

## 4. MATERIAL

### 4.1 Geräte

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>	<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
Analysenwaage	Sartorius	Mikrowelle	Siemens
Autoklav	Webeco	Netzgeräte	Bio-Rad
Blottingkammer	Hoefler	Orbitalschüttler	Bellco Biotechnology
Brutschränke	Memmert	PCR Gerät	Perkin Elmer
Computer	Vobis	pH-Meter	WTW
Eismaschine	Scotsman	Phospho-Imager	Fuji
Elektrophorese- kammern	Institutswerkstatt, Eurogentec, Bio-Rad	BAS 2000	
Exponierkassetten	Dr. Goos-Suprema	Photometer	Hitachi
Feinwaage	Mettler	Pipetten	Roth, Eppendorf
Filmentwickler	Kodak	Schüttelwasserbad	New Brunswick Scientific
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr	Sequencer	ABI PRISM 377
Gefrierschrank -80 °C	Nunc	Sterilbank	Heraeus
Gewebekulturschrank	Heraeus	Tischzentrifuge	Eppendorf
Grobwaage	Satorius	Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
Heizblöcke	Gebr. Liebisch	UV-Crosslinker	Hoefler
Hybridisierungsöfen	MWG-Biotech	UV-Fotoanlage	Herolab, Kaiser, Sony
Kühlschrank	Liebherr	Vibrax VX2	Janke und Kinkel
Kühlzentrifuge	Heraeus	Vortex-Gerät	Scientific Industries
Luftschüttler	New Brunswick Scientific	Wasserbad	GFL
Magnetrührer	GLW	Wecker	Roth
Microlumat LB96P	EG&G Berthold	Zählkammer	Neubauer (improved)
Mikroskop	Leica	Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0R, J2-HS Beckmann

## 4.2 Chemikalien, Enzyme, Antikörper

### 4.2.1 Chemikalien

Artikel	Firma	Artikel	Firma
Aceton	Merck	Giemsa stain	Sigma
Acrylamid/Bisacrylamid, 40 %	Bio-Rad	D (+)-Glucose- Monohydrat	Merck
Adenin	Sigma	L-Glutamin	Gibco-BRL
Bacto-Agar	Difco	Glycerol	Sigma
Agarose, ultra pure	Gibco-BRL	$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma
Ammoniumacetat	Merck	Glycin	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Fluka	Hefe-Extrakt	Gibco-BRL
Ampicillin	Sigma	Hefe-Stickstoff (Basis) ohne Aminosäuren	GibcoBRL
Anisomycin	Sigma	HEPES	Sigma
Aprotinin	Roth	L-Histidin	Sigma
L-Arginin	Sigma	IPL 41-Insect Medium	Gibco-BRL
Arsenit	Sigma	L-Isoleucin	Sigma
ATP	Sigma	Kaliumacetat	Merck
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$	Amersham	Kaliumchlorid	Sigma
Benzamidin	Sigma	Kaliumhydrogenphosphat	Merck
BES	Sigma	Kaliumhydroxid	Merck
Borsäure	Sigma	Lachssperma-DNA	Sigma
Bromphenol Blau	Sigma	LB-Broth Base	Sigma
Calciumchlorid	Sigma	L-Leucin	Sigma
Chloroform	Merck	Lipofektamine <sup>TM</sup> Reagent	Gibco-BRL
Desoxycholat	Sigma	Lithiumacetat	Sigma
DMSO	Sigma	Lithiumchlorid	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma	Luciferin	Sigma
DMF	Sigma	L-Lysin	Sigma
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco-BRL	Magnesiumacetat	Sigma
EDTA	Sigma	Magnesiumchlorid	Sigma
EGTA	Sigma	Magnesiumsulfat	Merck
Eisessig	Sigma	Manganchlorid	Sigma
Essigsäure	Applichem	$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Ethanol, abs.	J.T. Baker	MES	Sigma
Ethidiumbromid	Gibco-BRL	Methanol	Rühl AG
Fettfreie Trockenmilch	Nestlé	L-Methionin	Sigma
Fötales Kälberserum	PAN Systems	Natriumacetat	Sigma

