

3. Methoden

3.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.1.1. Sterilisation

Die Lösungen thermolabiler Stoffe und Kulturmedien werden sterilfiltriert (0.22 µm Filter), andere Lösungen werden autoklaviert (20 min, 120 °C, 1.1 bar Überdruck).

Alle Glasgeräte (Mediumflaschen und Pipetten) werden vor Gebrauch 6 h bei 180 °C im Heissluftschrank sterilisiert.

3.1.2. Medium für Zellkulturen

RPMI 1640 wird nach Angaben des Herstellers mit deionisiertem Wasser, das über ein Millipore-Q-System hochgereinigt ist angesetzt, sterilfiltriert (Membranfiltersandwich von 0.4 µm und 0.2 µm) und bei 4 °C gelagert. Routinemässig werden Sterilproben entnommen und bei 37 °C inkubiert, zusätzlich wird auf Mykoplasmen getestet (siehe 3.1.9.).

Foetales Kälberserum (FCS) wird durch 30-minütige Inkubation bei 56 °C inaktiviert und bei -20 °C gelagert.

Die Zusätze (FCS, Penicillin und Streptomycin) werden erst kurz vor Verwendung des Mediums hinzugegeben. Das fertige Medium wird bei 4 °C gelagert.

RFP-Medium: RPMI 1640 (Fertigpulver)
 2.2 g/l NaCl
 10 % foetales Kälberserum
 100 U/ml Penicillin
 100 µg/ml Streptomycin

PBS pH 7.4:	140 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	10 mM Na ₂ HPO ₄
	1.8 mM KH ₂ PO ₄
Trypsin-Lösung:	0.1 % Trypsin
	0.025 % EDTA in PBS

3.1.3. Kulturbedingungen

Die Kultur der Zellen erfolgt in Plastik-Kulturflaschen (Nunc; 50, 250 und 750 ml Gesamtvolumen) sowie in 96- bzw. 6-well Mikrotiterplatten (Nunc).

Die Inkubation erfolgt in befeuchteten Brutschränken (Heraeus) mit 6 % CO₂ und einer Temperatur von 37 °C.

Vor der Verwendung der Zellen für die Herstellung von Zellysaten werden die Zellen pelletiert. Bei adhärennten Linien werden diese durch Trypsin-Lösung in Lösung gebracht, zweimal mit RPMI-Medium gewaschen und anschließend in einem geeigneten Volumen aufgenommen.

Alle verwendeten Suspensionszellen werden in RFP-Medium mit 5×10^4 bis 5×10^5 Zellen/ml (Zelllinien) bzw. mit 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen/ml (PHA-Blasten) kultiviert.

3.1.4. Zelldichtebestimmung und Vitalitätsfärbung mit Trypanblau

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer). Die Zellsuspension wird im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0.5 %, in physiologischer Kochsalzlösung) gemischt, für zwei Minuten stehengelassen und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der intakte Cytoplasmamembranen nicht passieren kann und somit nur tote Zellen anfärbt.

3.1.5. Kryokonservierung von Zellen

3.1.5.1. Anlegen von Stammkulturen

RFP

Einfriermedium: 10 % DMSO in RFP

Kryoröhrchen: Nunc-Gefrierbehälter mit Schraubverschluss (1 ml)

Die Zellen werden auf eine Dichte von 1 bis 2×10^7 Zellen pro ml RPMI 1640 eingestellt und auf Eis weiterbehandelt. Zu dieser Zellsuspension gibt man das gleiche Volumen an eiskaltem Einfriermedium und aliquotiert jeweils 1ml dieser Mischung in die vorgekühlten und beschrifteten Kryoröhrchen. Diese werden sofort im Anschluß in einen Isolierbehälter (Styroporbox) gestellt und für 24 h bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Erst dann dürfen die Kulturen bei $-140 \text{ }^\circ\text{C}$ im Stickstofftank eingefroren werden.

3.1.5.2. Auftauen von Stammkulturen

Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank werden die Zellen solange in einem Wasserbad ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) geschwenkt, bis die Zellsuspension gerade aufgetaut ist. Danach werden die Kryoröhrchen mit 70 % Ethanol äusserlich dekontaminiert. Die Zellen werden dann in 10 ml RFP verdünnt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 8 min bei $200 \times g$ werden die Zellen resuspendiert und in einem der Zellzahl entsprechendem Volumen RFP kultiviert.

3.1.6. Isolierung und Stimulierung von humanen Lymphocyten

[133,134]

RFP

Ficoll-Paque

Phytohaemagglutinin (PHA)

Hanks/Glucose: 48 mg/l Na₂HPO₄, pH 7.4

60 mg/l KH₂PO₄

8.0 g/l NaCl

0.4 g/l KCl

0.1 g/l Glucose

Periphere T-Zellen (PBMC) werden aus Lymphocyten-Konzentraten gewonnen, die von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt wurden. Die Anreicherung der T-Zellen erfolgt durch Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque. 20 ml Ficoll-Paque werden mit 30 ml Lymphocyten-Konzentrat überschichtet und 20 min bei 200 × g ungebremst zentrifugiert (Heraeus Bactifuge). Die sich in der Interphase sammelnden Lymphocyten werden mit einer Pipette abgenommen und dreimal mit Hanks/Glucose zur Abtrennung anhaftenden Ficolls gewaschen (1 × 15 min bei 200 × g, 2 × 10 min bei 200 × g). Aus 20 ml Lymphocyten-Konzentrat kann man 10⁸ bis 10⁹ Zellen gewinnen, die man als mononukleäre periphere Blutzellen (PBMC) oder periphere Blut Lymphocyten (PBL) bezeichnet. Nach Bestimmung der Zelldichte werden die Zellen in RFP aufgenommen und kultiviert oder nach Zusatz von 5 % DMSO zuerst bei -80 °C über Nacht gelagert und danach in flüßigem Stickstoff eingefroren.

