

2. Materialien

2.1 Versuchstiere

Lewis-Ratten (8-12 Monate alt)

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg

2.2 Antikörper und Seren

Name	Referenz	IP	Western
JJ316 (Maus anti-Ratte CD28)	(Tacke et al., 1997)	-	-
JJ319 (Maus anti-Ratte CD28)	(Tacke et al., 1995)	-	-
R73 (Maus anti-Ratte TCR β)	(Hünig et al., 1989)	-	-
Kaninchen anti-I κ k	(Brouns et al., 1993)	5 μ l	1: 10000
Hamster anti-Maus TZR zeta (146-968) (Kulturüberstand)	(Rozdzial et al., 1994)	-	1: 500
Kaninchen anti-ZAP-70	(Chan et al., 1992)	2,5-3 μ l	1: 10000
Kaninchen anti-LAT	(Zhang et al., 1998)	-	1 μ g/ml
Maus anti-SLP-76	(Wardenburg et al., 1996)	-	1 μ g/ml
Kaninchen anti-ERK	Santa Cruz	5 μ l	1: 1000
Kaninchen anti-JNK	Santa Cruz	5 μ l	1: 1000
Ziege anti-p38	Santa Cruz	-	1: 1000
Kaninchen anti-phospho ERK	New England Biolabs	-	1: 1000
Kaninchen anti-phospho p38	New England Biolabs	-	1: 1000
Schaf anti-Maus Immunglobulin (ShaMIg)	Boehringer Mannheim	-	-

PY-20 Maus anti-Phosphotyrosin	Santa Cruz	2-4µl	1: 1000
PY-99 Maus anti-Phosphotyrosin	Santa Cruz	2-4µl	1: 1000
4G10 Maus anti-Phosphotyrosin	UBI	-	1: 2500
Maus anti-Kaninchen HRPO	Dianova	-	1: 10000
Ziege anti-Maus HRPO	Dianova	-	1: 10000
anti-Ziege HRPO	Santa Cruz	-	1: 5000
anti-Ratte IL-2	PharMingen	-	-
Biotin Maus anti-Ratte IL-2	PharMingen	-	-

Die angegebenen Mengen bzw. Verdünnungen an Antikörper und -seren für Präzipitation und Western Blot sind als Richtwerte zu verstehen, die mit den vorhandenen Chargen zu Ergebnissen führten.

2.3 Inhibitoren

Pharmakologische Inhibitoren

<u>Inhibitor</u>	<u>Spezifität</u>	<u>Herkunft</u>
Cytochalasin D	Aktinpolymerisierung	Calbiochem
Emodin	p56 lck	Calbiochem
Gö6850	PKC	Alexis
Ly294002	PI3-Kinase (ATP-Bindungsstelle)	Calbiochem
PD98059	MEK	Calbiochem
PP1	src-Kinasen	Calbiochem
SB202190	p38	Calbiochem

Protease-Inhibitoren

Aprotinin	Boehringer Mannheim
Leupeptin	Boehringer Mannheim
Pefabloc	Boehringer Mannheim

Phosphatase-Inhibitoren

Natrium-Orthovanadat	Sigma
Natriumfluorid	Sigma

2.4 Chemikalien

Dieser Abschnitt listet **nicht** die routinemäßig im Labor vorhandenen und benutzten Chemikalien auf.

[γ ³² P]-ATP (AA0068)	Amersham
[³ H]-Thymidin	Amersham
Brij 96	Sigma
Coomassie Brilliant BlueR	Sigma
Diethanolamin	Sigma
DMSO	Sigma
ECL-Membran	Amersham
Enolase	Sigma
Glutathion Sepharose 4B	Pharmacia
Ionomycin	Sigma
Magermilchpulver	Heirler GmbH
NP40 (Igepal CA-630)	Sigma
PMA	Sigma
pNPP (pNitrophenylphosphatdinatrium)	Sigma
Protein A-Sepharose CL4B	Pharmacia
Protein G-Sepharose CL4B	Pharmacia
rekombinantes Ratten IL-2	PharMingen
Rotiphorese Gel 30 (30%ige Acrylamidstammlsg. mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth
Szintillationsflüssigkeit (Betaplate Scint)	Wallac
TritonX-100	Sigma
Tween20	Sigma

2.5 Puffer und Medien

BSS („balanced salt solution“)	1 Vol. BSS I
	1 Vol. BSS II
	8 Vol. Wasser
BSS I (10 fach)	10,0 g Glucose
	0,6 g KH ₂ PO ₄
	2,3 g Na ₂ HPO ₄
	0,1 g Phenolrot
	mit H ₂ O auf 1L auffüllen
BSS II (10 fach)	1,86 g CaCl ₂
	4,0 g KCl

	80,0 g NaCl
	2,0 g MgCl ₂
	2,0 g MgSO ₄
	mit H ₂ O auf 1L auffüllen
BSS/FCS	BSS mit 5% FCS
LB-Medium	20 g LB Broth Base in 1L H ₂ O
PBS („phosphate buffered salt solution“)	0,2 g KCl
	0,2 g KH ₂ PO ₄
	0,05 g MgCl ₂
	8,0 g NaCl
	1,15 g Na ₂ HPO ₄
	mit H ₂ O auf 1l auffüllen
Supplement Complete (SC)	1:100 nicht essentielle Aminosäuren
	1:100 Natriumpyruvat
	0,07 % Glutamin
	5 % FCS (hitzeinaktiviert)
	0,025 % Penicillin
	0,025 % Streptomycin
	1,5 ml NaHCO ₃ (5,6%)
	5 ml β-Mercaptoethanol (50mM)
Trypanblau	0,04 % Trypanblau in PBS/BSA/Azid
Bromphenolblau	0,2%w/v Bromphenolblau
	50%w/v Glyzerin
	10mM Tris pH 8,0

2.6 Standards und Kits

Protein-Molekulargewichtsstandards niedriger und hoher Bereich, BioRad
ECL-Kit, Amersham

2.7 Fusionsproteine

GST-c-Jun wurde freundlicherweise von Dr. Berberich, Würzburg, zur Verfügung gestellt, GST-Grb-2 von Dr. A. Beyers, University of Stellenbosch, South Africa