

4. Material & Methoden

4.1. Zellkultur

4.1.1. Sf9-Insektenzellen

Die *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9)-Insektenzellen aus dem Ovargewebe der Puppe des "fall army worm" wurden von C. Harteneck aus dem Institut für Molekulare Pharmakologie, FU Berlin zur Verfügung gestellt. Sf9-Insektenzellen können sowohl adhären als auch in Suspensionskultur wachsen. Zur adhären Kultivierung als "Monolayer" wurden ca. 10^7 Zellen in einer 25 cm^2 -Zellkulturflasche in 10 ml TMN-FH Insektenzellmedium ausgesät. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen mit einem sterilen Zellkulturschaber abgelöst und 3 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Aufnahme in frischem Medium wurde die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden 20 μl Zellen mit 20 μl Trypanblau, das geschädigte Zellen färbt, versetzt und die Zellen mittels Haematocytometer gezählt. Anschließend wurden die Zellen neu ausgesät oder in Suspensionskultur gebracht. Für Suspensionskulturen wurden die Zellen auf eine Dichte von 0,5 bis $1 \times 10^6\text{ ml}^{-1}$ eingestellt und das TMN-FH Insektenzellmedium durch 1 % Lipid-Supplement ergänzt. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage gezählt und bei einer Dichte von 2 bis $2,5 \times 10^6\text{ ml}^{-1}$ mit frischem Medium auf eine Dichte von $0,5 \times 10^6\text{ ml}^{-1}$ verdünnt. Gut wachsende Sf9-Insektenzellen in Suspensionskultur verdoppeln sich innerhalb von 24 h.

TMN-FH Insektenzellmedium:

TMN-FH (Sigma)

10 % FCS (Life Technologies)

100 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin und Streptomycin (Life Technologies)

6 g/l L-Glutamin (Life Technologies)

1 % Lipid-Supplement (Sigma) für Suspensionskulturen

4.1.2. Transfektion von Sf9-Insektenzellen

Zur Transfektion wurden auf einer 6-Loch-Platte ($d=35\text{ mm}$) $0,75 \times 10^6$ Sf9-Insektenzellen pro Loch ausgesät und 45 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Transfektionscocktail überschichtet und nach vier Stunden 4 ml TMN-FH Insektenzellmedium hinzugegeben. Fünf Tage später wurde der Überstand abgenommen. Ver-

dünnungen von 10^{-1} bis 10^{-4} bzw. von 10^{-4} bis 10^{-7} für den Wildtyp-Virus in TMN-FH Insektenzellmedium wurden anschließend für den Plaque-Assay benutzt. Dazu wurden auf 35 mm-Zellkulturschalen 10^6 Insektenzellen ausgesät und nach 45 min und dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,8 ml der Verdünnungen überschichtet. Als Kontrolle wurde anstelle der Virus enthaltenden Verdünnungen TMN-FH Insektenzellmedium verwendet. Nach 90 min Inkubation wurde der Überstand abgenommen und durch 1 ml eines auf 35°C temperierten Agarose-TMN-FH Insektenzellmedium-Gemischs ersetzt. Nach dem Erstarren wurde 1 ml TMN-FH Insektenzellmedium hinzugegeben. Vier Tage später wurden Plaques als Zelltrümmer mit rekombinanten Baculoviren mit 200 μl Pipettenspitzen gepickt und in 750 μl TMN-FH Insektenzellmedium resuspendiert.

Transfektionscocktail:

1 μg Baculotransfer-DNA

150 ng linearisierte BACULO-GOLD-Virus DNA (Pharming, San Diego)

10 μl Transfektamin (Invitrogen)

800 μl Grace-Medium (Sigma)

Agarose-TMN-FH Insektenzellmedium-Gemisch:

1 Teil 2,4% Low-Melting-Agarose (Amersham) in Wasser + 2 Teile TMN-FH Insektenzellmedium

PBS:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM KH_2PO_4

1,5 mM Na_2HPO_4

4.1.3. Amplifikation rekombinanter Baculoviren

Zur ersten Amplifikation rekombinanter Baculoviren wurden $2,5 \times 10^6$ Insektenzellen in 4 ml TMN-FH Insektenzellmedium in 25 cm^2 -Zellkulturflaschen ausgesät und mit den rekombinanten Baculoviren aus dem Plaque-Assay versetzt. Nach fünf Tagen wurde der Überstand abgenommen. Davon wurden 750 μl für die zweite Amplifikation mit 8×10^6 Sf9-Insektenzellen in 15 ml Medium in 75 cm^2 -Zellkulturflaschen verwendet. Fünf Tage später

wurde der Überstand abgenommen. Die 3. Amplifikation wurde in Schüttelkultur durchgeführt. Dazu wurden in einem Fernbach-Schüttelkolben Sf9-Insektenzellen in 550 ml TMN-FH Insektenzellmedium auf $0,25 \times 10^6$ eingestellt und nach Wachstum auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ mit 2ml Überstand der zweiten Amplifikation infiziert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen 10 min bei 8000 g abzentrifugiert und der Überstand bei 4° C gelagert und für die Expression der Zielproteine benutzt.

4.1.4. Plaque-Assay

Beim Plaque-Assay zur Bestimmung der Virustiter wurden die Virus-enthaltenden Zellüberstände der zweiten und dritten Amplifikation in Verdünnungen von 11^{-4} bis 11^{-7} verwendet. Es wurden $0,8 \times 10^6$ Zellen in 2 ml TMN-FH Zellkulturmedium in einer 6-Loch-Zellkulturplatte (d = 35mm) ausgesät. Nach einer Stunde wurde der Überstand abgenommen, mit PBS gewaschen und mit jeweils 800 µl der Virusverdünnungen eine Stunde inkubiert. Danach wurde der Virusüberstand entfernt und durch 2,5 ml eines Agarose-TMN-FH Zellkulturmedium-Gemischs ersetzt. Nach dem Gelieren wurde mit 1ml TMN-FH Zellkulturmedium überschichtet. Sieben Tage später wurden 40 µl einer MTT-Lösung hinzugegeben und für 3 h bzw. über Nacht inkubiert. Dehydrogenasen in lebendenden Zellen wandeln das gelbe Tetrazoliumsalz MTT in violette Formazon um. Dadurch werden die toten infizierten Zellen (Plaques) als gelbe Punkte innerhalb der vitalen violett gefärbten Zellen sichtbar.