3.1.7. Isolierung muriner Milzzellen

PBS, pH 7.4

Bindemedium: RPMI mit 2 % BSA

Zur Gewinnung primärer muriner Milzzellen werden Balb/c oder IL-4-Rezeptor knockout Mäusen die Milzen entnommen und durch ein steriles Haarsieb gestrichen. Die homogenisierte Zellmasse wird dann möglichst schnell in eiskaltem PBS aufgenommen, für jede Milz werden dabei 1.5 ml PBS benötigt. Die Milzzellen werden dann abzentrifugiert und schließlich zur weiteren Verwendung

in Crosslinking-Experimenten (siehe 3.2.9.) in je 500 μl Bindemedium aufgenommen.

3.1.8. Proliferationstest mit ^3H -Thymidin

RFP

Thymidin-Mix: 50 μCi [^3H -Methyl]-Thymidin (2 Ci/mmol)/ml
60 μM Thymidin

Der Einfluss von Cytokinen und Wachstumsfaktoren auf unterschiedliche Zelltypen kann mit einem ^3H -Thymidin Proliferationstest bestimmt werden. Die Proliferation wird über den Einbau von Tritium markiertem Thymidin in die DNA gemessen.

In einer 96-well Mikrotiterplatte (Nunc) werden je well 100 μl RFP vorgelegt. Das erste well jeder Reihe bleibt frei. In diese werden 200 μl IL-4 Lösung bekannter Konzentration pipettiert und davon ausgehend über 12 wells einer Reihe eine log₂-Verdünnung hergestellt. Zu je 100 μl Cytokinlösung werden 100 μl Zellsuspension gegeben (Zelldichte abhängig von der Zelllinie: 4×10^3 bis 1×10^6 Zellen/ml), die dann für weitere 3 bis 4 Tage inkubiert werden. Während der letzten 4 bis 18 h werden den Kulturen 10 μl Thymidin-Mix (0.5 μCi ^3H -Thymidin/well) zugesetzt.

Die Zellen werden anschließend mit einem Zell-Harvester (Scatron) auf einen Sammelfilter geerntet. Das Sammelfilterpapier wird 30 min bei 60 °C getrocknet und die in die DNA eingebaute Radioaktivität mit Hilfe eines Radioaktivitäts-Scanners (Raytest) bestimmt.

Die von den Zellen eingebaute Aktivität ist proportional der DNA-Synthese der Zellen während der Inkubationszeit.

3.1.9. Überprüfung von Zellkulturen auf Kontamination mit Mykoplasmen

Zelllinien in Kultur werden regelmässig unter Verwendung des Mycoplasma PCR ELISA Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers auf Kontamination mit Mykoplasmen überprüft.

3.2. Proteinchemische Methoden

3.2.1. Kopplung von Cargo-Peptiden an das Antennapedia-Peptid

[135-137]

Cleland's REDUCTACRYL™ Reagent (Calbiochem, Heidelberg)

NaBH₄-Lösung: 15 mg NaBH₄ pro mg eingesetztes REDUCTACRYL™ in H₂O

Phosphatpuffer: 100 mM Na₂HPO₄, pH 8.0

1 mM EDTA

Um Stat6BP, Stat6CP, Biotin-Stat6BP bzw. Stat6BP_(mod.) in lebende Zellen zu transportieren, müssen sie zuerst an einen Vektor gekoppelt werden. Dazu dient ein 16 AS langes Oligopeptid das von Antennapedia, einem Transkriptionsfaktor von *Drosophila melanogaster* abgeleitet ist. Dieses Peptid kann Zellmembranen durchdringen, ohne dafür Energie oder ein spezifisches Transportsystem zu benötigen. Sowohl die hemmenden oder Cargo-Peptide (Stat6BP, Biotin-Stat6BP bzw. Stat6BP_(mod.)), als auch das Antennapedia- oder Vector-Peptid (AP) werden durch Fmoc-Synthese hergestellt. Vektor- und Cargopeptide werden mit je einem zusätzlichem Cystein synthetisiert, die Thiogruppe im Cysteinrest des Antennapediapeptids wird dabei mit einer nPys- (3-Nitro-2-Pyridinsulfenyl-) Schutzgruppe versehen.

3.2.1.1. Reduktion von REDUCTACRYL™

Zur Kopplung der Peptide, werden zunächst die Sulfhydrylgruppen der Cysteine des Stat6BP, Stat6CP, Biotin-Stat6BP bzw. Stat6BP_(mod.) reduziert. Dies geschieht mit Hilfe von REDUCTACRYL™ (an Polyacrylamidharz immobilisiertes DTT). Bevor dieses eingesetzt werden kann, muss es zunächst selbst mit NaBH₄ in wässriger Lösung reduziert werden. Dazu wird das Harz für 15 min mit NaBH₄-Lösung bei RT unter gelegentlichem leichtem Schütteln inkubiert und anschließend einmal mit 1 M Essigsäure und zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen und schließlich in 1 ml Na₂HPO₄- Puffer aufgenommen. Das reduzierte REDUCTACRYL™ kann jetzt für 1 bis 2 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.2.1.2. Reduktion der Cargo-Peptide

Je 2 mg des zu reduzierenden Peptids (Stat6BP, Stat6CP, Biotin-Stat6BP bzw. Stat6BP_(mod.)) wird in 500 µl Phosphatpuffer aufgenommen und eine entsprechende Menge reduziertes REDUCTACRYL (für 2 mg von einem 16 AS langen Oligopeptid werden 20 mg benötigt) hinzugegeben und 2 h bei 4 °C inkubiert.

Von dem Antennapediapeptid werden 2 mg in 500 µl H₂O aufgenommen, von dieser Peptidlösung werden 125 µl (500 µg Peptid) abgenommen und wie oben beschrieben mit REDUCTACRYL™ behandelt. Die restliche Menge Antennapediapeptid wird bis zur Kopplung bei -20 °C gelagert.

