale Gelelektrophorese (Biometra, Göttingen)
  Eigendesign-Ausrüstung für vertikale Gelelektrophorese (Luc Berthiaume, Universitiy of Alberta)
  Maxidry-Geltrockner (Biometra, Göttingen)

- **Glashomogenisatoren**
  S,cc15 ml, (Braun, Melsungen)
  20 ml (Wheaton, USA)

- **Phosphor-Imager**
  Image Storm (Molecular Dynamics, USA) mit Kassetten für Phosphor-Imager (Molecular Dynamics, USA) zur Detektion von [^{125}I]-Iod

- **Säulen-Chromatographie**
  FPLC-Anlage (Pharmacia, Uppsala, Schweden), bestehend aus
  1. Gradient Controller 2. Pumpen
  3. Mixer 4. UV Monitor
  5. Fraction Collector
  Zubehör: Injektionsschleifen (Superloop) 50 ml, 2 ml.

- **Spektrometer**
  Photometer Ultrospec 2000 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

- **Szintillationszähler**
  Tri-Carb 1600 TR Liquid Szintillations Analyser (Packard Frankfurt/Main)

- **Zentrifugen**

Beckman Ultrazentrifuge L7-65 mit den Rotoren: Type 19, 45 Ti, SW-28, SW40
Beckman Ultrazentrifuge TLA-100 mit Rotoren TLA100.2 und TLA100.3
Beckman Zentrifuge J2-H2 mit den Rotoren: JA-20,
(Beckman, Palo Alto, USA)
Eppendorf Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
Laborzentrifuge Sigma 3K12 mit Rotor Nr. 11133 (Sigma Laborzentrifugen, Osterode/Harz)
Laborzentrifuge K26 Jannetzky (Jannetzky, Leipzig)
Tischzentrifuge Typ 1000 mit Rotor 1412 (Universal 30F, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

- **Verbrauchsmaterialien**

Eppendorf, Hamburg: Reaktionsgefäße, Falcon®-Tubes, Pipettenspitzen
Greiner, Frickenhausen: Zellkulturschalen, Nitrozellulosemembran, Whatman Filterpapier
Kodak, Rocherster NY, USA **:** Röntgenfilme X-OMAT® AR

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation der Akzeptoren

3.2.1.1 Präparation von E1-Glykoprotein aus der Hülle des Semliki Forest Virus

3.2.1.1.1 Gewinnung von Semliki Forest Viren

Die Virusanzucht erfolgte auf Baby Hamster Kidney (BHK) Zellen in der Rollerkultur unter Verwendung von Dulbecco´s Modified Eagles Medium (DMEM) unter Zusatz von 4,5 g Glucose und L-Glutamin, 5% fötalem Kälberserum (FKS) und Antibiotikazusatz (PS) (100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin).
Jeweils drei Petrischalen (Ø=15 cm) mit dichtgewachsenen BHK-Zellrasen (Monolayer) wurden auf eine 2l Rollerflasche eingesät und mit DMEM / FKS / PS 24 h rollend bei 37°C kultiviert. Bei Rasenschluß wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit DMEM gewaschen und mit 50 ml DMEM, welchem 30 µl Semliki Forest Virus (SFV)-Konzentrat (Titer 10^{-8}/2 l) zugegeben war, beimpft. Nach 16-20 stündiger Rollinkubation und deutlich sichtbarem zytopathogenen Effekt (CPE) erfolgte die Virusernte. Der abgenommene Zellkulturüberstand wurde durch niedertourige Zentrifugation (30´, 3500 UpM, K26 Jannetzky) von Zelltrümmern gereinigt, worauf sich eine zweistündige Zentrifugation (bei 30.000 UpM; Ti45 Rotor; Beckman-Zentrifuge L7) anschloß. Die erhaltenen Viruspellets wurden in sehr geringem Volumen TNE-Puffer pH 7,4 (20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl;

5 mM Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA) aufgenommen. Gesamtvolumen pro Präparation ca. 400 µl. Bei -80°C erfolgte nach Qualitätsüberprüfung in der SDS-PAGE und Proteinbestimmung nach Bradford die Lagerung.

3.2.1.1.2 Präparation und Deacylierung der Glykoproteine E1 und E2

Das Viruspellet wurde in 600 µl Extraktionspuffer (1% Triton X-100 in TNE-Puffer) resuspendiert und 30 min unter Schütteln inkubiert, um die Glykoproteine aus der Virushülle herauszulösen. Die Trennung der Spikeproteine von dem Kapsidprotein erfolgte durch Ultrazentrifugation (100.000 x g; 1 h). Der so gewonnene Überstand, welcher die Glykoproteine enthält, wurde durch Zugabe frisch hergestellten 5 M Hydroxylamins pH 7,0 auf eine Endkonzentration von 1 M Hydroxylamin eingestellt, um die Proteine zu deacylieren (Berger und Schmidt, 1984a,b). Nach einstündiger Inkubation wurde das Hydroxylamin durch Gelfiltration mit einer PD-10 Säule wieder entfernt. Nachdem die Proteine auf eine 10 ml Säule geladen waren, wurde mit je 500 µl PD-10 Puffer (0,1%Triton X-100 in TNE: 20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA) eluiert und entsprechend Fraktionen von 500 µl aufgefangen. Dabei enthielten typischerweise die vierte bis sechste Fraktion die deacylierten Proteine E1 und E2. Diese gewonnenen Proteinfraktionen wurden in der Polyacrylamidgelelektrophorese in Sodiumdodecylsulfat-Puffer (SDS-PAGE) analysiert, aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung im Protein-Acyltransferase-Enzymtest (PAT-Assay) gelagert.

3.2.1.2 Herstellung rekombinanten GAP-43-GFP-His_6 Fusionsproteins

3.2.1.2.1 Gentechnische Herstellung eines Vektors für die Proteinchimäre GAP-43-fyn-GFP-His_6

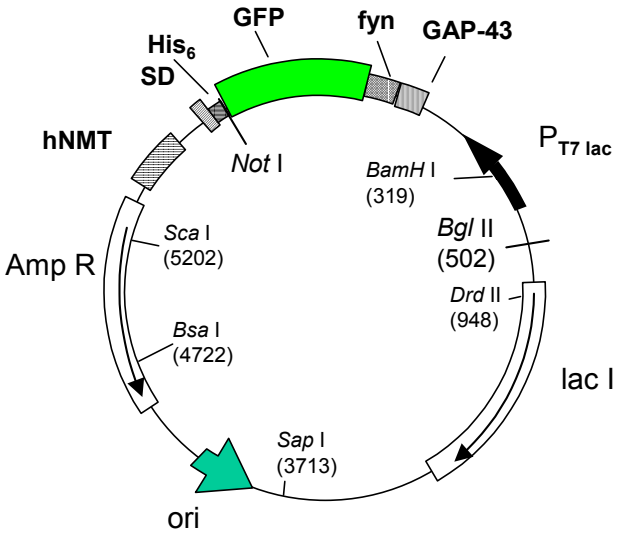
Ausgangsplasmid für die Konstruktion des cDNA-Vektors zur Expression der Proteinchimäre GAP-43-fyn-GFP-His_6 war pETFyn432hNMT (Berthiaume und Resh, 1995), welches wiederum ein Konstrukt aus pET19b (Novagen) darstellt. In mehreren Schritten wurde die cDNA, welche das Fusionsprotein kodiert, in den geschnittenen und dephosphorylierten Vektor eingebaut. Das Fusionsprotein besteht aus den ersten elf Aminosäuren des humanen Proteins GAP-43, gefolgt von sieben Aminosäuren des $p59^{fyn}$ (Aminosäure-Position 12-18, Thr-Lys-Leu-Thr-Glu-Glu-Arg) als hydrophiles Verbindungsstück, an welches sich direkt die vollständige cDNA des Green Fluorescent Proteins (GFP), Mutante S65T (Clontech, Heim *et. al.*, 1996), anschließt. Das Verbindungsstück soll als eine Art Abstandhalter fungieren, um die Acylierung zu erleichtern (McCabe und Berthiaume, 1999; Fraser *et al.,* 1998; Lui *et al.,* 1997). Das fertige Konstrukt ist in **Abb.3.1** dargestellt. Schnittstellen stellten *Bgl* II und *Not* I dar. Der pETFyn432hNMT Vektor enthielt bereits an der *Not* I Schnittstelle die Kodierung

für die Hexahistidinsequenz (His_6-tag). *Bgl* II schneidet in der T7-Promotor Region. Der neu konstruierte Vektor erhielt den Namen pETGAP-43-GFP-His_6. Bei den molekularbiologischen Arbeiten wurden Standardprotokolle von Sambrook *et al.* (1989) verwendet.