Berechnung:

$\text{pfu/ml} = \text{Anzahl Plaques} / V \times 0,8 \text{ ml}$

$V = \text{Verdünnung } (11^{-4} \text{ bis } 11^{-7})$

pfu = Plaque bildende Einheiten (engl.: plaque forming units)

MTT:

1 mg/ml in PBS

4.1.5. Zellkultur der Säugerzellen

NIH 3T3-Fibroblasten wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ) der GBM in Braunschweig, Cos-7- und CHO-Zellen von Prof. Dr. M. Schweiger vom Instiut für Biochemie der FU-Berlin und Neuro 2 a-Zellen von Prof. Dr. G. Schultz, Institut für Molekulare Pharmakologie, FU Berlin erhalten. Die Zellen wurden bei 37° C mit 5 % CO₂ in DMEM mit 1 g/l Glucose (Life Technologies), α-MEM (Biochrom, CHO) oder

DMEM mit 4,5 g/l Glucose (Life Technologies, Neuro 2 a) unter Zusatz von 10 % FCS (Life Technologies), 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin sowie 6 g/l Glutamin (α -MEM) kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Life Technologies) abgelöst. Anschließend wurden die Zellen ab gespült, mit Medium versetzt und 3 min bei 500 g abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen gründlich resuspendiert und zwei- bis fünffach verdünnt wieder ausgesät.

4.1.6. Transfektion von Zellen

Einen Tag vor der Transfektion wurden die entsprechenden Zellen (NIH 3T3, Neuro 2a, Cos-7, CHO) in Löchern (3,83 cm²) einer 12-Loch-Platte auf Glasplättchen (Labonord) so ausgesät, daß sie am nächsten Tag eine Konfluenz von ca. 50 % erreicht hatten. Zur Transfektion wurden pro Loch 1,5 µg der entsprechenden DNA zu 7,5 µl Superfect (Qiagen) in 75 µl DMEM (Life Technologies) in ein Reaktionsgefäß gegeben, kurz geschüttelt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 0,6 ml des normalen Zellkulturmediums einschließlich 10 % Serum versetzt. Danach wurde der Transfektionscocktail mit DNA und Superfect vorsichtig auf die Zellen getropft. Bei CHO- und Neuro 2a-Zellen wurde der Transfektionsüberstand nach 3 h durch normales Medium einschließlich 10 % Serum ersetzt. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und vor der Stimulation 3 bis 5 h in Medium ohne Serum inkubiert.

4.2. Proteinexpression in *E. coli*

Zur induzierbaren Expression von Proteinen in *E. coli* wurden Stämme verwendet, die den lacI-Repressor (lacI^q) konstitutiv exprimieren: M15[pREP 4] (Qiagen) und BRL 21 (DE3) (Invitrogen). Nach Transformation mit T7-RNA-Polymerase-induzierbaren Plasmiden, die die DNA für das zu exprimierende Protein enthalten, wurden die Zellen in LB bzw. Terrific Broth bei 30° C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,5 kultiviert. Nach Induktion der Expression mit 0,2 mM IPTG wurden die Zellen drei weitere Stunden kultiviert und durch zehnminütige Zentrifugation bei 5000 g geerntet. Der Zellaufschluß erfolgte in 2 bis 4 ml Homogenisationspuffer pro g Naßgewicht mittels French press-Apparatur. Ausgehend von einer 500 ml-*E. coli*-Kultur wurden so zwischen 10 und 20 ml Homogenisationspuffer zum Resuspendieren der Zellen verwendet. Danach wurden die Zelltrümmer durch 30 minütige Zentrifugation bei 16000 g sedimentiert und der Überstand für die anschließende Affinitätsreinigung benutzt.

Homogenisationspuffer:

1. Reinigung über His-Tag

1xPBS, pH 7,4

1 mM EDTA

1 mM EGTA

10 µg/ml Aprotinin

10 µg/ml Leupeptin

1 mM PMSF

1 mM DTT

2.Reinigung über GST-Tag

50 mM HEPES pH 7,4

150 mM KOAc

2 mM Mg(OAc)₂

2 mM DTT

1 mM PMSF

2 µg/ml Aprotinin

2 µg/ml Leupeptin

2 mM EGTA

1 mM EDTA

4.3. Proteinreinigung

4.3.1. Reinigung von Proteinen aus *E. coli*

1. Reinigung über His₆-tag mit Ni²⁺-NTA-Sepharose-Säule

Es wurden ca. 10 ml *E. coli* Zellüberstand in Homogenisationspuffer auf eine 1ml Ni²⁺-NTA-Sepharose-Säule (Qiagen, Hilden), die vorher mit ca. 10 ml Homogenisationspuffer äquilibriert wurde, gegeben. Anschließend wurde mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Elution mit 5 ml 50 mM Imidazol (pH 7) und 5 ml 100 mM Imidazol (pH 7).

Waschpuffer:

1 M NaCl

5 % Glycerin

50 mM NaHPO₄, pH 7

2. Reinigung über GST-tag (nach Rexach & Blobel, 1995)

Es wurden ca. 10 ml *E. coli* Zellüberstand in Homogenisationspuffer mit 0,5 ml Glutathion-Agarose-Beads (Pharmacia), die vorher mit Äquilibrierungspuffer äquilibriert wurden, für eine Stunde bei 4° C inkubiert. Danach wurden die Beads 2 min bei 2000 g abzentrifugiert, fünfmal mit Äquilibrierungspuffer durch wiederholte Resuspendierung und Zentrifugation gewaschen und schließlich mit 1 ml Elutionspuffer durch 10 minütige Inkubation bei 4° C eluiert.