Nach der Reduktion der Peptide wird die Reaktion durch schrittweise Zugabe von 1 M Essigsäure abgestoppt, wobei es sehr wichtig ist, dass der pH der Peptidlösung < 6 ist (mit pH-Papier testen). Das Reductacrylharz wird jetzt abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, in ein neues Eppendorfgefäß überführt und der pH mit 1 M NaOH auf 6.5 eingestellt. Vom Stat6BP, Biotin-Stat6BP bzw. Stat6BP_(mod.) werden jetzt 500 µg abgenommen und genau wie die 500 µg des reduzierten Antennapediapeptids im Ellman-Test (siehe 3.2.2.) eingesetzt, um die Menge an freien Thiol-Gruppen zu bestimmen. Da jedes Peptid nur ein Cystein enthält entspricht die Konzentration an freien Thiol-Gruppen der Menge an

reaktiven Peptiden. Das ist wichtig für die Kopplung, da die Ausbeute am höchsten ist, wenn die zu verbindenden Peptide in äquimolarem Verhältnis vorliegen.

3.2.1.3. Kopplung des Antennapediapeptids mit den Cargo-Peptiden

Nachdem mit dem Ellman-Test die Konzentration der reaktiven Peptide festgestellt worden ist, wird das nicht reduzierte Antennapediapeptid mit dem reduzierten zu koppelnden Peptid im molaren Verhältnis 1:1 zusammengegeben und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Abspaltung der chromophoren nPys-Schutzgruppe vom Antennapediapeptid bei der Kopplungsreaktion verändert sich die Färbung des Reaktionsansatzes von leicht gelblich zu tiefgelb.

Danach kann der Kopplungsansatz vor der weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert, oder direkt durch reversed phase HPLC gereinigt werden, um nicht verknüpfte Peptide vom Kopplungsprodukt abzutrennen.

3.2.2. Quantitative Bestimmung freier Thiolgruppen

Reaktions-Puffer:	100 mM Na ₂ PO ₄ , pH 8.0
DTNB-Lösung	4 mg/ml DTNB in Reaktions-Puffer
Cystein-Standard:	1.5 mM, 1.25 mM, 1.0 mM, 0.75 mM, 0.5 mM, 0.25 mM und 0.1 mM in PBS, pH 8.5

Da sowohl das Vektor- als auch die Cargo-Peptide nur über je einen Cysteinrest verfügen, läßt sich nach dessen Reduktion die Konzentration der Peptide exakt anhand der Sulfidreste bestimmen. Die quantitative Bestimmung der freien Thiolgruppen eines Peptides erfolgt durch Umsetzung mit DTNB (Pierce), das auch unter dem Namen Ellman's Reagenz bekannt ist. Hierbei werden die Angaben des Herstellers beachtet.

Zu 2.5 ml Reaktions-Puffer, pH 8.0 werden 250 µl Peptidprobe bzw. Standard und 50 µl DTNB-Lösung gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die

Absorption bei 412 nm (LKB Novaspec) gemessen und die Anzahl freier SH-Gruppen anhand der Eichkurve mit Cystein-Standards bestimmt.

3.2.3. Reinigung von Peptiden durch reversed phase HPLC

Pumpe und Steuereinheit:	Merck Hitachi Intelligent Pump L 6240
Detektion:	UV Monitor Gamma LCD 500 (Linear Instruments Recorder)
Säule:	analytische Vydac C18 Säule (5 µm Porengröße); 4,6 mm × 150 mm
Acetonitril:	Acetonitril (Roth, HPLC Grade) wird über einen 0,22 µm Filter filtriert.
TFA:	0.1 % TFA (Merck) wird über einen 0.22 µm Filter filtriert.

Die Peptidlösung wird auf die mit 0.1 % TFA äquilibrierte Säule aufgetragen. Die maximale Auftragsmenge sollte bei der analytischen C18 Säule 1 mg nicht überschreiten. Die Elution der Peptide erfolgt mittels eines Gradienten 0 - 100 % Acetonitril, bei der Dauer eines HPLC-Laufs von 60 min.

	Retentionszeit [min]	Acetonitril [%]
HPLC-Gradient	10	25
	50	45
	60	100

Tab. 3-1 HPLC-Gradient bei der Peptidreinigung

Die Flußrate beträgt 0.7 ml bei einer Fraktionsgröße von 1.4 ml. Die Elution wird am Durchflußphotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die erhaltenen Fraktionen werden für die quantitative Auswertung gegen 0.1 % TFA als Referenz bei 280 nm photometrisch vermessen. Die Hauptfraktionen werden lyophilisiert.

3.2.4. Molekulargewichtsbestimmung von Peptiden durch Massenspektrometrie

[138]

Die erfolgreiche Kopplung der Peptide wird durch Bestimmung der Molekulargewichte mit einem MALDI (*matrix-assisted laser-desorption ionization*) (Kratos/Schimidzu) oder einem ESI (*electron spray ionization*) (Finnegan) Massenspektrometer überprüft. Als Matrix bei der MALDI Massenspektrometrie dient Sinapinsäure (3,5'-Dimethoxy-4-hydroxycinnaminsäure). Für jede Messung werden jeweils Peptidproben von ca. 1 µg eingesetzt.

3.2.5. Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Peptiden

3.2.5.1. Direkte Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinkonzentrationen werden photometrisch im Bereich von 250 bis 320 nm mit einem Spektralphotometer bestimmt (Kontron Uvikon 930 Spektralphotometer). Eine Extinktion von 1 bei 280 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml.

3.2.5.2. Direkte Konzentrationsbestimmung von Peptiden

[139]

Die Konzentration von Peptiden wird photometrisch bei 280 nm bestimmt. Der Extinktionskoeffizient eines Peptides kann dabei mit guter Näherung aus den Extinktionskoeffizienten der im Peptid enthaltenen Tyrosine, Tryptophane und Cystine nach folgender Gleichung errechnet werden:

$$E_{\text{mol}}(\text{Peptid}) = \text{Anzahl (Tyr)} \cdot 1280 + \text{Anzahl (Trp)} \cdot 5680 + \text{Anzahl (Cystine)} \cdot 120$$

Im Gegensatz zu Cystinresten spielen Cysteinreste bei der Berechnung keine Rolle, da sie bei Wellenlängen > 260 nm keine nennenswerte Absorption zeigen.