3.2.1.2.1.1 Enzymatischer Verdau des Vektors und der cDNA des Fusionsproteins

Zur Umklonierung wurde das cDNA-Fragment mit den Restriktionsenzymen *Bgl* II und *Not* I (NEB, USA) aus dem Vektor geschnitten. Mit den gleichen Restriktionsenzymen wurde in einer getrennten Inkubation auch der Zielvektor verdaut. Die dabei entstehenden komplementären Schnittstellen machten dann die Ligation der DNA-Fragmente mit dem Vektor möglich. Die Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer sowie die gewählten Temperaturen und Zeiten entsprachen den Angaben des Herstellers *New England Biolabs* (NEB, USA). Zur Analyse der DNA-Stücke und der konstruierten Plasmide wurden diese mit bestimmten Enzymen geschnitten und mittels Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend wurden die Konstrukte zur Kontrolle auf automatisierten DNA-Sequenzierern „Applied Biosystems Sequencer“ sequenziert (DNA Core facilitiy, University of Alberta).

pETGAP-43-GFP-His$_6$



Plasmid:
Amp R: Ampicillin Resistenzgen
ori: Beginn der Replikation (origin of replication)
lac I: lac Operator
$P_{T7\ lac}$: Transkriptionspromotor T7
BamH I,*Bgl* II, *Drd* II,*Sap* I, *Bsa* I, *Sca* I, *Not* I: Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme (mit Angabe des Basenpaars) zur Orientierung. Bgl II und Not I als Restriktionsenzyme, welche zur Einklonierung verwendet wurden, sind hervorgehoben.

Einkloniertes Gen:
GAP43: Gen der Aminosäuren 1-11 des N-Terminus des GAP-43 Proteins
fyn: Gen eines hydrophilen Verbindungsstücks entsprechend den 7 Aminosäuren (Position 12-18; TKLTEER) der PTK fyn_{59}
GFP: Gen des Green Fluorescent Protein (Mutante S65T)
His_6: Hexahistidinstruktur
SD: Shine-Dalgarno-Sequenz, intercistronische Region
hNMT: Humane N-Myristoyl-Transferase

Abbildung 3.1: Design des Vektors pETGAP-43-GFP-His$_6$ zur gleichzeitigen Expression der Proteinchimäre GAP-43-GFP-His$_6$ und dem Enzym humane N-Myristoyl-Tranferase. Das Gen, welches die Proteinchimäre kodiert, wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bgl* II und *Not* I einkloniert.

3.2.1.2.1.2 Ligation der cDNA-Stücke

Die mit den Restriktionsenzymen *Bgl* II und *Not* I geschnittenen cDNA und Plasmidfragmente wurden bei 16°C 18 h mit T4-DNA-Ligase (NEB) inkubiert. Die 50 µl Reaktionsvolumen enthielten 5 µl des zehnfach konzentrierten Ligasepuffers (NEB). Das Verhältnis Plasmid-DNA : cDNA-Fragment betrug etwa 1:5.

3.2.1.2.2 Herstellung kompetenter Zellen

Hierzu wurden *E.coli*-Bakterien der Stämme ENS134, ENS134ams- (Iost und Dreyfus, 1994, 1995; Lopez et al., 1994), BL21DE3 (Novagen), DW5α oder M15 (Qiagen, Hilden), in SOB Medium (20 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast Extract, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl, 5 ml 2 M $MgCl_2$ auf 1000 ml Aqua bidest., pH 7,0) in einer Sättigungskultur herangezogen. Mit 1 ml dieser Bakterienkultur wurde anschließend ein Volumen von 100 ml Medium inokuliert und für 90-120 min inkubiert (Schüttler, 300 UpM, 37°C). Wenn die Absorption bei 600 nm zwischen 0,4 und 0,6 lag, wurden die Bakterien für 20 min auf Eis gestellt. Diese Kultur logarithmisch gewachsener Zellen wurde dann auf zwei 50 ml Falcon®-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (Präparative Tischzentrifuge, Swingbuckets, 2.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Bakterienzellsediment durch Umdrehen des Röhrchens weitestgehend vom Medium befreit und in 25 ml gekühlter, steril filtrierter 100 mM $CaCl_2$-Lösung vorsichtig resuspendiert sowie im Anschluß 30 min auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation (präparative Tischzentrifuge, Swingbuckets, 1.500 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 2,5 ml 100 mM $CaCl_2$ Lösung, die zudem 10% Glycerin enthielt, aufgenommen. Nach vorsichtigem Resuspendieren wurden die fertigen kompetenten Zellen in 200 ml Aliquots aufgeteilt und standen nun zur Transformation bereit. Sie wurden entweder direkt verwendet oder bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.1.2.3 Transformation der Bakterienzellen und Analyse der Umklonierung

Zur Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen des entsprechenden *E.coli* Stammes mit 10 µl des Ligationsansatzes des Vektors pETGAP-43fynGFPHis_6 gemischt und 45 min auf Eis gestellt. Darauf folgte eine Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 40 s. Nach kurzem Einstellen ins Eisbad wurden 800 µl LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien zur Regeneration für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Transformierte Bakterien konnten im Gegensatz zu nicht transformierten Zellen im flüssigem LB-Medium die Ampicillinresistenz ausbilden. Die Bakterien wurden dann abzentrifugiert (Tischzentrifuge Eppendorff, 2.000 g, 5 min) und in 100 µl LB-Medium wieder resuspendiert, bevor sie auf ampicillinhaltigen LB-

Agarplatten ausgestrichen wurden. Bei 37°C bildeten sich über Nacht selektiv Kolonien transformierter Zellen.
Nach Vorversuchen der Transformation von *Escherichia coli* der Stämme DW5α zur Plasmidgewinnung und -analyse sowie BL21DE3 zur Expression wurden Bakterien des *E.coli* Stammes ENS134ams- (Iost und Dreyfus, 1995, 1994; Lopez et al., 1994) zur Expression des Proteins ausgewählt.
Zur Überprüfung der Umklonierung wurden aus den Zellen Plasmide präpariert und nach analytischem Verdau mit Restriktionsenzymen im Agarosegel untersucht. Zur Präparation der Plasmide wurde das Kit RPM^{TM} (Bio 101, Inc., LaJolla, Ca, USA) entsprechend dem mitgelieferten Protokoll verwendet. Der analytische Restriktionsverdau fand an den Ligationsschnittstellen statt, so daß nach dem Verdau das *Bgl* II-*Not* I DNA-Fragment und das offene Plasmid getrennt vorlagen. Die Restriktionsenzyme *Not* I und *Bgl* II wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (NEB) verwendet. Die Analyse der so erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese. Zu 2 µl DNA Proben wurden 2 µl zehnfach konzentrierter Probenpuffer (Reaktionspuffer #3, NEB) und 16 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl und 1 mM EDTA) gegeben. Diese 20 µl Proben wurden dann auf ein 0,7-1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese lief mit 90 Volt für ca. 45 min. Durch das dem Gel zugegebene Ethidiumbromid waren die DNA-Banden unter UV-Licht (302 nm) sichtbar und konnten so ausgewertet werden.

3.2.1.2.4 Expression des GAP-43 - GFP-His$_6$ Fusionsproteins in E.coli

Um Kulturen der transformierten Zellen zu erhalten, wurden aus einzelnen Kolonien mit steriler Spitze Bakterien von den LB-Agarplatten "gepickt", mit welchen in 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium im Bakterienschüttler (180 UpM, 37°C) eine Sättigungskultur erstellt wurde. Ausgehend von diesen Kulturen wurde β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben. Darauf folgte eine Inkubation der Kulturen bei Raumtemperatur für 16 Stunden unter Schütteln (180 UpM). Diese Temperatur hatte in Vorversuchen die höchste Expression solublen GAP-43-GFP-His$_6$ Fusionsproteins gezeigt.