Äquilibriumspuffer:

20 mM HEPES pH 7,4

150 mM KOAc

2 mM Mg(OAc)₂

2 mM DTT

Elutionspuffer:

50 mM HEPES pH 7,4

150 mM KOAc

2 mM Mg(OAc)₂

2 mM DTT

10 mM Glutathion

4.3.2. Sf9-Aufarbeitung für Western Blot und Aktivitätstest

Zur Charakterisierung der verschiedenen PKC α -Proteine aus Sf9-Insektenzellen wurden 2×10^6 Zellen mit je 750 μ l rekombinanten Viren der zweiten Amplifikation in 35 mm Schalen infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen abgewaschen, 10 min bei 3000 g abzentrifugiert und in 100 μ l Lysis Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Einfrieren/Auftauen (Western Blot) bzw. Vortexen (Aktivitätstest) aufgeschlossen und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 10 min bei 100000 g sedimentiert. Für den Western Blot wurden aus dem Überstand ca. 40 μ g Protein pro Spur aufgetragen. Beim Aktivitätstest wurden jeweils 30 μ l Überstand verwendet.

Lysis-Puffer:

20 mM Tris pH 7,5

5 mM EDTA

5 mM EGTA

1 mM PMSF

10 μ g/ml Aprotinin

10 μ g/ml Leupeptin

4.3.3. Reinigung von GFP-PKC α und GST-His-PKC α

Alle Reinigungsschritte wurden im Kühlraum bei 4° C bzw. auf Eis durchgeführt. Die infizierten Sf9-Insektenzellen wurden 10 min bei 8000 g abzentrifugiert und anschließend in 5 bis 10 ml pro 10^8 Zellen resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels Ultraschall (10 x 2 s, ca. 70 % der Maximalleistung mit "Microtip"). Danach wurden die Zelltrümmer durch Ultrazentrifugation für 10 min bei 100000 g sedimentiert.

Die Reinigung von GFP-PKC α erfolgte in zwei Schritten auf einer FPLC-Anlage (Pharmacia). Es wurden 2 bis 5 ml des Ultrazentrifugationsüberstandes auf eine mit Homogenisationspuffer äquilibrierte Mono Q HR5/5-Säule (Pharmacia) aufgetragen. Das Fusionsprotein wurde mit einem linearen Salzgradienten von 0 bis 1 M NaCl eluiert. Fraktionen, die das Fusionsprotein enthielten, wurden über die GFP-Fluoreszenz mit einer UV-Lampe ($\lambda = 366$ nm) detektiert,

gepools und auf eine Konzentration von 1 M NaCl eingestellt. Anschließend wurden sie auf eine Phenyl-Superose HR 10/30-Säule gegeben und GFP-PKC α mit einem linearen Gradienten von 1 bis 0 M NaCl eluiert. Die GFP-PKC α enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, mit Centricons 50 (Amicon) konzentriert und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Aus 10^8 Zellen wurden ca. 750 μg GFP-PKC α gewonnen. Die über SDS-PAGE abgeschätzte Reinheit des Fusionsproteins lag je nach Aufarbeitung zwischen 50 und 90 %.

Die Reinigung von GST-His-PKC α erfolgte über eine Glutathion-Sepharose-4B-Säule (Pharmacia). Es wurden 5 ml des Ultrazentrifugationüberstandes auf eine mit 20 mM Tris (pH 7,5) äquilibrierte 1 ml Glutathion-Sepharose-4B-Säule aufgetragen, mit 5 ml 20 mM Tris (pH 7,5) gewaschen und mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Aus 10^8 Zellen wurde ca. 1 mg Protein in einer über SDS-PAGE abgeschätzten Reinheit von etwa 95 % erhalten.

Homogenisationspuffer:

20 mM Tris, pH 7,5

5 mM EDTA

5 mM EGTA

0,5 mM PMSF

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin

1 % Triton

Elutionspuffer:

50 mM Tris, pH 8

5 mM Glutathion

4.4. PKC-Aktivitätstest

Pro Test wurden 30 μl der zu untersuchenden Probe und 10 μl 5x Phosphorylierungspuffer sowie 10 μl Wasser bzw. 10 μl 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMA zusammengegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden 40 μl der Mischung auf P81-Ionenaustauschfilter gegeben, die nach dem Aufsaugen der Flüssigkeit dreimal mit 0,5 % Phosphorsäure gewaschen wurden. Dabei wird das ATP entfernt, während das Substratprotein Histon H1 bzw. Peptid GS gebunden bleibt. Anschließend wurden die Filter in Szintillationsgefäße überführt, mit 10 ml Wasser überschichtet und die beim β -Zerfall auftretende Tscherenkow-Bremsstrahlung gemessen. Die spezifische Radioaktivität des benutzten $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurde mit Hilfe eines Kontrollfilters, bei dem die Radioaktivität nicht herausgewaschen wurde, bestimmt.

5xPhosphorylierungspuffer:

0,1 M TEA, pH 7,5
20 mM Mg(OAc)₂
2 mM CaCl₂
0,5 mg/ml Histon bzw. 50 µM Peptid GS
0,25 mM β-Mercaptoethanol
0,1 mM ATP
2x10⁷ Bq/ml γ³²P-ATP

4.5. *In vitro* Transporttest

(nach Adam et al., 1990)

Zur Untersuchung des Kerntransports von in Sf9-Insektenzellen aufgereinigtem GFP-PKCα wurde ein *in vitro* Transporttest verwendet. Dabei wurden die Zellen mit Digitonin permeabilisiert. Durch Zugabe der fluoreszierenden Reporterproteine GFP-PKCα oder BSA-NLS-TRITC (Schmalz, 1998) und anderer Faktoren wie z. B. Retikulozytenlysat als Ersatz für das ausgelaufene Cytosol konnten nun Bedingungen für den Kerntransport bestimmt werden.