Die OD des Peptides berechnet sich dann nach folgender Gleichung:

$$\text{OD (Peptid)} = E_{\text{mol}} (\text{Peptid}) / \text{MW (Peptid)}$$

Diese Gleichungen gelten strenggenommen nur unter chaotropen Bedingungen (pH 6.5; 6.0 M Guanidiumhydrochlorid; 20 mM Phosphatpuffer), sie können jedoch bei kleinen Peptiden, die keine Sekundärstruktur haben, auch für Lösungen in Wasser und PBS angewandt werden.

Eine Extinktion von 1 (bei einer Wellenlänge von 280 nm und einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm) entspricht unter Berücksichtigung der berechneten molaren Extinktionskoeffizienten folgenden Peptidkonzentrationen:

Peptid	Molarer Extinktionskoeffizient [mol ⁻¹ · cm ⁻¹]	Konzentration bei E ₂₈₀ von 1 [mg/ml]
AP (reduziert)	11380	4.84
Stat6BP	1280	0.758
Biotin-Stat6BP	1280	0.642
Stat6BP _(mod.)	1280	0.725
AP/Stat6BP	12760	3.10
AP/Biotin-Stat6BP	12760	2.94
AP/Stat6BP _(mod.)	12760	3.10

Tab. 3-2 Molare Extinktionskoeffizienten

3.2.5.3. Proteinbestimmung nach Bradford

[140]

Färbe-Reagenz: 0.1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G250
4.8 % (v/v) EtOH
8.5 % (v/v) Phosphorsäure

Diese Proteinbestimmung beruht auf der Coomassie-Blau-Färbung von Proteinen. Der Farbstoff (10 mg) wird in EtOH gelöst, mit Phosphorsäure versetzt (10 ml) und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Nach Filtration über einen Faltenfilter wird die Lösung bei 4 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationen werden photometrisch durch Messung der OD₅₉₅ (LKB Novaspec) bestimmt, wobei ein Aliquot der zu bestimmenden Proteinlösung bzw. eines Proteinextraktes (2 - 20 µl, optimale OD₅₉₅ ca. 0.8 in Plastik-Halbmikroküvetten) in 1 ml Färbelösung gemischt und vermessen wird. Die Probenkonzentrationen können aus einer mit BSA-Standards (3, 6, 9, 12, 18 µg BSA/ml) erstellten Eichkurve ermittelt werden.

3.2.6. Lyophilisieren und Lagern von Peptiden

HPLC-gereinigte Peptide werden fraktionsweise über Nacht bei -80 °C tiefgefroren. Die Peptide werden daraufhin in einem Lyophilisator (Christ Alpha 2-4) überführt und unter Vakuum (0.05 bar) bei -53 °C gefriergetrocknet. Nach der vollständigen Trocknung wird jede Peptidfraktion in 500 µl Wasser aufgenommen und die Peptidkonzentration bestimmt. Die abschließende Lagerung der Peptidlösungen erfolgt bei -20 °C.

3.2.7. Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen und Peptiden

3.2.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

[141]

AA/BAA:	30 % Acrylamid 0.8 % N,N'-Methylenbisacrylamid Lösung nach Filtration bei 4 °C lagern
4 × Lower-Tris:	1.5 M Tris-HCl pH 8.8 0.4 % SDS
4 × Upper-Tris:	0.5 M Tris-HCl pH 6.8 0.4 % SDS
TEMED	
40 % APS	
87 % Glycerin	
SDS-Pobenpuffer:	62.5 mM Tris/HCl pH 6.8 2 % SDS 20 % Glycerin (87 %) 1 ‰ BPB (für reduzierenden Probenpuffer wird 5 % β-Mercaptoethanol zugegeben)
Coomassie-Färbelösung:	0.25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in Entfärbelösung
Entfärbelösung:	1 Vol. Essigsäure (100 %) 1 Vol. Methanol 8 Vol. H ₂ O

In denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt in dem Vertikal-Gelelektrophorese System Mini-V 8.10 (Gibco BRL). Für ein SDS-Gel (Schichtdicke 0.75 mm) werden folgende Lösungen benötigt:

	Sammelgel	7.5 % Trenngel	9 % Trenngel
AA/BAA	0.5 ml	1.25 ml	1.5 ml
4 × Lower Tris		1.25 ml	1.25 ml
4 × Upper-Tris	1.25 ml		
H ₂ O	3.2 ml	1.5 ml	1.25 ml
87 % Glycerin		1 ml	1 ml
TEMED	12 µl	4.5 µl	5.5 µl
40 % APS	12 µl	4.5 µl	5.5 µl

Tab. 3-3 Pipettierschema für denaturierende SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli

Die Proteinproben werden vor dem Auftragen in einem geeigneten Verhältnis mit SDS-Probenpuffer gemischt und zur vollständigen Denaturierung und Reduktion der Proteine 5 min bei 95 °C inkubiert. Zur Fokussierung der Banden läßt man die Proteine bei 100 V ins Sammelgel einlaufen und erhöht, nachdem die Proteine ins Trenngel eingelaufen sind, die Spannung auf 150 V.

Nach Abschluß des Laufs wird das Gel 30 min in Coomassie Färbelösung geschwenkt und anschließend entfärbt, oder die Proteine werden zur Immundetektion auf Nitrocellulosemembranen geblottet (siehe 3.3.3). Mit Coomassie angefärbte Gele werden zur Aufbewahrung getrocknet, d.h. das Gel wird 1 h in einer 30 %igen Methanol-Lösung geschüttelt und anschließend zwischen zwei Cellophanfolien in einem Spannrahmen getrocknet.