3.2.1.2.5 Native Präparation des Fusionsproteins

Zur Reinigung des exprimierten Proteins wurden die 100 ml Bakterienkultur in zwei 50 ml Falcon®-Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation (Präparative TZ, 3.700 UpM, 15 min, 4°C) wurden beide Zellpellets vereint und in 5 ml Phosphat/Tris Puffer (PT-Puffer: 100 mM K_2HPO_4; 20 mM Tris/HCl; pH 8,0) aufgenommen. Unter Kühlung wurden die Zellen dann sechs Mal 30 s Ultraschall aus dem Handsonifikator

ausgesetzt. Durch Zugabe von Lysozym (1,5 mg/ml), Triton X-100 (0,1%), DNAse (0,035 mg/ml), RNAse (0,035 mg/ml), KCl (75 mM), $MgCl_2$ (15 mM), Proteasen Inhibitor Cocktail (2 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Pepstatin A; 0,5 µg/ml Leustatin; 0,5 µg/ml Trypsininhibitor (STI); 0,5 µg/ml n-Tosyl-L-Phenylalanin-Chloromethyl-Keton (TPCK)), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 mM Dithiothreitol (DTT) (Angabe der Endkonzentrationen) wurden die Zellysisbedingungen hergestellt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. Wie zuvor wurden die Zellen dann mit Ultraschallschock behandelt. Durch eine Zentrifugation (Beckman J2-H2, Ja-20, 15.000 x g, 20 min, 4°C, 15 ml Correx Zentrifugenröhrchen) wurden nicht aufgebrochene Zellen, Zellbruchstücke und -membranen abzentrifugiert. Der Überstand mit den in gelöster Form vorliegenden Proteinen wurde auf eine Säule mit 0,5 ml preäquilibrierter Nickel-Chelating-Agarose aufgetragen. Der Durchlauf wurde zur Analyse aufgefangen und dann die Säule mit 4 ml Phosphat/Tris-Puffer pH 8,0 (PT Puffer) gewaschen. Weitere Waschschritte mit veränderten PT-Puffern folgten: 4 ml PT-500 mM NaCl Puffer, jeweils 2 ml PT Puffer mit 10 mM, 20 mM und 50 mM Imidazol pH 7,4. Eluiert wurden die Proteine mit 200 mM Imidazol PT-Puffer pH 7,4. Den Proteinproben wurde DTT in einer Konzentration von 0,5 mM, sowie Protease Inhibitor Cocktail (s.o.) zugegeben, bevor sie bei -80°C tiefgefroren wurden.

3.2.1.3 Präparation rekombinanten SNAP-25 Proteins

3.2.1.3.1 Transformation von E.coli mit SNAP-25 Plasmiden

200 µl kompetente M15 (pREP4) *Escherichia coli* Bakterien (Qiagen, Hilden) wurden zur Transformation mit 10 µl der in TE-Puffer befindlichen Plasmide (5 ng/µl) des Wildtyp SNAP-25 Proteins (SNAP-25wt-His_6) bzw. der Deletionsmutante (SNAP-25-del-His_6) vermischt. Die Plasmide wurden von Thomas Söllner (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, U.S.A.) hergestellt. Er klonierte die gesamte cDNA der Ratten SNAP-25 Isoform B versehen mit einer N-terminalen Hexahistidinstruktur in den Vektor pQW9 (Qiagen, Hilden). Der Deletionsmutante, deren Konstruktion von Veit *et al.* (1996) beschrieben ist, fehlen 13 Aminosäuren des Wildtyp Proteins.
Die Transformationsansätze wurden 45 min auf Eis gestellt und dann für 45 s in einem 42°C warmen Wasserbad "hitzeschock"-behandelt. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden dann je 800 µl 2-YT-Medium zu den Ansätzen gegeben und diese für 60 min bei 37°C geschüttelt. Darauf konnten jeweils 250 µl der Bakterienkulturen auf ampicillin- (100 µg/ml) und kanamycinhaltige (25 µg/ml) 2-YT-Agarplatten (31 g 2-YT Gemisch; 14 g Select Agar / 1 l Aqua bidest.) ausgestrichen werden. Die Kulturplatten wurden im Brutschrank (37°C, 5% CO_2) inkubiert. Gleichzeitig wurden Kontrolltransformationen durchgeführt. Zur Negativkontrolle erfolgte eine Transformation ohne Plasmid, so daß diese *E.coli* Bakterien

wegen fehlender Resistenz auf den antibiotikahaltigen Nährböden nicht wachsen konnten. Transformierte Bakterien können in der einstündigen Regenerationsphase in flüssigem 2-YT Medium sowohl die M15 *E.coli* eigene Ampicillinresistenz als auch die im Plasmid kodierte Kanamycinresistenz durch Enzymexprimierung entwickeln und so auf dem Selektionsagar wachsen.

3.2.1.3.2 Expression von SNAP-25 Proteinen in E.coli

Mit steriler Spitze wurden aus einzelnen Kolonien Zellen "gepickt" und damit 5 ml flüssiges antibiotikahaltiges YT-Nährmedium beimpft. Bei 37°C wuchs diese Kultur über Nacht bis zur Sättigung im Schüttler heran. Aus dieser Übernachtkultur konnten dann mit 2 ml 100 ml antibiotikahaltige YT-Kulturlösung beimpft werden (1:50). Diese wuchs bei 37°C im Schüttler zu einer optischen Dichte von 0,7 (gemessen im Photometer bei 600 nm). Die Induktion der Proteinexpression der rekombinanten Polypeptide (SNAP-25-wt und SNAP-25-del) erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM). Bei 37°C wurden die Kulturen 5 Stunden geschüttelt (200 UpM). Durch Abzentrifugation bei 5.000 x g für 10 min wurden die Bakterien gewonnen. Diese Zell-Pellets konnten entweder bei -80°C eingefroren oder gleich weiterverarbeitet werden.

3.2.1.3.3 Native Reinigung der rekombinanten SNAP-25 Proteine

Die Bakterienzellen wurden in Lysispuffer (50 mM NaH_2PO_4 pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 1 mM PMSF) resuspendiert (4 ml Puffer / 1 g Zellen). Im Eisbad wurden sie vier 2 s langen, maximalen Ultraschallstößen mit dem Handsonifikator ausgesetzt, um einen Aufbruch der Zellen zu erreichen. Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) und DNase I (Endkonzentration 20 µg/ml) wurden hinzugegeben und der Ansatz 15 min bei Raumtemperatur und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine Wiederholung der Behandlung mit dem Sonifikator. Das Medium wurde auf eine Konzentration von 0,5% des nichtionischen Detergens TX-100 gebracht und 20 min unter Rühren inkubiert. Die Kultur wurde dann 20 min bei 10.000 x g abzentrifugiert, um Membranen vom Cytosol zu trennen. Dem Überstand (Cytosol) wurden 0,5 ml voräquilibrierte Ni^{2+}-NTA Matrix (1 ml 50% Gemisch) zugegeben. Um die mit Histidinresten (His_6-tag) versehenen, rekombinanten Proteine an die Nickel-Matrix binden zu lassen, wurde der Ansatz für 5 min auf Eis geschüttelt. Dieses Gemisch wurde bei 4°C in eine 4 cm^3 Säule übertragen, in welcher sich die Ni^{2+}-Matrix mit gebundenen Proteinen anlagern und die ungebundenen Proteine im Puffer als Durchlauf ablaufen konnten. Die 0,5 ml Ni^{2+}-Matrix wurden mit 3 ml Lysispuffer und anschließend mit 2 ml Waschpuffer (Lysispuffer + 50 mM Imidazol) gewaschen. Eluiert wurden die SNAP-25 Proteine mit Eluationspuffer (Lysispuffer; 250 mM Imidazol) in 500 µl

Fraktionen. Typischerweise befand sich das meiste SNAP-25 Protein in den Fraktionen 2 und 3. Zur Stabilisierung kam als Antioxidans DTT zur Endkonzentration von 2 mM hinzu. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2 Präparation von [^{3}H]-Palmitoyl-Coenzym A als Fettsäuresubstrat