Es wurden zunächst NIH 3T3 Fibroblasten auf 15 Loch-Objektträgern ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 bis 4 h in Medium ohne Serum inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kaltem Transportpuffer gespült, durch 5 minütige Inkubation mit Digitonin-Lösung bei 4° C permeabilisiert und erneut dreimal mit kaltem Transportpuffer gespült. Danach erfolgte die Zugabe der fluoreszierenden Reporterproteine. Bei einigen Versuchen wurden die Reporterproteine mit Retikulozytenlysat, einem Energie-lieferndem System oder BSA präinkubiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30° C wurden die Zellen mit PFA-Lösung 15 min bei RT fixiert und mit PBS gewaschen. Danach wurde das Präparat mit Fluoromount G (Serva) eingedeckelt und zunächst mit einem Mikroskop vom Typ Leica DMIRB betrachtet. Die Dokumentation erfolgte mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica, TCS 4D).

Puffer und Lösungen:

Transportpuffer (TB):	50 mM	HEPES / KOH, pH 7.3
	110 mM	KOAc
	1 mM	EGTA
	5 mM	NaOAc
	2 mM	Mg(OAc) ₂
	2 mM	DTT
	1 µg/ml	Aprotinin
	1 µg/ml	Leupeptin

Digitonin-Lösung: 50µg/ml Digitonin in TB

Transportmix:

3 µl GFP-PKC α oder 1,5 µl BSA-NLS-TRITC

[20 µl 3 %BSA]

[10 µl Retikulozytenlysat]

[1,5 µl Energie-Mix]

[160 nM PMA]

Energie-Mix:	20 Teile	Creatinphosphokinase in TB (1 U/µl)
	5 Teile	ATP in TB (100 mM)
	5 Teile	Phosphocreatin in TB (500 mM)

PFA-Lösung: 3.7 % Paraformaldehyd in PBS

Retikulozytenlysat: 50mg/ml dialysiert gegen TB

Reporterproteine:

17,5 µg/µl GFP-PKC α in TB

1 µg/µl BSA-NLS-TRITC dialysiert gegen TB

4.6. Protein-Bestimmung

(nach Bradford, 1976)

Die Probe, die 2 bis 20 µg Protein enthalten sollte, wurde mit Wasser auf 500 µl aufgefüllt und mit 500 µl Bradford-Reagenz versetzt. Als Proteinstandard diente eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Die Extinktion der Proben wurde nach dem Mischen photometrisch bei 595 nm bestimmt.

Bradford-Reagenz:

0,06 % (w/v) Coomassie-Brillant-Blue G 250

3 % (v/v) HClO₄

4.7. Gelelektrophorese von Proteinen

(nach Laemmli, 1970)

Die 1D-PAGE wurde mit Sammelgelen von 3 % Acrylamid und Trenngelen von 7.5 bis 10 % Acrylamid (mit jeweils 2,6 % Bisacrylamid) in der Mini-Protean II-Kammer (BioRad) in einer Dimension von 80 x 55 x 0,75 mm (Trenngel) durchgeführt.

Die Proben wurden in Laemmli-Probenpuffer gelöst und vor dem Auftrag auf das Gel drei min auf 100° C erhitzt bzw. bei zu detektierender GFP-Fluoreszenz bei GFP-PKCα-Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Sammelgele (3 %)

15 ml Sammelgelpuffer (500 mM Tris/HCl, pH 6,8)

+ 6 ml AA/Bis (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)

+ 39 ml H₂O

+ 0,6 ml 10 % SDS

+ 100 µl TEMED

+ 600 µl APS

Trenngele 10 %

20 ml Trenngelpuffer (1.5 M Tris/HCl, pH 8,8)

+ 26,8 ml AA/Bis (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid)

+ 33,2 ml H₂O

+ 0,8 ml 10 % SDS

+ 50 µl TEMED

+ 200 µl APS

Laemmli-Probenpuffer
62,5 mM Tris/ HCl, pH 6,8
3 % (w/v) SDS
5 % (w/v) β -Mercaptoethanol
10 % (w/v) Glycerol
0,025 mg/ml Bromphenolblau

Laufpuffer:
0,3 % Trisbase
1,44 % Glycin
0,1 % SDS

4.8. Western Blot

4.8.1. Blotting nach dem *Semidry*-Verfahren

Um Proteine aus einer Polyacrylamid-Matrix auf eine Blotmembran zu transferieren, wird beim *Semidry*-Verfahren ein *Sandwich* aus Filterpapier/Gel/Membran/ Filterpapier direkt zwischen zwei Graphitelektroden gelegt.

Vor dem Zusammenbau der Apparatur wurden die Filterpapiere in Blotpuffer getränkt. Die Nitrozellulose-Membran wurde vor dem Blotten mit H₂O benetzt. Das *Sandwich* wurde von unten nach oben auf der Anode aufgebaut: nach drei Filterpapieren wurde die Membran aufgelegt, dann das Gel und abschließend wieder drei Filterpapiere.

Es wurde 2 h bei 1 mA / cm² geblottet.

Filterpapier: Blotting-Papiere GB 002 (Schleicher & Schüll)

Nitrocellulose-Membran: Hybond (Amersham)

Blotpuffer:

48 mM Trisbase, pH 7,4

39 mM Glycin

20% Methanol

0,037 % SDS

4.8.2. Proteinfärbung auf der Blotmembran

Immunoblots (Nitrozellulose) wurden reversibel mit Ponceau-Rot gefärbt, die Proteine des Molekulargewichtsmarkers (Sigma) markiert und mit Wasser entfärbt.

Färbung: 5 Minuten in 0,2 % Ponceau S in 3 % Essigsäure.

Entfärbung: H₂O, bis Proteinbanden sichtbar werden

4.8.3. Immunoblots

Von den zu untersuchenden Proteinlösungen wurden 20-100 µg auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die getrennten Proteine wurden anschließend mit Hilfe des oben beschriebenen "Semidry"-Verfahrens auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Danach wurde über Nacht bei 4° C in 10 % Magermilchpulver in TBS-T blockiert. Am nächsten Tag wurden die Membran 3 h bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen ersten Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal gründlich mit TBS-T gewaschen. Zum Nachweis des gebundenen ersten Antikörpers wurde danach mit dem entsprechenden zweiten Antikörper, einem Alkalische-Phosphatase-Konjugat 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Farbreaktion durch Zugabe der Substratmischung Nitroblau-Tetrazolium und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat in basischem Entwicklungspuffer gestartet und mit einer 20 mM EDTA-Lösung in TBS gestoppt.