3.2.7.2. Protein-Größenstandards

Protein	Molekulargewicht		
	LM-Standard	HM-Standard	SDS 7B-Standard
Myosin		200 000 Da	
α_2 -Macroglobulin			180 000 Da
β -Galactosidase		116 000 Da	116 000 Da
Phosphorylase B	94 000 Da	94 000 Da	
Fructose-6-phosphatKinase			84 000 Da
Ovotransferrin		78 000 Da	
Albumin	67 000 Da		
PyruvatKinase			58 000 Da
GlutamatDehydrogenase		56 000 Da	
Fumarase			48 500 Da
Ovalbumin	43 000 Da	43 000 Da	
LactatDehydrogenase			36 500 Da
Carboanhydrase	30 000 Da		
TriosephosphatIsomerase			26 600 Da
Trypsin-Inhibitor	20 100 Da		
Lactalbumin	14 400 Da		

Tab. 3-4 Größenstandards für Proteingele

3.2.7.3. Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

[142]

AA/BAA Lösung 1:

48 g Acrylamid

1.5 g N,N'-Methylenbisacrylamid

ad 100 ml H₂O

Lösung nach Filtration bei 4 °C lagern

AA/BAA Lösung 2:	46.5 g Acrylamid 3 g N,N'-Methylenbisacrylamid ad 100 ml H ₂ O Lösung nach Filtration bei 4 °C lagern
Gelpuffer:	3 M Tris-HCl; pH 8.45 0.3 % SDS
Laufpuffer:	1 M Tris 1 M Tricin 1 % SDS

Um die Effizienz und die Ausbeute der Kopplung des Antennapediapeptids mit den Cargo-Peptiden abschätzen zu können, werden die Kopplungsansätze und HPLC-Fraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (siehe 3.2.6.1.) ist jedoch ungeeignet um Oligopeptide und Proteine mit Molekulargewichten von 1 bis 10 kDa aufzutrennen. Für Moleküle in dieser Größenordnung wird ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid Gelelektrophoresesystem verwendet, bei dem zwischen Sammel- und Trenngel ein zusätzliches Spacergel eingefügt ist. Als Trailing-Ion wird Tricin anstatt von Glycin verwendet, was eine bessere Auftrennung bei geringerer Acrylamidkonzentration ermöglicht. Zusätzlich enthält das Trenngel 6 M Harnstoff, wodurch die Auflösung des Gels für Peptide mit einem Molekulargewicht unter 5 kDa weiter verbessert wird [143].

Die Elektrophorese erfolgt in dem Vertikal-Gelelektrophorese System Mini-V 8.10 (Gibco BRL). Für ein SDS-Gel (Schichtdicke 0.75 mm) werden folgende Lösungen benötigt:

	Sammelgel	Spacergel	Trenngel
AA/BAA Lösung 1	0.5 ml	1 ml	
AA/BAA Lösung 2			1.7 ml
Gelpuffer	1.5 ml	1.7 ml	1.7 ml
Harnstoff			1.8 g
H ₂ O	4.3 ml	2.3 ml	500 µl
TEMED	12.5 µl	4.2 µl	4.2 µl
APS (40 %)	5 µl	1.7 µl	1.7 µl

Tab. 3-5 Pipettierschema für denaturierende Tricin SDS-Polyacrylamidgele

Sammel-, Spacer- und Trenngel sollten je 1/3 der Gelfäche einnehmen. Trenn- und Spacergel werden kurz nacheinander gegossen und mit H₂O überschichtet. Nach der Polymerisation wird der Wasserüberstand abgezogen und schließlich das Sammelgel gegossen.

Die Peptidproben werden vor dem Auftragen auf das Gel in einem geeigneten Verhältnis mit reduzierendem oder nicht reduzierendem SDS-Probenpuffer gemischt und 30 min bei 40 °C inkubiert. Man läßt die Peptide dann bei 50 V ins Sammelgel einlaufen und erhöht die Spannung nach dem Eintritt der Lauffront ins Spacergel auf 110 V. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel mit Coomassie-Färbelösung angefärbt und anschließend entfärbt und getrocknet (siehe 3.2.6.1).

3.2.8. Jodierung von Interleukin-4

[65,144]

PBS, pH 7.4

IODOGEN [1,3,4,6-Tetrachloro-3a,6a-diphenylglycouril] (Pierce)

Chloroform

Na¹²⁵I

0.1 mg/ml Tyrosin

P6DG

10 mg/ml BSA in PBS

4 mg IODOGEN werden in 50 ml Chloroform gelöst. Von dieser Lösung werden 120 µl in Glasröhrchen (AR-Klarglas-Kulturröhrchen mit rundem Boden und Gewinde; 100×12/1.0 mm; Brand) überführt und das Lösungsmittel im Heliumstrom so verdunstet, dass am Boden des Röhrchens eine gleichmässige Beschichtung mit IODOGEN zurück bleibt. Die Röhrchen werden bei -80 °C gelagert und sind verschlossen einige Monate verwendbar.

Lyophilisiertes mL-4, mL-13 bzw. mL-4 Variante Q116D/Y119D (QY) wird in Wasser aufgenommen. Der pH der Lösung wird langsam auf 7.4 eingestellt.