3.2.2.1 Enzymatische Herstellung der [^{3}H]-Pal-CoA

Wenn nicht anders angegeben, wurde unter Kühlung (Eis) der Reagenzien sowie der Fettsäure und ihrer Derivate gearbeitet. In 213 µl Inkubationspuffer (10 mM Phosphatpuffer pH 7,5, 1 mM ATP, 4 mM $MgSO_4$) wurden 10 µl frisch in Phosphatpuffer angesetzte Acyl-CoA-Synthetase (10 mg/ml), 15 µl Coenzym A (10 mM in Aqua bidest) und 25 µl [^{3}H]-Palmitinsäure (125 µCi) pipettiert. Während der Inkubationszeit von 10 min entstand bei 28°C im Thermomixer [^{3}H]-Palmitoyl-Coenzym A. Dieser Prozeß wurde durch Zugabe von 1 ml eines 4°C kalten Gemisches aus Acetonitril/1 M Phosphatpuffer (9:1) und Mischen gestoppt. Anschließend wurde durch Zentrifugation (TZ, 10 min, 3500 UpM) das Enzymprotein abzentrifugiert, der Überstand in ein neues mit 1 ml Toluol (4°C) beschichtetes Glasröhrchen transferiert und gut gemischt. Nach der Trennung des Gemisches befand sich in der hydrophilen Unterphase das [^{3}H]-Palmitoyl-Coenzym A Derivat, in der lipophilen Oberphase die ungebundene [^{3}H]-Palmitinsäure. Durch dreimaliges Waschen mit neu zur Präparation hinzugegebenem Toluol wurde eine hohe Reinheit des [^{3}H]-Palmitoyl-Coenzym A erreicht. Dies wurde dann durch Zugabe von $NaHCO_3$ auf pH 7,0 eingestellt und portioniert. Da erfahrungsgemäß sehr viel des [^{3}H]-Palmitoyl-Coenzym A an der Glaswand der Röhrchen haftet, wurden diese dreimal mit je 200 µl PD-10 Puffer (pH 7,4, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,1% TX-100) durch Vortexen ausgewaschen. In diesen 600 µl PD-10 Puffer fand sich eine hohe [^{3}H]-Palmitoyl-Coenzym A-Konzentration. Zur Beurteilung der Reinheit und der Stärke der Radiomarkierung wurde von den Produktfraktionen und den an verschiedenen Schritten der Herstellung entnommenen Proben eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt, sowie die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintilationszähler gemessen.

3.2.2.2 Untersuchung des Fettsäure-Derivats mit Hilfe von TLC

Die Auftrennung der Fettsäurederivate mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (thin layer chromatography; TLC) erfolgte auf einer DC-Fertigplatte Kieselgel 60 (Merck, Mannheim). Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Butanol:Essigäure:Aqua bidest. (8:3:3). Die Proben wurden im Abstand von 1 cm vom unteren Rand aufgetragen, und die Platte in das Laufmittel gestellt. Sobald die Lauffront den oberen Plattenrand erreicht hatte, wurde der Lauf abgebrochen. Die Platte wurde getrocknet und dann mit En^{h}ance-Spray® (NEN Du Pont) behandelt, bevor sie zur Analyse auf einen Röntgenfilm aufgelegt wurde. Als Standards

dienten [^{3}H]-Palmitinsäure des Herstellers Sigma und [^{3}H]-Palmitoyl-Coenzym A von American Radiolabeled Chemicals, Inc. (ARC). Die Expositionszeit betrug 12-16 Stunden.

3.2.3 Präparation von PAT-Enzymquellen und Anreicherung der Enzymaktivität

3.2.3.1 PAT aus humaner Plazenta

3.2.3.1.1 Herstellung von Mikrosomen aus Plazenta

Die **Abb. 3.2** zeigt schematisch die Mikrosomenpräparation. Die Plazenten wurden uns aus dem Kreißsaal der Charité zur Verfügung gestellt, wo sie sofort nach der Entbindung und Untersuchung auf Vollständigkeit auf Eis gelagert wurden. Die Präparation erfolgte dann innerhalb der nächsten Stunde. Alle Präparationsschritte wurden bei 4°C (eisgekühlt) und mit vorgekühlten Puffern ausgeführt. Bei der Herstellung der Mikrosomen wurden nach jedem Schritt Proben zur Bestimmung der Enzymaktivität und der Proteinkonzentrationen abgenommen. Um nach der Zentrifugation einen Vergleich der relativen Enzymaktivität der aufgetrennten Fraktionen zu ermöglichen, wurden die Sedimente im jeweils gleichen Volumen des entsprechenden Mediums resuspendiert, das dem abgenommenen Überstandsvolumen entsprach.
Zum Erstellen eines Homogenats wurde das Trophoblastengewebe aus der bindegewebigen Hülle herausgetrennt, von sonstigem Bindegewebe befreit und mit Schere und Skalpell zerkleinert. Das Naßgewicht des Gewebes wurde bestimmt. Es lag typischerweise bei 200-300 g. Mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,25 M Saccharose; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF) wurde das Blut ausgewaschen. Die Gewebestücke konnten dann im Mixer (Typ 4/42, Braun, Kronberg Taunus) mit 600 ml Waschpuffer aufgefüllt und mit drei 1-minütigen Zerkleinerungsphasen (Stufe 3) grob homogenisiert werden. Nach einer Zentrifugation (Beckman L7-65, Type19, 10.000 UpM, 20 min, 4°C) wurde der so erhaltene Überstand (SN15) bei 4°C zwischengelagert, während das Sediment (P15) erneut im Mixer nach Zugabe von 400 ml Waschpuffer resuspendiert und nochmals wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Das Sediment konnte nun bis auf eine obere Schicht, die sich durch eine hellere Rosafärbung und lockerere Konsistenz vom restlichen Pellet unterschied, verworfen werden. Diese wurde vorsichtig abgenommen und im Überstand resuspendiert. Die Überstände (SN15 und SN15‘) wurden vereint und nochmals zentrifugiert (Beckman L7-65, Type 19, 13.000 UpM, 20 min, 4°C). Zur Gewinnung der Mikrosomen schloß sich nun eine Übernacht-Zentrifugation (L7-65, Type19, 10.000 UpM, 16 h, 4°C) des so erhaltenen Überstandes (SN25) an, während das Sediment (P25) verworfen wurde.

Die gesamte Präparation wird unter Kühlung (4°C) durchgeführt.