TBS:

20 mM Tris/HCl, pH 7,4

150mM NaCl

TBS-T:

20 mM Tris/HCl, pH 7,4

150 mM NaCl

0,1% Tween-20

Entwicklungspuffer:

100 mM NaHCO₃, pH 9,8

1 mM MgCl₂

4.9. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Stimulation wurden die transfizierten Zellen für 10 min mit 160 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 160 nM Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-4-O-Methyl-Ether (MPMA), 500 nM Phorbol-12,13-Dibutyrat (PdBu), 10 mM sn-Dioctylglycerin (DiC8) oder 1 µM Ionomycin in serumfreiem Medium behandelt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 3,7 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Sollte PKCα mittels indirekter Immunfluoreszenz visualisiert werden, wurden die Zellen zunächst 2 x 10 min mit 0,3 % Triton in PBS permeabilisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen erfolgte anschließend eine Inkubation in 3 % BSA/PBS. Die Antikörper wurden in 3 % BSA/PBS eingesetzt. Die primären Antikörper wurden für eine Stunde bzw. über Nacht, die sekundären Antikörper eine Stunde auf den Zellen belassen. Nach den Antikörperinkubationen wurde je-

weils dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Glasplättchen mit den fixierten Zellen entnommen und umgedreht auf Objektträgern mit Fluoromount (Serva) eingedeckt. Am nächsten Tag wurden die Präparate an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leitz, DMIRB) betrachtet. Die Dokumentation erfolgte mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica, TCS 4D).

Antikörper:

anti PKC α (UBI, 1:100) und anti-mouse-IgG Cy3 (Dianova, 1:800)

anti β -tubulin (Boehringer, 1:250) und anti mouse IgG Cy3 (Dianova, 1:400)

Aktin wurde mit TRITC-Phalloidin (1:2000) detektiert.

4.10. Molekularbiologische Methoden

Alle aufgeführten Methoden sind - soweit nicht anders angegeben - den Standardwerken von Sambrock et al. (1989) und Rose et al. (1990) bzw. direkt Angaben der Hersteller von Enzymen und Kits entnommen.

4.10.1. Anzucht von Bakterien

Für Vorkulturen wurden Einzelkolonien von entsprechenden Platten entnommen und in 5 ml Medium angezogen, während für präparative Zwecke stets Vor- bzw. Glycerinkulturen zum Animpfen benutzt wurden. Die *E. coli* wurden bei 30° C bzw. 37° C in LB oder Terrific Broth unter starker Bewegung inkubiert. Bei Plasmid-enthaltenden *E. coli* wurden die dem Resistenzgen entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung bei 600 nm verfolgt.

Medien:

LB:

10g Trypton (ICN, USA)

5g Yeast extract (ICN, USA)

5g NaCl

[15 g Agar für Platten]

ad 1 l und 20min bei 121° C und 1,2 bar autoklaviert.

Terrific Broth:

6 g Trypton (ICN, USA)

12 g Yeast extract (ICN, USA)

2 g Glycerol

ad 450 ml und 20min bei 121° C und 1,2 bar autoklaviert.

Dazu 50 ml TB-Salze: 0,17 M KH₂PO₄

0,72 M K₂HPO₄

4.10.2. Alkoholfällung von DNA

Zur Verringerung des Volumens und zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile wurde zu einer wäßrigen DNA-Lösung das dreifache Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4,8 gegeben. Nach 20 min Inkubation bei -20° C erfolgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 10000 g. Danach wurde der Niederschlag zur Entfernung mitpräzipitierter Salze mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (20 min, 10000 g).

Der DNA-Niederschlag wurde getrocknet und schließlich in TE aufgenommen. Zur Begrenzung des Volumens wurde bei Bedarf das 0,7 fache Volumen Isopropanol statt Ethanol verwendet.

TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA

4.10.3. Analytische Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung kleiner DNA-Plasmidmengen bis zu ca. 20 µg wurde der QIAprep-Spin-Plasmid-Kit (QIAGEN) verwendet.

Durchführung:

Es wurden 2 bis 4 ml einer Bakterienkultur (OD₆₀₀ ca. 1,5) durch Zentrifugation bei 10000 g für 5 min geerntet. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Resuspension in 250 µl Puffer P1. Danach wurden die Zellen mit 250 µl Aufschlußpuffer P2 lysiert (5 min, RT). Der Aufschlußpuffer enthält SDS, das die zellulären Proteine denaturiert, und NaOH, das neben der Zelllyse die chromosomale und Plasmid-DNA denaturiert. Durch Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer N3 wurde die Plasmid-DNA, die unter den bestehenden Hochsalzbedingungen in Lösung bleibt, renaturiert. Dagegen kann die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe nicht renaturieren und bildet zusammen mit denaturierten Proteinen und SDS ein Präzipitat. Anschließend fand eine zehnminütige Zentrifugation bei 10000 g statt. Der Überstand wurde auf eine QIAprep-Spin-Säule mit einer DNA bindenden Silikat-Matrix gegeben und 30 s bei 10000 g zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 100 µl TE durch 30 s Zentrifugation bei 10000 g.

Alle Lösungen, die für die analytische Plasmidisolierung benutzt wurden, stammten von QIAGEN. Die genaue Zusammensetzung der Lösungen wurde vom Hersteller nicht angegeben.

4.10.4. Präparative Plasmidisolierung aus *E. coli*

Mit der präparativen Plasmidisolierung wurden bis zu 1000 µg DNA gewonnen. Es wurde ein Kit-System (QIAGEN) verwendet.