Je 10 µg der Cytokine wird in ein IODOGEN-Röhrchen überführt, mit 0.5 mCi Na¹²⁵I versetzt, mit PBS auf 100 µl ergänzt und 30 min bei RT leicht geschüttelt. Zum Abbrechen der Reaktion wird dem Ansatz für 3 min 10 µl 0.1 mg/ml Tyrosin-Lösung zugesetzt, um nicht an die Interleukine gebundenes Jod abzufangen. Die Abtrennung freien Jods erfolgt durch Grössenausschluss-Chromatographie über P6DG-Säulen-Material. Das Material wird über Nacht in PBS/0.1 % NaN₃ gequollen. Eine 10 ml Einwegpipette wird mit 10 ml Säulenmaterial gefüllt, mit 5 ml 10 mg/ml BSA in PBS äquilibriert und ungebundenes BSA mit 15 ml PBS ausgewaschen. Der Jodierungsansatz wird nun auf die Säule aufgetragen. Das markierte mL-4, mL-13 bzw. QY wird mit PBS von der Säule eluiert und in 500 µl Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die Reaktionsgefäße werden zuvor mit 2 % BSA in PBS abgesättigt. 2 µl Aliquots der Fraktionen werden im Gamma-Zähler (Beckmann Gamma 4000) ausgezählt. Von den Fraktionen mit der höchsten Aktivität werden Aliquots von 50000 cpm auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach Abschluß des Laufs wird das Gel 5 h im Gelrockner (SLAB Dreyer 483, BioRAD) unter Vakuum getrocknet und danach über Nacht in einer Phosphormager-Kassette exponiert. Die Fraktionen, in denen sich IL-4 befindet werden vereinigt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die markierten Proteine sind 2 bis 3 Wochen verwendbar.

3.2.9. Crosslinking von Proteinen

BS³ (Pierce)

¹²⁵I-mIL-4

¹²⁵I-mIL-13

¹²⁵I-mQY

Lysis-Puffer: 50 mM Hepes, pH 7.1
 150 mM NaCl
 1.5 mM MgCl₂
 10 mM Na₂P₂O₇
 5 mM EDTA
 1.5 % Triton X-100
 10 % Glycerin
 1 mM Na₃VO₄
 100 mM NaF
 100 μM Pefabloc
 100 μM Antipain
 10 μM Pepstatin

Bindemedium: 2 % BSA in RPMI

PBS, pH 7.4

Um eine Aussage treffen zu können welche Rezeptoren für einen Liganden zur Verfügung stehen, wird ein Crosslinking auf Zellen durchgeführt. Hierzu werden die in 500 μl Bindemedium aufgenommen isolierten Milzzellen einer Maus (ca. 3×10^7 Zellen) (siehe 3.1.7.) mit 2 nM ¹²⁵I-mIL-4, ¹²⁵I-mIL-13 oder ¹²⁵I-mQY unter Rotation für 1 h bei 4 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wird eine Lösung des Crosslinkers bei RT frisch angesetzt (3 mg BS³ / 100 μl DMSO) und dann mit PBS auf 2 mM Endkonzentration eingestellt. Die mit den markierten Proteinen inkubierten Zellen werden dann zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in 250 μl PBS aufgenommen. Diese Zellsuspension wird danach tropfenweise mit dem gleichen Volumen an Crosslinkerlösung versetzt. Nach 10 min Inkubation gibt man noch einmal die gleiche Menge an Crosslinker zu. Die Reaktion wird nach 20 min durch Zugabe von 10 μl 2 M Tris-HCl abgestoppt. Die Zellen werden dann einmal

mit PBS gewaschen und schließlich in 500 µl Lysispuffer aufgenommen. Im Anschluß daran wird mit dem Zellysat eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Gel wird danach im Vakuum getrocknet und die Radioaktivität mit einer Phosphormager-Kassette detektiert.

3.3. Immunologische Methoden

3.3.1. Zellyse

3.3.1.1. Gesamtzellysate für die SDS-Gelelektrophorese

2 × SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 6.8
 4 % SDS
 52 mM DTT
 20 % Glycerin
 0.1 % BPB

Benzonase (Merck)

Die Zellen werden in RFP mit oder ohne Wachstumsfaktoren inkubiert, pelletiert und in 2 × SDS-Probenpuffer aufgenommen (max. 1×10^8 Zellen/ml) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 - 3 % Benzonase werden die Proben 15 min bei RT geschüttelt und im Anschluß daran 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben können dann bei -20 °C kurzzeitig gelagert werden oder sofort durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot weiter analysiert werden.

3.3.1.2. Zellysate zur Immunpräzipitation

NP-40 Lysispuffer:	25 mM Tris, pH 7.5
	140 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0.5 % Nonidet P-40
	1 mM Na ₃ VO ₄

Dem milden Lysispuffer [145] wird kurz vor Verwendung noch Complete[®] Protease Inhibitor Cocktail (Roche) zugegeben. Hierbei werden die Angaben des Herstellers beachtet.

Die Zellen werden die angegebenen Zeiten in RFP mit oder ohne Wachstumsfaktoren im Brutschrank bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert, pelletiert und in eiskaltem Lysispuffer (max. 1 × 10⁸ Zellen/ml) aufgenommen. Die Zellysate können bei -80 °C für maximal 6 Monate bis zur Weiterverarbeitung gelagert werden.

3.3.2. Immunpräzipitation

Waschpuffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8.0
	0.5 M LiCl

SDS-Probenpuffer

Die Aufarbeitung der Lysate und die Immunpräzipitation erfolgen bei 4 °C. Alle Zellysate werden ca. 30 min unter kontinuierlicher Rotation inkubiert, danach werden die unlöslichen Bestandteile bei 10000 × g (15 min) abzentrifugiert. Die klaren Überstände werden wiederum unter Rotieren mit den Präzipitationsantikörpern inkubiert (2 - 14 h, 4 °C) und die Immunkomplexe für 1 h mit Protein A/G-Sepharose (Santa Cruz) gebunden.

Die Immunpräzipitate werden danach zweimal mit Lysispuffer und zweimal mit Waschpuffer gewaschen, in SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C

inkubiert und dann mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese und Westernblot weiter untersucht.

3.3.2.1. Pulldown-Immunpräzipitation

PBS

SDS-Probenpuffer

Ob phosphorylierte Peptide bei längerer Lagerung dephosphorylieren, kann durch eine Pulldown-Immunpräzipitation überprüft werden. Dabei werden 400 ng Peptid in 80 µl PBS mit 1 µg anti-Phosphotyrosin (4G10) Antikörper und 20 µl Protein-A/G-Agarose ü.N. bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Die Immunkomplexe werden dann bei $10000 \times g$ (10 min) abzentrifugiert und 10 µl des klaren Überstandes durch Tricin-SDS-Gelelektrophorese analysiert. Liegt das zu überprüfende Peptid noch in der phosphorylierten Form vor, so läßt es sich durch die Pulldown-Immunpräzipitation quantitativ aus der Lösung entfernen, so dass die Peptidkonzentration unter die Nachweisgrenze einer Coomassie-Färbung sinkt.