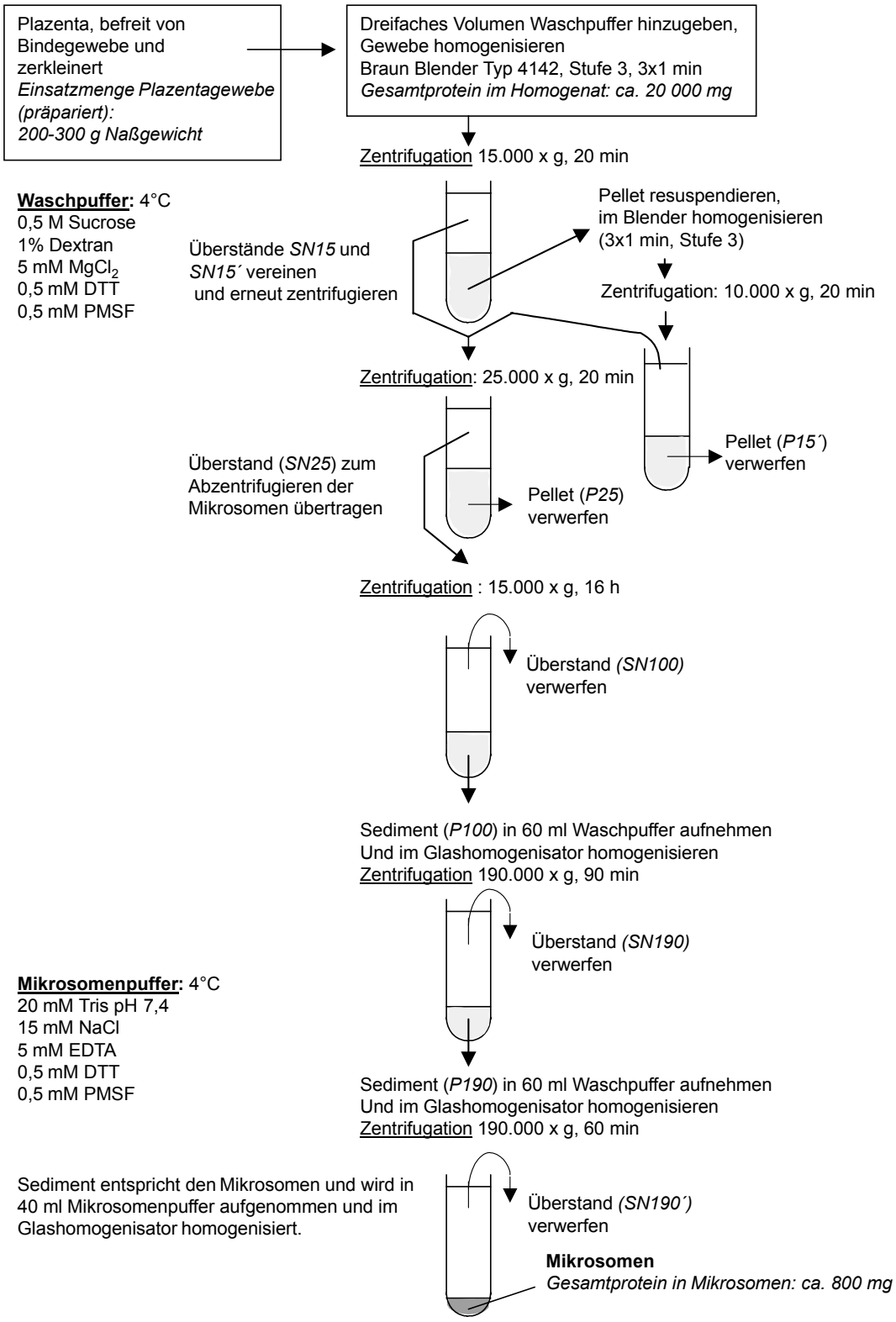


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Mikrosomenpräparation

Der Überstand der Übernacht-Zentrifugation (SN100) wurde verworfen, und das erhaltene Sediment (P100), das die Mikrosomen darstellt, in 40-60 ml Waschpuffer aufgenommen und im Glashomogenisator mit zehn Zügen homogenisiert. Nach einer weiteren Ultrazentrifugation dieses Homogenats (L7-65, Type 45 Ti, 40.000 UpM, 90 min, 4°C) wurde der Überstand (SN190) wiederum verworfen, das Sediment (P190) erneut in Waschpuffer (100-150 ml) aufgenommen und im Glashomogenisator mit zehn Zügen homogenisiert. Darauf wurde der Ultrazentrifugationsschritt kürzer wiederholt (Beckman L7-65, Type45 Ti, 40.000 UpM, 60 min, 4°C). Wieder wurde der resultierende Überstand (SN190‘) verworfen und die Mikrosomenpellets in 40 ml Mikrosomenpuffer (TNE pH7,4: 20 mM Tris/HCl pH7,4; 15 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 5 mM PMSF) aufgenommen und ein weiteres Mal im Glashomogenisator mit 10 Zügen homogenisiert. Die mikrosomale Membranfraktion aus humaner Plazenta wurde dann aliquotiert und bei -80°C gelagert oder gleich weiterverarbeitet.
Bei allen Zwischenschritten und dem Endprodukt wurden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Lowry Assays (Bio-Rad) bestimmt und die Proteinmuster mit der SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft. Im PAT-Assay (s. 3.2.4) wurden die einzelnen Proben auf Enzymaktivität untersucht. Die 200-300 g (Naßgewicht) Trophoblastengewebe ergaben einen Gesamtproteingehalt im Bereich von 20000 mg im Homogenat. Nach der Präparation der Mikrosomen konnten ca. 800 mg Protein gewonnen werden.

3.2.3.1.2 Membranextraktion mit Triton X-100

Um ca. 20 ml Extrakt bei pH 8 als Ausgangsmaterial für die chromatographische Aufreinigung zu erhalten, wurden 8 ml mikrosomale Membranfraktion humaner Plazenta aufgetaut und mit 13,6 ml Mikrosomenpuffer (TNE pH 8,2: 20 mM Tris/HCl pH 8,2; 15 mM NaCl; 5 mM EDTA: 0,5 mM DTT; 5 mM PMSF) verdünnt. Der pH-Wert wurde so auf pH 8,0 eingestellt. Durch Zugabe von 2400 µl 10%igem Detergens Triton X-100 wurde die Probe auf eine Konzentration von 1% TX-100 gebracht und im Kühlraum auf Eis für eine Stunde unter langsamem Rühren inkubiert. Durch Ultrazentrifugation (Beckman L7-65, Type SW40, 28.000 UpM, 60 min, 4°C) wurden die Membranen abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde sofort der Säulenchromatographie zugeführt. Bei jedem Arbeitsschritt, sowie vom Membranpellet, wurden Proben entnommen, um den Proteingehalt und die Enzymaktivität der jeweiligen Fraktion zu überprüfen. Die Enzymaktivität ließ sich fast ausschließlich im Überstand nachweisen.

3.2.3.1.3 Chromatographische Anreicherung der PAT mit DEAE-Säule

Der Reinigungsschritt mit einer C16/70 Säule, die mit 54 ml DEAE fast flow (Pharmacia) gepackt war, wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Säule war äquilibriert mit Waschpuffer A (20 mM Tris pH 8,0; 0,1%TX-100; 2 mM β-Mercaptoethanol; 0,5 mM PMSF) und an die "Fast Protein Liquid Chromatography" Anlage (FPLC) angeschlossen. Der Triton X-100 Membranextrakt wurde mit Hilfe eines 50 ml Superloops mit 0,5 ml/min auf die DEAE fast flow Säule geladen und bei gleicher Flußrate zunächst mit 70 ml Waschpuffer A gewaschen. Die FPLC Anlage steuerte die Mischung des nachfolgenden NaCl-Gradienten aus Waschpuffer A und Elutionspuffer B (1 M NaCl in Waschpuffer A). Dieser verlief von 0 mM bis 250 mM über ein Volumen von 120 ml. Durchlauf und Eluat wurden in 3 ml-Fraktionen vom angeschlossenen Fraktionssammler portioniert. Nach Erreichen einer Salzkonzentration von 250 mM wurde die Säule mit 1 M NaCl gespült, da erfahrungsgemäß hier keine PAT-Aktivität mehr eluiert werden kann.

3.2.3.1.4 Säulenchromatographie mit Blue Sepharose

Eine 20 ml-Säule wurde zunächst mit 10 ml Blue Sepharose Matrix (Sigma) entsprechend den Anweisungen des Herstellers gepackt und vorbehandelt. Die Arbeiten erfolgten ausschließlich bei einer Temperatur von 4°C. Nachdem die Fraktionen der DEAE-Chromatographie, welche Aktivität aufwiesen, aufgeladen waren (ca. 20 ml), wurde die Säule mit vier Säulenvolumen Waschpuffer A gespült. Die Elution erfolgte mittels eines stufenlosen Gradienten von 0 bis 2 mM Cibachrom Blue in Waschpuffer A. Während der Elution wurden 50 Fraktionen von je 30 Tropfen (ca. 800 µl) gesammelt.

3.2.3.2 Mikrosomen aus verschiedenen tierischen Geweben

Als Ausgangsmaterial für die Mikrosomenpräparation dienten Mäuse- und Rattenhirne sowie Rattenlebern. Diese wurden registrierten Versuchstieren entnommen, die im Rahmen von Experimenten (z.B. kardiophysiologische Versuche am Rattenherz) anderer Forschungsgruppen (University of Alberta) geopfert wurden. Die Tiere wurden unter einer Glasglocke mit Diethylether narkotisiert, bevor sie mit einer letalen Dosis Barbiturat eingeschläfert wurden. Sobald auch bei starker Schmerzreizsetzung kein Reflex mehr auszulösen war, wurden Thorax oder Bauchraum eröffnet und die entsprechenden Organe entnommen. Diese wurden sofort in eisgekühlte Puffer (Puffer A: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,25 M Saccharose; 0,5 mM PMSF; 0,5 mM DTT; *Proteaseninibitorencocktail*; 4°C) gegeben. Nachdem das Abtropfgewicht der Organe bestimmt worden war, wurden sie mit Schere und Skalpell in kleine Stücke zerteilt, danach in einen Homogenisator (Wheaton, 55 ml) überführt, und das Vierfache des Gewebegewichtes an Puffer A hinzugegeben. Unter

motorisch angetriebener Drehung des Kolbens wurde das Gewebe in fünf Zügen im Glashomogenisator aufgeschlossen. Darauf folgte die Zentrifugation (Beckman J2-H2, JA-20, 10.000 x g, 20 min, 4°C). Der resultierende Überstand wurde auf Eis gelagert, während das Sediment in entsprechendem Volumen Puffer A resuspendiert und wie zuvor in fünf Zügen homogenisiert wurde. Es schloß sich eine Zentrifugation (Beckman J2-H2, JA-20; 10.000 x g, 20 min, 4°C) des Homogenats an. Die Überstände der beiden Zentrifugationsschritte wurden vereinigt und zur Mikrosomengewinnung ultrazentrifugiert (Beckman L7-65, 70Ti, 100.000 x g, 60 min). Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde das Sediment in 1 ml Puffer A mit der Pipette resuspendiert. Diese Suspension wurde als grobe Mikrosomenfraktion angesehen und entweder als Enzymquelle sofort im PAT-Assay verwendet oder bei -80°C gelagert.