Durchführung:

Es wurden 100 ml einer Bakterienkultur (OD₆₀₀ ca. 1,5) durch Zentrifugation bei 8000 g geerntet, in 10 ml P1 aufgenommen und 5 min mit 10 ml P2 lysiert. Nach Zugabe von 10 ml Neutralisierungspuffer P3 wurde 30 min bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand auf eine mit QBT äquilibrierte Tip 500-Säule gegeben. Anschließend wurde mit 30 ml QC gewaschen und mit 15 ml QF eluiert. Die DNA wurde mit Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 400 µl TE aufgenommen.

Puffer:

P1: 50 mM Tris, pH8; 10 mM EDTA; 100 µg/µl RNase A

P2: 0,2 M NaOH; 1 % SDS

P3: 2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8

QBT: 0,75 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7; 15% Ethanol; 0,15 % Triton

QC: 1 M NaCl; 50 mM MOPS pH 7; 15 % Ethanol

QF: 1,25 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 8,5; 15 % Ethanol

4.10.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Kenntnisse über die Menge einzusetzender DNA sind vor allem beim Einsatz von DNA-Rekombinationstechniken wie Transformationen oder Ligationen nötig. Für in Agarosegelen aufgetrennte DNA ist eine grobe Abschätzung der DNA-Menge durch Vergleich mit der Intensität von Banden bekannter DNA-Menge möglich.

Genauere Bestimmungen erfolgen über die Bestimmung der UV-Absorption bei 260 nm. Es gilt: 1 A₂₆₀ = 50 µg dsDNA/ml. Gleichzeitig läßt sich durch Ermittlung des Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ die Qualität der DNA bestimmen. Proteinverunreinigungen vermindern den Quotienten. Hochgereinigte DNA weist einen A₂₆₀/A₂₈₀-Wert von 1,8 bis 2 auf.

4.10.6. Agarosegelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe erfolgte in Agarosegelen. Gewöhnlich wurden Gele mit 0,8 % Agarose in 1 x TAE verwendet. Im Bereich von 0,6 bis 10

kB erzielt man mit solchen Gelen ausreichende Trennungen. Alle Gele enthielten den DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Ethidiumbromid ermöglicht durch UV-induzierte Fluoreszenz ein Sichtbarmachen der DNA-Banden. In Abhängigkeit von der Größe der Gele erfolgte die Elektrophorese bei 50 bis 150 V. Analytische Gele wurden unter UV bei 302 nm photographiert.

1 x TAE: 40 mM Tris/acetat, pH 8,5

2 mM EDTA

4.10.7. DNA-Elution aus Gelen

Die Elution von DNA aus Gelen erfolgte mit einem DNA-Extraktionskit der Firma peqlab entsprechend den Angaben des Herstellers. Dabei wurde die aus dem Gel ausgeschnittene DNA-Bande zunächst bei 50° C im dreifachen Volumen einer 3 M NaI-Lösung aufgelöst und danach mit 5 bis 10 µl Siliciummatrix für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Matrix wurde durch 5 s Zentrifugation bei 10000 g sedimentiert und das Pellet insgesamt dreimal in 700 µl Waschpuffer resuspendiert und sedimentiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Anschließend wurde das Pellet 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und die DNA mit 20 µl Wasser oder TE eluiert.

4.10.8. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Verhinderung der Religation von Vektorfragmenten mit kohäsiven Enden erfolgte eine Dephosphorylierung der 5'-Enden. Die entsprechenden DNA-Fragmente (bis zu einem µg) wurden mit einer Einheit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (NEB) eine Stunde bei 37° C inkubiert, für zehn Minuten bei 65° C erhitzt und abschließend zur vollständigen Entfernung des Enzyms mit Phenol extrahiert bzw. auf ein Agarosegel aufgetragen und danach eluiert.

4.10.9. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Verknüpfung (Ligation) von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase (NEB) verwendet. Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden im Verhältnis von 1:1 bis 1:10 zugunsten des kleineren Fragments eingesetzt. Die gesamte, in einem 10 µl Ansatz mit 1 Unit Enzym eingesetzte DNA-Menge, variierte von 50 bis 150 ng. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 4° C oder für drei Stunden bei 16° C inkubiert.

4.10.10. Herstellung kompetenter *E. coli*

Ausgehend von einer Vorkultur (OD₆₀₀ ca. 0,5 bis 1,5) wurden 400 ml Medium im Volumenverhältnis 1: 500 angeimpft, die Zellen bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,3 für 30 min auf Eis gestellt und danach 10 min bei 5000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 200 ml eiskaltem Puffer K1 aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 200 ml eiskaltem Puffer K2 resuspendiert. Nach neuerlichem Zentrifugieren erfolgte die Aufnahme der Zellen in 4 ml Puffer K2. Nach Zugabe von 0,8 ml Glycerin (87%) wurden die Zellen in 200 µl Aliquots in Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C aufbewahrt.

K1: 100 mM MgCl₂; 5 mM Tris-HCl, pH 7,4

K2 100 mM CaCl₂; 5 mM Tris HCl, pH 7,4

4.10.11. *E. coli* -Transformation

Zu je 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurden 5 bis 500 ng Plasmid-DNA in maximal 10 µl Gesamtvolumen gegeben. Danach erfolgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis. Nach einem Hitzeschock von einer Minute bei 42° C wurden die Zellen mit 900 µl LB versetzt und eine Stunde unter Schütteln bei 37° C zur Expression der entsprechenden Antibiotikaresistenz(en) inkubiert. Gewöhnlich wurden 200 µl auf LB-Platten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen. Wenn so nicht genügend Kolonien erhalten wurden, wurden die Zellen bei 10000 g abzentrifugiert, in 200 µl LB aufgenommen und ausplattiert.

4.10.12. Mutagenese

Für die gerichtete Mutagenese existieren verschiedene Methoden. Allen gemeinsam ist das Prinzip der Bildung von Heteroduplex DNA-Hybriden in denen wenige Fehlpaarungen von DNA-Basen toleriert werden.