<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>	<b>Artikel</b>	<b>Firma</b>
Natriumchlorid	Sigma	Ponceau S	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat	Merck	2-Propanol	Merck
Natriumfluorid	Sigma	Protein A-Agarose	Boehringer
Natriumhydrogenphosphat	Merck	Protein G-Agarose	Boehringer
Natriumhydroxid	Sigma	RPMI 1640	Gibco-BRL
Natrium Orthovanadat (Na-O-V)	Sigma	Saccharose	Merck
Natrium Pyrophosphat	Sigma	Salzsäure, rauchend	Merck
NGF	Sigma	SDS ultra pure	Roth
Nonidet P40 (NP40) [ICEPAL CA-630]	Sigma	SeaPlaque <sup>®</sup> GTG <sup>®</sup> agarose	FMC BioProducts
dNTP	MBI	Select Agar	Gibco-BRL
PBS	Gibco-BRL	TB-Broth	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Gibco-BRL	TEMED	Sigma
Bacto-Pepton	Difco	L-Threonin	Sigma
Pferdeserum	Gibco-BRL	TPA	Sigma
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	ApliChem	Tris Base	Sigma
L-Phenylalanin	Sigma	Triton X-100	Sigma
Pipes	Sigma	Trizma Hydrochlorid	Sigma
Pleuronic	Gibco-BRL	Trypan Blau	Sigma
PMSF	Fluka	Trypsin/EDTA	Gibco-BRL
Polybrene (Sequa-Brene <sup>TM</sup> )	Sigma	Bacto-Trypton	Gibco-BRL
Polyethylenglykol 4000 (PEG)	Roth	L-Tryptophan	Sigma
		Tryptose	Gibco-BRL
		Tyrosin	Sigma
		Tween 20	Sigma
		Uracil	Sigma
		X-Gal	MBI

## 4.2.2 Enzyme

### 4.2.2.1 Restriktionsenzyme

MBI-Fermentas:      ApaI, BamHI, BglII, EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, NotI, PstI, SacI, SalI, SmaI, StuI, XbaI, XhoI

### 4.2.2.2 Sonstige Enzyme

Enzym	Firma
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	Biolabs
Klenow Fragment	Biolabs
RNAse A	Sigma
Taq-Polymerase	Stratagene
T4-DNA-Ligase	MBI-Fermentas
T4-DNA-Polymerase	MBI-Fermentas

### 4.2.3 Molekulargewichtsmarker

#### 4.2.3.1 Molekulargewichtsmarker für Proteine

**Prestained Molecular Weight Standard Mixture** (Sigma)  
(gefärbtes Molekulargewichts-Standard Gemisch)

Markerproteine:	$\alpha_2$ -Makroglobulin	180 kDa	(190 kDa)
	$\beta$ -Galaktosidase	116 kDa	(125 kDa)
	Fructose-6-phosphat Kinase	84 kDa	(88 kDa)
	Pyruvat Kinase	58 kDa	(65 kDa)
	Fumarase	48,5 kDa	(56 kDa)
	Laktatdehydrogenase	36,5 kDa	(38 kDa)
	Triosephosphatisomerase	26,6 kDa	(33,5 kDa)

In Klammern ist das Wanderungsverhalten der Markermoleküle angegeben.

#### 4.2.3.2 Molekulargewichtsmarker für DNA

**1 kb Ladder** (Gibco-BRL)

Fragmentgrößen (bp): 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

### 4.2.4 Reagenziensätze (Kits)

Kit	Firma
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Boehringer Mannheim
BacPak-Baculo Transfection Kit	Clontech
DC Protein Assay	Bio Rad
ECL Western Blotting Detection	Amersham
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Plasmid Mini Kit	QIAGEN
QIAex II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAshredder	QIAGEN
Quick Change <sup>TM</sup> Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
RNeasy Mini-Kit	QIAGEN

## 4.2.5 Antikörper

### **Cot AS500**

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper ist gegen 18 N-terminale Aminosäuren (Aminosäure 5-23) von Cot gerichtet. Er wurde 1:500 verdünnt, bevor er im Western-Blot zum Einsatz kam.

Quelle: Jun Myoshi

### **Cot (C20)**

Der polyklonale Ziegen-Antikörper Cot (C-20) erkennt den Carboxyterminus des Proteins und wurde im Western-Blot 1:500 verdünnt.

Quelle: Santa Cruz

### **Tpl-2 (N-17)**

Gegen den Aminoterminus von Tpl-2 ist der polyklonale Ziegen-Antikörper gerichtet, der im Western-Blot in einer Verdünnung von 1:500 Verwendung fand.

Quelle: Santa Cruz

### **c-Raf-1 (599)**

Gegen die 12 C-terminalen Aminosäuren von c-Raf-1 ist der polyklonale Kaninchen-Antikörper 599 gerichtet. Für den Einsatz im Western-Blot wurde er 1:5000 verdünnt.