3.3.3. Western Blot

[146]

Blot Puffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8.3
 192 mM Glycin
 20 % (v/v) Methanol

Beim Western Blot wird das gesamte Bandenmuster eines Proteingels auf Nitrocellulosefolie (Schleicher & Schüll BA 85) übertragen. Die Nitrocellulosefolie wird mindestens 10 min in Blot Puffer äquilibriert und anschließend zusammen mit dem Polyacrylamidgel zwischen zwei Whatman-Filtern in die Blot Kammer eingespannt, deren Tank mit Blot Puffer gefüllt ist. Es dürfen hierbei keine

Luftblasen zwischen Gel und Nitrocellulose auftreten. Der Transfer erfolgt von der Kathode zur Anode bei 160 V für 70 min.

Nach dem Transfer wird das Sandwich entnommen; das Gel kann zur Kontrolle, ob der Transfer quantitativ erfolgte, mit Coomassie Blue nachgefärbt werden. Die Proteine auf der Membran können danach auf verschiedene Weise nachgewiesen werden.

3.3.4. Amidoschwarz Anfärbung

Färbelösung:	0.1 % (w/v) Amidoschwarz in
	50 % Methanol
	10 % Essigsäure (100 %)
	40 % H ₂ O
Entfärber:	10 % Essigsäure (100 %)
	10 % Methanol
	80 % H ₂ O

Zum Nachweis aller Proteine auf der Nitrocellulose-Membran kann eine Anfärbung mit Amidoschwarz vorgenommen werden. Die Nitrocellulose-Folie wird für 10 min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend nicht gebundenes Amidoschwarz durch Schwenken im Entfärber herausgewaschen. Die gefärbten Membranen werden entweder mit Wasser gewaschen und getrocknet oder in Folie eingeschweisst. So behandelte Membranen können keiner anderen Färbung mehr unterzogen werden.

3.3.5. Immunanfärbung und Detektion

TBST:	100 mM Tris-HCl, pH 7.5
	100 mM NaCl
	2 mM MgCl ₂
	0.05 % (v/v) Tween 20

Block Puffer A:	TBST 5 % (w/v) Milchpulver
Block Puffer B:	TBST 3 % (w/v) BSA
Primärantikörper:	0.1 - 5 µg/ml in Block Puffer A oder B
Sekundärantikörper:	1:200 - 1:20000 in Block Puffer A

Die Western Blot Membran wird 1 bis 2 h auf einem Schüttler bei RT in Block Puffer A geblockt. Nach Entfernen dieses Puffers wird die Primärantikörper-Lösung auf die Membran gegeben und 2 h bei RT inkubiert. Richtet sich der Erstantikörper gegen Phospho-Tyrosinreste wird er in Block Puffer B angesetzt, in allen anderen Fällen in Block Puffer A. Der Blot wird dann dreimal mit TBST gewaschen. Wird der Peroxidase gekoppelte Primärantikörper verwendet, wird die Nitrocellulose-Membran jetzt detektiert. Im Falle eines ungekoppelten primären Antikörpers wird noch 1 h mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert, dann wiederum 3×5 min mit TBST gewaschen und dann detektiert.

3.3.5.1. Luminoldetektion

[147]

Luminol-Lösung:	100 mM Tris-HCl, pH 8.5 2.5 mM Luminol 1 % (v/v) DMSO 50 mM p-Cumarsäure als Enhancer
H ₂ O ₂ -Lösung:	100 mM Tris-HCl, pH 8.5 0.5 % (v/v) 30 %ige H ₂ O ₂

Die Blot-Membran wird 1 - 2 min in einem 1 : 1 Gemisch aus Luminol-Lösung und H₂O₂-Lösung geschwenkt. Im Anschluß daran läßt man die Membran kurz abtropfen, trocknet diese kurz auf Filterpapier und legt die Nitrocellulose zwischen Klarsichtfolie. In einer Autoradiographie-Kassette werden die Filme je nach Lumineszenz-Intensität zwischen 1 s und 1 h belichtet.

3.3.6. Ablösen der Detektionsantikörper von Nitrocellulosemembranen

Strip-Puffer A:	100 mM Glycin; pH 2.9
Strip-Puffer B:	62.5 mM Tris-HCl; pH 8.5
	100 mM β -Mercaptoethanol
	2 % SDS

Zum Entfernen des anti-Phosphotyrosin Antikörpers RC-20 und des anti-PhosphoStat6 Antikörpers werden die Membranen für 20 min bei RT in Strip-Puffer A inkubiert und anschließend dreimal 5 min mit TBST gewaschen.

Alle anderen benutzten Antikörper werden mit Strip-Puffer B innerhalb von 25 min bei 55 °C abgelöst. Die Blotmembran wird dann fünfmal für 5 min mit TBST gewaschen, um das SDS möglichst vollständig zu entfernen.

Die Nitrocellulosemembranen können jetzt erneut geblockt und detektiert werden.

3.3.7. Immunfluoreszenzmikroskopie

[115,148]

PBS

Fixier-Lösung 1: 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS

Fixier-Lösung 2: 95 Vol. Ethanol
5 Vol. Eisessig
(bei -20 °C lagern)

Detektions-Puffer: 10 % (v/v) NCS in PBS

Mowiol-Einbettmedium (siehe 3.3.7.1.)

Der Transport der hemmenden Peptide in lebende Zellen mit Hilfe des Antennapediaptids kann durch Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Dazu wird ein mit dem Antennapediaptid gekoppeltes Stat6-BP verwendet, das N-terminal mit Biotin markiert ist (AP/Biotin-Stat6BP).