In praxi werden für die Mutagenese ssDNA Oligonukleotide in einer Größe von 20 bis 40 Nukleotiden benutzt. Die Größe der Oligonukleotide wird von der Anzahl der einzuführenden Basenfehlpaarungen bestimmt. Soll nur eine Basenfehlpaarung eingeführt werden, genügen Oligonukleotide mit 17 bis 20 Nukleotiden, während für zwei oder mehr Fehlpaarungen wenigstens 26 bis 30 Nukleotide erforderlich sind. Die einzuführenden Fehlpaarungen müssen in der Mitte des Oligonukleotids liegen, um eine perfekte Hybridisierung mit der Template-DNA von wenigstens 8 (für eine Fehlpaarung) bzw. 12 (für mehrere Fehlpaarungen) Nukleotiden beidseitig der Fehlpaarungen zu ermöglichen.

Die Mutagenese wurde für die K368R-Mutante mit dem U. S. E. Mutagenesis Kit (Pharmacia) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Anleitungen des Herstellers, wobei folgende Oligonukleotide benutzt wurden: K368R 5' gtacgccatccaggatcctgaagaag 3'; Stu I-knockout 5' gctttttggagagctaggcttttgc 3'. Beide Mutationen wurden durch Sequenzierung und die K368R-Mutante zusätzlich durch DNA-Spaltung mit Bam HI bestätigt.

Die A25E-Mutante wurde mir freundlicherweise von Ingo Lehmann aus unserem Labor zur Verfügung gestellt.

4.10.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der *in vitro* Amplifikation von DNA. Dabei wird eine bestimmte Sequenz zwischen den spezifischen Bindungsstellen eines 5'- und eines 3'-terminalen Primers amplifiziert.

Zur Amplifikation wurden 100 bis 500 ng Plasmid-DNA, 5 µl 10 x Puffer, je 50 pmol der entsprechenden Primer, je 10 nmol der vier dNTP's und 1 bis 2 µl 1U/µl Taq- bzw. Pwo-Polymerase (peqlab) in einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammenpipettiert. Die PCR erfolgte in einem Cycler von MWG Biotech mit folgendem Programm:

2 min 94° C (einmalige Denaturierung nur zu Beginn des Programms)

30 s 94° C (Denaturierung)

60 s 53° C (Anlagerung der Primer)

60 s 72° C (Elongation)

Die Schritte 2 bis 4 wurden cyclisch 20 bis 25 mal wiederholt. Falls die mit Pwo amplifizierte DNA direkt in einen TA-Vektor (Invitrogen) ligiert werden sollte, wurde 1 U Taq-Polymerase zum Ansatz gegeben und für 10 min bei 72° C inkubiert, um an den 3'-Enden dATP's einzubauen.

10 x Puffer:

100 mM Tris-HCl pH 8,8

50 mM (NH₄)₂SO₄

250 mM KCl

20 mM MgSO₄

4.10.14. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte entsprechend folgender Methode (Sanger et al., 1977):

Ausgehend von denaturierter dsDNA wird ein komplementärer Primer bei der Hybridisierungsreaktion gebunden. Anschließend synthetisiert eine Polymerase vom Primer in 5'→3' Richtung

eine wachsende Kette durch sukzessiven Einbau von Nukleosidtriphosphaten. Durch Verwendung aller vier Didesoxynukleosidtriphosphate in einem bestimmten Verhältnis zu den normalen Bausteinen erhält man statistisch Abbrüche an jeder möglichen Stelle und somit nach Denaturierung der neuen dsDNA unterschiedlich lange Oligonukleotide, die sich in einem Gel auftrennen lassen.

Zur Sequenzierung wurde der "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit" (Amersham) mit 7-deaza-dGTP verwendet. Zu 1 µg DNA in einem Volumen von 8 µl wurden 1 µl Primer (2 pmol) mit IRD 800-Fluoreszenzmarkierung (MWG Biotech) und 1 µl DMSO gegeben. Davon wurden jeweils 2 µl in vier Reaktionsgefäße gegeben und mit 1 µl A-, C-, G- bzw. T-Reagenz versetzt. Diese Lösungen enthalten die Polymerase, die dNTP's und die jeweiligen Abbruchnukleotide. Anschließend wurde eine PCR (mit 20 Zyklen von jeweils 30s Denaturierung bei 94° C, Anlagerung bei 53° C und Elongation bei 72° C) durchgeführt, die Proben mit 2 µl Probenpuffer versetzt und auf einem 4,5 %igem Acrylamidgel bei 400 V aufgetrennt. Die Detektion der aus dem Gel austretenden DNA-"Banden" erfolgte durch Fluoreszenzanregung der DNA mit einem Laser.

Probenpuffer: 25 mM EDTA pH 8
50 mg/ml Blue Dextran

Laufpuffer (1xTBE): 10,8 g Tris
5,5 g Borsäure
9,6 g EDTA
ad 1 l

Gellösung: 1xTBE
0,7 M Harnstoff
4,5 % Acrylamid/Bisacrylamid (38:2)
0,1 % (w/w) APS
0,1 % (w/w) TEM

4.10.15. Herstellung der Vektoren

Die cDNA von Ratten PKC α (Ono et al., 1988) wurde freundlicherweise von Y. Nishizuka zur Verfügung gestellt.

Im folgenden sind die Bezeichnung des Vectors (z.B.: 1 pVL1392 (Invitrogen) + PKC α), das im Vektor codierte Protein (z.B.: (—> PKC α)) und die ligierten Fragmente mit den entsprechenden Schnittstellen aufgeführt (z.B.: pVL1392 (Not I/Sma I) + PKC α (Eag I/Stu I)).