3.2.3.3 Präparation verschiedener Membranfraktionen aus Rattenleber

Die Fraktionierung des Rattenlebergewebes in Plasmamembranen (PM), Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparates (Golgi) erfolgte nach der von Croze und Morre (1984) beschriebenen Methode mit Dichtegradienten-Ultrazentrifugation, welche in **Abb. 3.3** schematisch wiedergegeben ist. Ein großer Vorteil dieser Methode ist es, daß alle Fraktionen aus demselben Gewebehomogenat präpariert werden können. Somit ist der bei biologischem Material sonst oft schwere direkte Vergleich durchaus möglich. Die Rattenlebern wurden, wie bereits oben beschrieben (s. 3.2.3.3), Versuchstieren im Ganzen herausgenommen und sofort in eisgekühltes Medium (0,5 M Saccharose; 1% Dextran, 5 mM $MgCl_2$; 37,5 mM Tris pH 6,5; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF) gegeben. Das Gewebe wurde dann gewogen, zerkleinert, und das Vierfache des Gewichts an Medium hinzugegeben. Es schloß sich die Homogenisierung im elektrisch betriebenen Homogenisator (Polytron 20 ST, Stufe 1½, 30 s, 4°C) an. Dieses Gewebshomogenat konnte dann niedertourig zentrifugiert werden (Beckman J2-H2, JA-20, 5.000 x g, 15 min, 4°C). Der Überstand diente der Gewinnung der ER-angereicherten Fraktion. Die unteren zwei Drittel des Sediments stellten das Ausgangsmaterial für die Gewinnung der PM dar. Aus dem oberen Drittel erfolgte die Präparation der Golgi-Fraktion. Für die Gewinnung der PM wurden die Anteile des Sediments in 10 ml 1 mM Natriumbikarbonatlösung resuspendiert und nochmals niedertourig zentrifugiert (Beckman J2-H2, JA-20, 4.500 x g, 10 min, 4°C). Von dem nun resultierenden Sediment wurde die obere Hälfte in 3 ml des Überstandes resuspendiert und dann tropfenweise zu 10 ml Saccharoselösung (81 g/100 ml) gegeben. Diese wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear, #344058; Beckman, Palo Alto, CA, USA) überführt und mit einem Saccharose-Stufengradienten überschichtet: 3,5 ml 53,4 g/100 ml, 4 ml 48 g/100 ml, 4 ml 46 g/100 ml, 3,5 ml 44 g/100 ml, 3,5 ml 42,6 g/100 ml und 3.5 ml 40 g/100 ml. Nach der Ultrazentrifugation (Beckman L7-65, SW-28, 90.000 x g, 90 min, 4°C)

befanden sich Plasmamembranfraktionen über und unter der 42.6 g/100 ml (d=1,16) Gradientenschicht. Diese Schichten wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt und vereint, in 1 mM Natriumbicarbonat resuspendiert und abschließend durch eine Zentrifugation (Beckman TL-100, TLA 100.3, 9.500 x g, 20 min, 4°C) sedimentiert.

Um Membranen des Golgi-Apparates anzureichern, wurde das obere Drittel nach der Zentrifugation des Homogenats mit einer Pasteurpipette abgenommen und in 1 mM Natriumbikarbonatlösung resuspendiert. Diese Suspension wurde dann in einem Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear, #344058; Beckman, Palo Alto, CA, USA) auf ein Saccharosekissen einer 1,2 M Saccharoselösung aufgeschichtet und hochtourig zentrifugiert (Beckman L7-65, SW-28, 100.000 x g, 30 min, 4°C). Golgimembranen befanden sich danach in der oberen Schicht. Das unterhalb des Saccharosekissens abgesetzte Sediment wurde wiederum in Medium aufgenommen, homogenisiert und dem Überstand der ersten Zentrifugation für die Gewinnung des ERs zugeführt. Mit einer Pasteurpipette ließ sich die Golgi-Schicht abnehmen und in Medium resuspendieren. Durch eine niedertourige Zentrifugation (J2-H2, JA-20, 5.500 x g, 20 min, 4°C) konnten die Golgimembranen gewonnen werden.
Aus dem Überstand der ersten Zentrifugation und dem zugeführten resuspendierten Sediment aus der Präparation der Golgi-Fraktion wurde die Fraktion des ER erzielt. Dazu wurde zunächst mit dem vierfachen Volumen an 5 mM MgCl Puffer verdünnt, woran sich eine Zentrifugation (Beckman J2-H2, JA-20, 8.500 x g, 5 min, 4°C) anschloß. Durch diese wurden die mitochondrialen Anteile abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen dreischichtigen Saccharosegradienten aufgelagert, der aus 6 ml 2,0 M Saccharose, 8 ml 1,5 M Saccharose und 8 ml 1,3 M Saccharose bestand. Diese Schichtung wurde dann ultrazentrifugiert (Beckman L7-65, SW-28, 90.000 x g, 90 min, 4°C), wonach sich ER-Fraktionen in den Interphasen unterhalb und oberhalb der 1.5 M Saccharoseschicht absetzten. Diese wurden durch Absaugen mit einer Pasteurpipette abgenommen und vereint, mit gleichem Volumenanteil 5 mM $MgCl_2$ Puffer verdünnt und durch eine weitere Ultrazentrifugation (Beckman L7-65, SW-28, 90.000 x g, 20 min, 4°C) als Sediment gewonnen.
Die drei gewonnenen Sedimente der unterschiedlichen Membranfraktionen wurden in Puffer (100 mM Imidazol pH 7, 0,3% TX-100, 0,5 mM DTT) aufgenommen und die Proteinkonzentration nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt, bevor die Proben entweder direkt oder nach Lagerung bei -80°C im PAT-Assay eingesetzt wurden.