Quelle: MSZ

### **HA-Tag**

Als monoklonaler Mausantikörper erkennt 12CA5 mit Hämagglutinin (HA) getaggte Proteine. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in Western-Blots eingesetzt.

Quelle: MSZ

### **ERK 1 (K-23)**

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper ist gegen ein Epitop in Subdomäne XI von ERK-1 gerichtet und wurde 1:500 verdünnt, bevor er im Western-Blot zum Einsatz kam.

Quelle: Santa Cruz

### **p-ERK (E-4)**

Dieser monoklonale Maus-Antikörper ist gegen ein Epitop gerichtet, das einer kurzen Aminosäuresequenz mit dem phosphoryliertem Tyr-201 von ERK-1 entspricht. Er wurde in einer Verdünnung von 1:500 in Western-Blots verwendet.

Quelle: Santa Cruz

### **cJun/AP-1 (N)-G**

Die aminoternale Domäne von c-Jun-p39 wurde verwendet, um diesen polyklonalen Kaninchen-Antikörper zu generieren, der im Western-Blot 1:500 verdünnt eingesetzt wurde.

Quelle: Santa Cruz

### **p-Jun (KM-1)**

Dieser monoklonale Maus-Antikörper erkennt primär das phosphorylierte Serin 73 und kam in einer Verdünnung von 1:500 im Western-Blot zum Einsatz.

Quelle: Santa Cruz

**Hsp90 (H-114)**

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper ist gegen die Aminosäuren 610-723 von Hsp90 $\beta$  gerichtet. Im Western-Blot wurde er in einer Verdünnung von 1:500 verwendet.

Quelle: SantaCruz

**Anti-Ran**

Dieser monoklonale Maus-Antikörper wurde im Western-Blot in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Quelle: Transduction Laboratories

**Ran (C-20)**

Der Ran Antikörper C-20 ist gegen das C-terminale Ende von Ran gerichtet. Es handelt sich um einen polyklonalen Ziegen-Antikörper, der für Western-Blots 1:500 verdünnt wurde.

Quelle: Santa Cruz

**I $\kappa$ B $\alpha$  (C-21)**

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper erkennt den Carboxyterminus von I $\kappa$ B $\alpha$ . Im Western-Blot kam dieser Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 zum Einsatz.

Quelle: Santa Cruz

**Sekundäre Antikörper**

Die verwendeten sekundären Antikörper waren Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Antikörper, die gegen Kaninchen-, Maus oder Ziegen-Antikörper gerichtet sind. Sie wurden in der Western-Blot-Detektion 1:5000 (Ziegen-Antikörper: 1:2000) verdünnt verwendet.

Quelle: Amersham (Kaninchen- und Maus-Antikörper)

Santa Cruz (Ziegen-Antikörper)

## 4.3 Bakterienstämme, Hefestämme, Baculoviren und Plasmide

### 4.3.1 Bakterienstämme

***Escherichia coli*; DH5 $\alpha$** 

- Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> Competent Cells (Gibco BRL)
- SupE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1  
Herkunft: Bethesda Res. Lab. (BRL)
- XL2-blue superkompetente *E.coli* (Stratagene)

### 4.3.2 Hefestämme

***Saccharomyces cerevisiae*; HF7c [63]**

- MATa ura 3-52 his 3-200 ade 2-101 lys 2-801 trp 1-901 leu 2-3, 112 gal 4-542 gal 80-538 LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3 URA3::GAL4<sub>17mers(x3)</sub>-CYC1<sub>TATA</sub>-LacZ  
Herkunft: D. Beach

### 4.3.3 Baculoviren

Es wurden Baculoviren verwendet, die für folgende Proteine codieren:

- CotΔC
- Cotwt
- CotK167L
- c-Raf-1
- BXB
- MEK
- Lck
- H-Ras

Alle Viren stammen aus dem MSZ.