In einer 6-well Mikrotiterplatte wird in jede Kavität ein steriles Deckglas (in 100 % Ethanol waschen und dann kurz abflammen) gelegt. In jedes well werden dann 10^6 Caki-1 Zellen in 2 ml RFP-Medium ausgesät und unter Standardbedingungen so lange kultiviert, bis das Deckglas nahezu konfluent mit Zellen bewachsen ist. Die Deckgläser werden dann in eine neue 6-well Mikrotiterplatte überführt. Sollen die Zellkerne angefärbt werden, werden die Zellen nun für 20 min mit Hoechst33342 (0.1 µg/ml in RFP, Sigma), einem fluoreszierendem Farbstoff, der in die zelluläre DNA interkaliert, bei 37 °C und 6 % CO₂ inkubiert und danach 2 × 5 min mit RFP-Medium gewaschen. Anschließend wird in jede Kavität 2 ml RFP-Medium mit 10 µM Biotin-Stat6-BP/AP und Protease-Inhibitoren (0.5 mM Pefabloc, 0.5 mM Leupeptin und 1 mM Antipain) pipettiert. Die Zellen werden dann wiederum für 20 min unter Standardbedingungen inkubiert und im Anschluß 3 × 5 min mit RFP-Medium gewaschen. Nun werden die Zellen für 5 min bei RT mit Fixier-Lösung 1 und sofort im Anschluß für 5 min bei -20 °C mit Fixier-Lösung 2 fixiert. Die Deckgläser werden jetzt 3 × 5 min mit PBS gewaschen und 30 min bei RT mit FITC-Streptavidin (Pierce) 1 : 1000 verdünnt in Detektions-Puffer inkubiert. Im Anschluß daran werden die Zellen 3 × 5 min mit PBS und 1 × 5 min mit H₂O gewaschen, die Deckgläser dann an der Luft getrocknet und schließlich mit Mowiol-Einbettmedium auf Objektträgern eingedeckt.

Am darauffolgenden Tag, wenn das Einbettmedium vollständig getrocknet ist, werden die Zellen mit einem DM IRB Fluoreszenzmikroskop (Leica) analysiert.

3.3.7.1. Herstellung des Mowiol-Einbettmediums

Tris-Puffer : 200 mM Tris-HCl, pH 8.5

Thimerosal-Lösung: 1 % (w/v) Natriumethylmercurithiosalicylat in H₂O

2.4 g Mowiol 4.88 werden mit 6 ml H₂O und 6 g Glycerin zusammengegeben und für 2 h bei RT unter vorsichtigem Rühren inkubiert. Nun werden 12 ml Tris-Puffer und 230 µl Thimerosal-Lösung hinzugegeben. Das Einbettmedium wird dann unter Rühren für 10 min bei 50 °C inkubiert und danach kurz auf Eis bis auf RT abgekühlt. Der letzte Schritt wird so häufig wiederholt, bis das meiste Mowiol

4.88 in Lösung ist. Nicht gelöstes Mowiol 4.88 wird nun durch Zentrifugation für 15 min bei $5000 \times g$ aus der Lösung entfernt. Die Lagerung erfolgt in Glasröhrchen in 2 ml Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das Einbettmedium ist so für ca. 1 Jahr stabil und sollte nicht mehr verwendet werden, sobald sich Kristalle im gelagerten Medium bilden.

3.3.8. In vitro Kinase Assay

PBS/EDTA:	PBS 100 μM EDTA 100 μM Na_3VO_4
RIPA-Puffer:	10 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, pH 7.0 150 mM NaCl 1 mM DTT 1 % (v/v) NP-40 0.1 % (w/v) SDS 1 % (w/v) Na-desoxycholat 1 % (w/v) Aprotinin 1 % (w/v) PMSF
Kinase-Puffer:	20 mM Hepes, pH 7.5 10 mM MnCl_2 1 mM DTT 0.1 % NP-40
^{32}P - γATP	
Kinase-Mix:	Kinase-Puffer 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ^{32}P - γATP 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ denaturierte Enolase (Enolase mit 50 mM Essigsäure 1:1 verdünnt, Denaturierung 10 min bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, Neutralisation mit 1 M Hepes, pH 8.0)

Werden Zellen mit Cytokinen oder Wachstumsfaktoren stimuliert, läßt sich die Aktivierung von Proteintyrosinkinasen mit Hilfe eines in vitro Kinase Assays nachweisen. Hierbei wird die Aktivierung anhand der Autophosphorylierung und der Phosphorylierung des exogenen Substrates Enolase analysiert.

Nach der Stimulierung der Zellen (10 min bei 37 °C) werden diese dreimal mit PBS/EDTA gewaschen. Je Ansatz werden dabei 4×10^7 Zellen verwendet. Die Zellen werden in einer Tischzentrifuge (Heraeus, Bactifuge) jeweils 3 min bei $2000 \times g$ abzentrifugiert. Das Zellsediment wird danach in eiskaltem RIPA-Puffer aufgenommen und 15 min auf Eis lysiert. Zelltrümmer werden dann 1 h bei $13000 \times g$ und 4 °C abzentrifugiert. Die aktivierten Kinasen werden anschließend mit spezifischen Antikörpern über Nacht bei 4 °C immunpräzipitiert.

Das Immunpräzipitat wird vorsichtig dreimal mit RIPA-Puffer und zweimal mit Kinase-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird der Überstand mit einer Eppendorf-Pipette vollständig entfernt. Danach werden pro Ansatz 20 µl Kinase-Mix zugesetzt und der Reaktionsansatz 10 min bei 30 °C, unter gelegentlichem Schütteln, inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 µl SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95 °C abgestoppt. Im Anschluß daran werden die Proben einer Gelelektrophorese in einem 9 %igen Gel unterzogen, das Gel in einem Geltrockner (SLAB Dreyer 483, BioRAD) unter Vakuum getrocknet und die Kinaseaktivität mittels des Phosphorimagers quantifiziert.