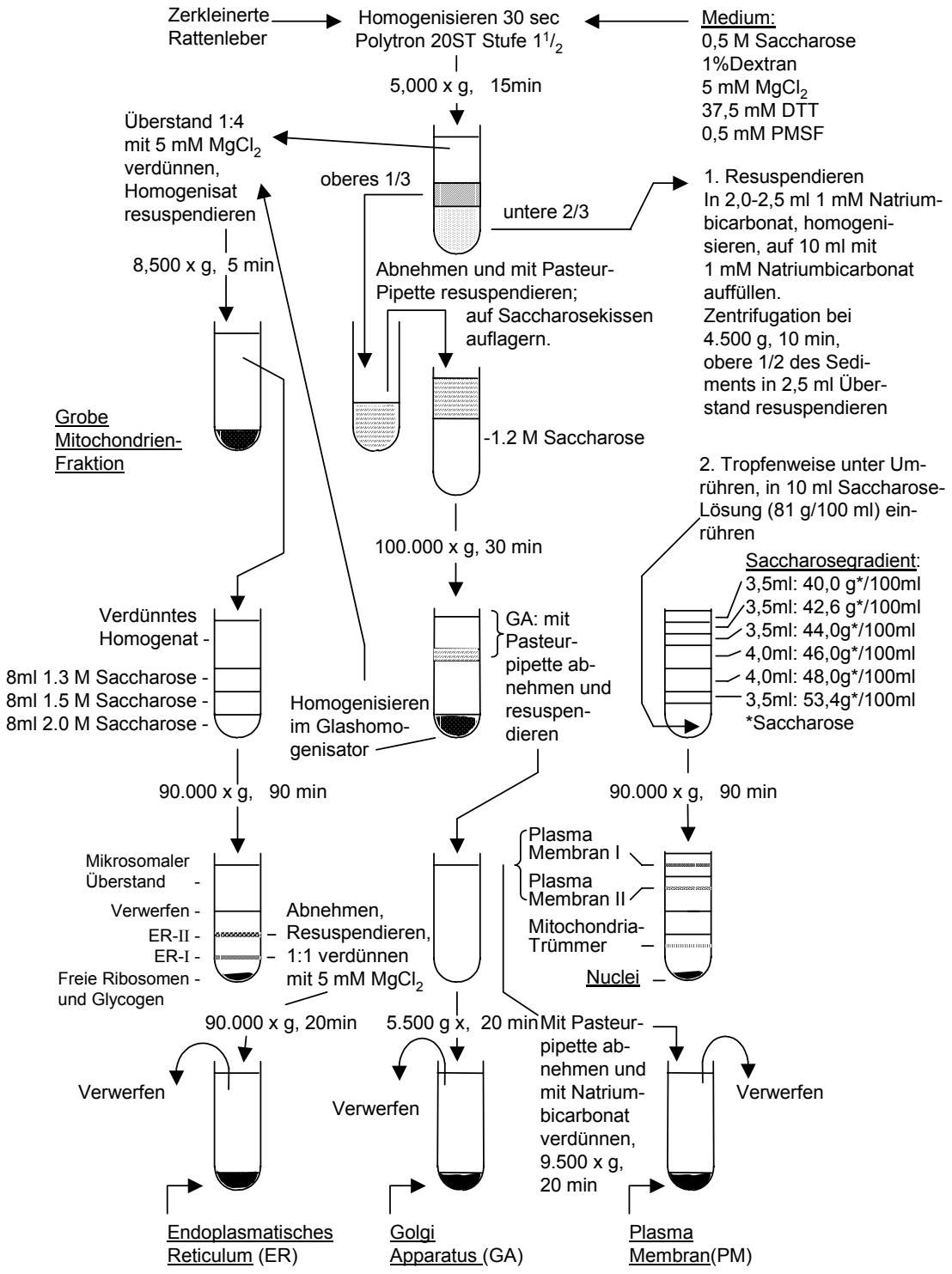


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Präparation verschiedener Membranfraktionen (Golgi, endoplasmatisches Retikulum u. Plasmamembran) aus einem Gewebe (nach Croze und Morre, 1984). Die gesamte Präparation findet unter Kühlung (4°C) statt.

3.2.3.4 Mikrosomenpräparationen aus Zellkulturen

Hierzu wurden Zellkulturen von COS-7 oder CV-1 Zellen in 100 mm-Petrischalen angelegt. Wenn nach 36 Stunden der Zellrasen dicht gewachsen war, wurde das Nährmedium der Zellkulturen von den Platten abgesaugt und mit 15 ml STE-Puffer (100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA; 4°C) gewaschen. Danach wurden die Zellen vom Schalenboden geschabt, in 5 ml STE-Puffer aufgenommen und zentrifugiert (TZ, 1.000 x g, 5 min; 4°C). Nach der Zentrifugation wurde der Puffer abgenommen und auf die Zellpellets je 0,8 ml hypotoner Puffer (10 mM Tris pH 7,4; 0,2 mM $MgCl_2$) gegeben. Die Zellen wurden im hypotonen Puffer durchmischt und dann für 15 min auf Eis inkubiert. Der Zellaufbruch konnte dann mit 30 Zügen im Glashomogenisator (Wheaton, 20 ml) unter Kühlung erreicht werden. Durch Zugabe von 200 µl 1,25 M Saccharose wurde der Puffer auf eine Saccharosekonzentration von 250 mM und 1 mM EDTA eingestellt. Um Zellkerne und unaufgebrochene Zellen, bzw. größere Zelltrümmer zu entfernen, schloß sich eine Zentrifugation (Beckman J2-H2, 1.000 x g, 10 min, 4°C, Correx-Zentrifugenröhrchen) an. Der resultierende Überstand (SN1a) wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen übertragen. Das Pellet (P1a) wurde nochmals in Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM Tris pH 7,4; 1 mM EDTA; 4°C) aufgenommen und wiederum im Glashomogenisator mit 10 Zügen homogenisiert, bevor eine erneute Zentrifugation (1000 x g, 10 min, 4°C) durchgeführt wurde. Der Überstand aus dieser Zentrifugation (SN1b) wurde mit dem davor erhaltenen SN1a vereinigt. Das Pellet wurde verworfen. Um die Membranen von Mitochondrien zu reinigen, wurde eine Zentrifugation (J2-H2, JA-20, 10.000 x g, 10 min, 4°C, Correx-Zentrifugenröhrchen) der vereinigten Überstände (SN1a+b) durchgeführt. Der so erhaltene Überstand (SN10) wurde nun wiederum bei 100.000 x g zentrifugiert (TLA-100, TLA-100.3, 55.000 UpM, 1 h; 4°C). Der Überstand dieser Zentrifugation (SN100) wurde nun verworfen, das erhaltene Sediment in 500 µl TNE Puffer pH 7,4 aufgenommen und im Glashomogenisator resuspendiert. Mit Hilfe des Assays nach Bradford (1976) wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die erhaltenen Mikrosomen wurden entweder direkt nach der Präparation im PAT-Assay eingesetzt oder schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4 PAT-Assays und Analysen

3.2.4.1 PAT- Assay mit SFV Glykoprotein E1

Für diesen Assay wurde ein Gesamtvolumen von 250 µl verwendet. Unter Eiskühlung kamen die Substrate in den vorgelegten TNE Puffer pH 7,4: zunächst 10 µl der deacylierten E1-Proteine in PD-10 Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 0,1% TX-100) und darauf die Enzymquelle, wobei 5 µl Mikrosomen und 50 µl DEAE Fraktionen eingesetzt wurden (ca. 60-80 µg Protein). Gestartet wurde der Assay durch die Zugabe von 10 µl [^{3}H]-

Palmitoyl-CoA (in PD-10 Puffer) (2 µCi), guter Vermischung (durch „Vortex“) des Inkubationsansatzes und Transfer des Reaktionsgefäßes in ein 29°C warmes Wasserbad. Die Inkubationszeit unter diesen Bedingungen wurde auf 30 min standardisiert. Danach wurde die Reaktion mit 1 ml eisgekühltem Chloroform/ Methanol-Gemisch (1:3 v/v) gestoppt. Damit wurden im gleichen Schritt die Proteine gefällt und nicht kovalent gebundenes [^{3}H]-Pal-CoA abgewaschen. Nach einer Zentrifugation (TZ, 8.000 UpM, 5 min) wurden die organischen Lösungsmittel (Überstand) vorsichtig abgegossen, und das Sediment der gefällten Proteine in einem Ultraschallbad erneut in 1 ml Methanol aufgebrochen und von nicht kovalent gebundenen Fettsäuren gewaschen. Nach einer zweiten Zentrifugation (TZ; 8000 UpM 5 min) wurde das Proteinpellet getrocknet und dann in 30 µl dreifachem, nicht-reduzierendem SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen, für 3 min erhitzt, abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge; 14.000 UpM; 10 min) und auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, bzw. im Szintillationszähler der Einbau tritiummarkierter Fettsäure in die Proteine gemessen.