Baculotransfervektoren:

- 1** pVL1392 (Invitrogen) + PKC α (\rightarrow PKC α): pVL1392 (Not I/Sma I) + PKC α (Eag I/Stu I)
- 2** pAcGHILT-A (Pharmingen) + PKC α (\rightarrow GST-His-PKC α): pAcSGHILT-A (Not I/Sma I) + PKC α (Eag I/Stu I)
- 3** pVL1393 (Invitrogen) + GFP-PKC α (\rightarrow wtGFP-PKC α): pVL1393 (Xma I/EcoR I) + GFP-PKC α (Age I/EcoR I, aus **4**)

Expressionsvektoren:

- 4** pGFP-C3 (Clontech) + PKC α (\rightarrow wtGFP-PKC α): pGFP-C3 (Ecl 136 II) + PKC α (Stu I/Stu I, aus **2**)
- 5** pEGFP-C1(3) + PKC α (\rightarrow EGFP-PKC α): EGFP (Age I/Sal I aus pEGFP-C1) in Vektor **4** (Age I/ Xho I)
- 6** pEGFP-N2 (Clontech) + Δ PKC α (1-660)(\rightarrow PKC α (1-660)-EGFP): pEGFP-N2 (Xho I/Sma I) + PKC α (Xho I/Hinc II partiell verdaut aus Vektor **4**)
- 7** pEGFP-N2 + NLS+ PKC α (1-660)(\rightarrow NLS-PKC α (1-660)-EGFP): NLS 3 (5' tcgacgccaccatgacccccgccgaaaaaaaaaacgcaaagtggaagatccggagct 3') und NLS 4 (5' ccggatcttcactttgcggttttttttcggcgggggtcatggtggcg 3') hybridisiert und in Vektor **6** (Sac I/XhoI)
- 8** pIRES-EGFP (Clontech) + PKC α (\rightarrow EGFP und PKC α): pIRES-EGFP (Not I/EcoR I) + PKC α (Eag I/EcoR I aus Vektor **5**)
- 9** pEGFP-N2 + Δ PKC α (342-672)(\rightarrow Δ PKC α (342-672)-EGFP): Δ PKC α (342-672) über PCR mit PKCm (5' gccatctaacaacctggaca 3') und PKC 3 end ko (5' gtttactactgcactttgcaa 3') amplifiziert und in pCR 2.1. TOPO (Invitrogen) integriert. Danach mit EcoR I ausgeschnitten und in pEGFP-N2 (EcoR I) ligiert.
- 10** pEGFP-C1 + Δ PKC α (326-672)(\rightarrow EGFP- Δ PKC α (326-672)): Δ PKC α (342-672) über PCR mit PKCm (5' gccatctaacaacctggaca 3') und PKC 3 (5' gtttactactgcactttgcaa 3') amplifiziert und in pCR 2.1. TOPO (Invitrogen) integriert. Danach mit EcoR I ausgeschnitten und in pEGFP-C1 (EcoR I) ligiert.
- 11** pEGFP-N2 + PKC α (\rightarrow PKC α -EGFP): 1,5 kB Xho I/BspE I Δ PKC α -Fragment aus Vektor **4** in Vektor **9** (Xho I/BspE I)
- 12** pEGFP-C1(3) + Δ PKC α (1-187)(\rightarrow EGFP- Δ PKC α (1-187)): Vektor **5** mit BamH I verdaut und das große Fragment religiert.

- 13** pEGFP-C1(3) + Δ PKC α (1-311)(\rightarrow EGFP- Δ PKC α (1-311)): Vektor **5** mit Bsp 120 I verdaut und das große Fragment religiert.
- 14** pEGFP-N1 (Clontech) + Δ PKC α (1-187)(\rightarrow Δ PKC α (1-187)-EGFP): Δ PKC α (1-187) aus **5** (EcoR I/BamH I) + pEGFP-N1 (EcoR I/BamH I)
- 15** pEGFP-N3* (\rightarrow EGFP): Δ EGFP aus pEGFP-C1 (Eco 47 III/BsrG I) in pEGFP-N2 (Sma I/BsrG I)
- 16** pEGFP-N3* + Δ PKC α (1-311)(\rightarrow Δ PKC α (1-311)-EGFP): Δ PKC α (1-187) aus **5** (EcoR I/Bsp120 I) + pEGFP-N1 (EcoR I/Bsp120 I)
- 17** pEGFP-C1(3) + Δ PKC α (1-252)(\rightarrow EGFP- Δ PKC α (1-252)): Vektor **5** mit Sma I und Xmn I verdaut und das große Fragment religiert.
- 18** pEGFP-C1 + Δ PKC α (1-289)(\rightarrow EGFP- Δ PKC α (1-289)): Δ PKC α (1-289) über PCR mit PKC 2 (5'ctcgagccatggctgacgtttaccggcca 3') und PKC reg (5'acccggtgtaatgggcacattgtagtattc 3') amplifiziert und in pCR 2.1. TOPO integriert. Danach mit Xho I und Hind III ausgeschnitten und in pEGFP-C1 (Xho I/Hind III) ligiert.
- 19** pEGFP-N1 + Δ PKC α (1-289)(\rightarrow Δ PKC α (1-289)-EGFP): Δ PKC α (1-289) über PCR mit PKC 2 (5'ctcgagccatggctgacgtttaccggcca 3') und PKC reg (5'acccggtgtaatgggcacattgtagtattc 3') amplifiziert und in pCR 2.1. TOPO integriert. Danach mit Xho I und Age I ausgeschnitten und in pEGFP-C1 (Xho I/Age I) ligiert.
- 20** pEGFP-N1 + Δ PKC α (1-252)(\rightarrow Δ PKC α (1-252)-EGFP): Δ PKC α (1-252) aus Vektor **19** (Xho I/Xmn I) + pEGFP-N1 (Xho I/Sma I)
- 21** pEGFP-N2 + Δ PKC α (1-660, K368R)(\rightarrow PKC α (1-660, K368R)-EGFP):
Aus Vektor **6** durch Mutagenese (siehe dort) erhalten.
- 22** pEGFP-N2 + PKC α (K368R)(\rightarrow PKC α (K368R)-EGFP): 1,4 kB BspE I/BsrG I Δ PKC α /GFP-Fragment + Vektor **21** (BspE I/BsrG I)
- 23** pEGFP-C1(3) + PKC α (K368R)(\rightarrow EGFP-PKC α (K368R)): PKC α aus Vektor **22** (Not I/Kpn I) + Vektor **5** (Not I/Kpn I)