3.2.4.2 PAT-Assay mit auf Zellulosemembran immobilisierten Peptiden

Die Herstellung der gebundenen Peptide erfolgte durch Jerini Bio Tools GmbH, Berlin. Für den Enzymtest mit den auf Zellulosemembranen verankerten, synthetischen Peptiden (Kramer et al., 1994; Malin *et al*., 1995) wurden aus der Membran 4 mm x 4 mm große Quadrate, die genau einen “Peptid-Spot”, also eine definierte Menge gleicher Peptide enthalten, geschnitten. Dabei durften die Membranen nicht mit bloßen Fingern, sondern nur mit Pinzette und Schere berührt bzw. bearbeitet werden. Ein solches Membranstück wurde dann auf eine Stecknadel mit Metallkopf gespießt, wobei die peptidbeladene Fläche nicht beschädigt werden durfte. In Eppendorf Reaktionsgefäßen wurden unter Eiskühlung in TNE-Puffer eine definierte Menge [^{3}H]-Pal-CoA und je nach Ansatz DEAE-chromatographisch angereicherte PAT oder PD-10 Puffer in ein Gesamtvolumen von 50 µl pipettiert. In diesen Inkubationsansatz mit Substrat und Enzymquelle wurde dann als Testakzeptor die Peptidmembran eingetaucht. Im Thermomixer (500 UpM, 28°C) wurde nun für 30 min inkubiert. Durch Transferieren der Membran an der Nadel in ein Reaktionsröhrchen mit 500 µl eisgekühltem Chloroform/Methanol-Gemisch (1:3) wurde die Inkubation gestoppt und für 5 min stehen gelassen. Hierauf folgten fünf Waschschritte mit jeweils 500 µl Methanol und fünf Waschschritte mit je 500 µl PD-10 Puffer. Dabei verblieb die Membran bei jedem Schritt 5 min im Waschmedium. Bevor die Membran dann ohne die Nadel in ein Röhrchen mit Szintillationsflüssigkeit gegeben wurde, wurde die Waschflüssigkeit weitestgehend abpipettiert und die Trägermembran 15 min getrocknet. Die Messung der gebundenen tritiummarkierten Fettsäure erfolgte im Szintilationsmeßgerät.

3.2.4.3 PAT- Assay mit Rhodopsin

Bovines Rhodopsin, das in diesem Versuch als Akzeptorprotein verwendet wurde, wurde von der Arbeitsgruppe um K.P. Hofmann (Inst. f. Med. Physik u. Biophysik, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt. Der Assay mußte im Dunkeln ausgeführt werden. 25 µl der DEAE-Fraktionen (30-40 µg Protein) wurden mit 10 µl Rhodopsin enthaltenden Disk-Membranen (20 µg Protein) in einem Endvolumen von 100 µl TNE Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 µl [^{3}H]-Pal-CoA (1 µCi) gestartet und für 30 min bei 29°C inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zusatz von 50 µl dreifach konzentriertem SDS-PAGE Probenpuffer. 100 µl des Assay-Ansatzes wurden für die SDS-PAGE verwendet. Die Fällung mit Chloroform/Methanol und das Waschen mit Methanol konnten hier nicht angewendet werden, da Rhodopsin nicht stabil gegenüber organischen Lösungsmitteln ist.

3.2.4.4 PAT- Assay mit fynSH432His$_6$ und GAP-43-GFP-His$_6$

Die Membranpräparationen, die auf PAT-Aktivität untersucht werden sollten, wurden mit einer Proteinmenge zwischen 15-25 µg pro Assay eingesetzt. 2 µg FynSH432His$_6$ oder GAP-43-GFP-His$_6$ dienten als Akzeptorprotein und ein Äquivalent von 100 nCi [^{125}I]Iodo-palmitoyl-CoA, zwischen 0,5 µl und 2 µl, als Fettsäuresubstrat. Das Reaktionsmedium war 100 mM Imidazol-Puffer pH 7,0 mit 0,3% Triton X-100 (um PAT solubel zu halten) mit einem Endvolumen im Testansatz von 50 µl. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur, wurde die Reaktion mit 10 µl fünffach konzentriertem SDS-PAGE Proben-puffer gestoppt und die Ansätze für 5 min auf 80°C erhitzt. Die gesamte Probe wurde in der SDS-PAGE analysiert.

3.2.4.5 PAT-Assay mit SNAP-25 Proteinen

SNAP-25 wurde gemäß des Assays mit SFV E1 Protein im 250 µl Ansatz mit anschließender Chloroform/Methanol-Fällung oder gemäß des Assays mit Rhodopsin im 100 µl Ansatz getestet. Dabei wurden 10 µl des gereinigten SNAP-25 Proteins (ca.20 µg) pro Testansatz verwendet.

3.2.4.6 Austesten verschiedener Membranfraktionen aus Rattenleber

Bei den verschiedenen Membranfraktionen Plasmamembran, Golgi und endoplasmatisches Retikulum aus Rattenleber wurde im Bradford Protein Assay der Proteingehalt festgestellt und diese dann nach entsprechender Verdünnung mit 20 µg pro Ansatz im PAT-Assay (siehe 3.2.4.4) eingesetzt.

3.2.4.7 Trypsinverdau der PAT-enthaltenden Mikrosomen

Mikrosomen aus humaner Plazenta wurden verschiedenen Konzentrationen Trypsins (0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 1 mg/ml, 2,5 mg/ml, 10 mg/ml) in einer Inkubation bei Raumtemperatur ausgesetzt. Nach 20 min wurde die Inkubation mit dem Proteaseinhibitor Aprotinin (50 mg/ml) gestoppt. Zwei Ansätze des Trypsinverdaus wurden verglichen, von denen nur einer 1% Triton-X100 enthielt. Die Reaktion fand in TNE-Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 15 mM NaCl, 5 mM EDTA) in einem Gesamtvolumen von 70 µl statt. Kontrollinkubationen mit Aprotinin ohne Trypsin wurden unter sonst gleichen Bedingungen parallel durchgeführt, um einen eventuellen Einfluß des Aprotinins auf die PAT-Aktivität festzustellen.

3.2.4.8 Testen des Einflusses von Trypsin auf PAT-Aktivität in Membranen

Im anschließenden PAT-Assay wurden 35 µl des Trypsin-Verdau-Ansatzes, 5 µl Mikrosomen entsprechend, eingesetzt. Als Akzeptorprotein wurde E1 (SFV) verwendet, das tritiummarkierte [^{3}H]-Pal-CoA diente als Fettsäuredonator. Der Assay wurde nach der beschriebenen, standardisierten Methode ausgeführt. Das Gesamtvolumen der Inkubation betrug 500 µl.

3.2.4.9 SDS-PAGE, Fluorographie, Phosphor-Imager Technik

Die Proben zur SDS-PAGE Proteinauftrennung wurden in SDS-Probenpuffer (31,21 mM Tris/HCl pH 6,8, 10%Glycerol, 3%SDS) aufgenommen, wobei nicht-reduzierende oder reduzierende (5% Mercaptoethanol) Bedingungen je nach Stabilität der Akzeptorproteine gewählt wurden. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Proben nach 5-minütigem Erhitzen im kochenden Wasserbad zentrifugiert (TZ; 14000 UpM; 10 min). Je nach Gelgröße wurden dann 25 µl (Minigel), 40 µl (Midi-Gel) und 100 µl (Maxi-Gel) in die Probentaschen der Polyacrylamidgele verbracht. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 150 V (Lämmli, 1994).

Die Gele wurden nach dem Elektrophoreselauf eine Stunde mit Coomassie gefärbt, fixiert (10% Methanol; 10% Essigsäure; 0,1% Coomassie-Blau; in Aqua bidest.) und dann über

mehrere Stunden entfärbt (10% Methanol; 10% Essigsäure; in Aqua bidest.) bis nur noch die Proteinbanden gefärbt vorlagen. Gele zur Proteinkontrolle wurden nun auf Whatman Filterpapier in einem Vakuum Geltrockner bei 80°C über 2 h getrocknet. Gele, in denen Tritiummarkierungen analysiert werden sollten, wurden vor dem Trocknen nach zweimaligem, 15 minütigem Schwenken in destilliertem Wasser für 1 Stunde in 1 M Na-Salicylat behandelt (Bonner und Laskey, 1974). Im Anschluß an das Trocknen wurde auf diese Gele dann ein Röntgenfilm (Kodax X-Omat^{TM}) aufgelegt und zur Exposition bei -80°C je nach Stärke des radiomarkierten Einbaus zwei bis 14 Tage gelagert.
Filme auf denen [^{125}I]Jod markierte Proteinacylierung detektiert werden sollte, wurden nach dem Fixieren/Färben und Trocknen für 20 Minuten bis 12 Stunden auf Phosphor-Imager Platten (Kodak/Storm) exponiert. Diese konnten dann mit dem computergestützten Phosphorimager (Image Storm, Molecular Dynamics) gelesen werden.