### 4.3.4 Plasmide

#### 4.3.4.1 Eukaryotische Klonierungs- und Expressionsvektoren

##### **pBluescript KS**

Eukaryotischer Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz mit einer Größe von 2,96 kbp  
Quelle: Stratagene

##### **pUC19**

pUC19 ist ein kleiner, high copy number *E.coli*-Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenz und einer Größe von 2686 Basenpaaren.  
Quelle: Pharmacia

##### **pCMV5**

Bei pCMV5 handelt es sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor mit Ampicillin-Resistenz und einem starken CMV-Promotor. Er hat eine Größe von 4,7 kbp.  
Quelle: Melanie Cobb

##### **pCDNA3<sub>neo</sub>**

Dieser eukaryotische Expressionsvektor besitzt einen CMV Promotor und hat eine Größe von 5446 bp.  
Quelle: Invitrogen

##### **pVL 1392, pVL 1393**

Diese Baculovirus-Transfer-Vektoren beinhalten einen Polyhedrin-Promotor und haben eine Größe von 9632 bp. Der Unterschied zwischen pVL1392 und 1393 besteht in der entgegengesetzten Orientierung der multiplen Klonierungsregion.  
Quelle: Pharmingen

##### **pBR ELneo**

Dieser Expressionsvektor besteht aus einem Moloney murine leukemia virus-abgeleiteten (MoMuLV) Retrovirus mit einem Neomycinresistenzgen und einer multiplen Klonierungssequenz (MCS), subkloniert in pBR322. Der Vektor hat eine Größe von 8962 bp.  
Quelle: MSZ

### 4.3.4.2 Hefe Two-Hybrid Plasmide

#### pPC97

Centromerer Two-Hybrid Vektor mit der Sequenz der Gal4-DNA-Bindedomäne vor dem Polylinker, Leucin-Selektionsmarker, Ampicillin-Resistenz (Abb. 8)

Quelle: D.Nathans, Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biology and Genetics, Baltimore

#### pPC86

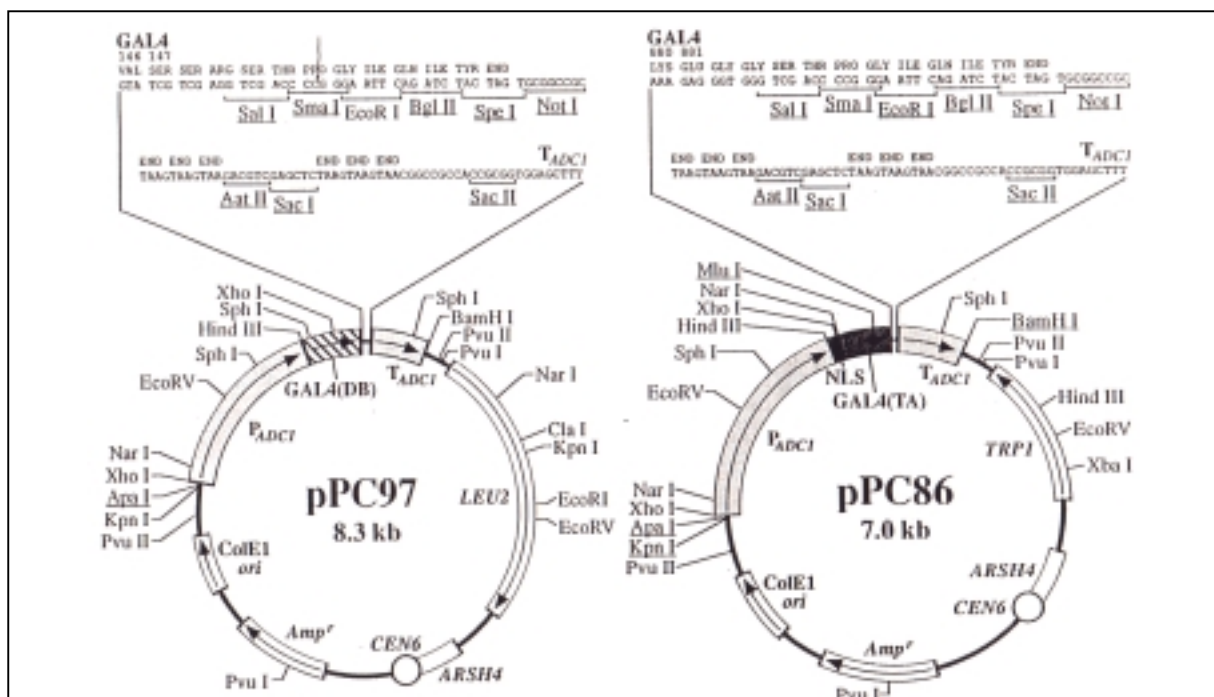
Centromerer Two-Hybrid Vektor mit der Sequenz der Gal4-Aktivierungsdomäne vor dem Polylinker, Tryptophan-Selektionsmarker, Ampicillin-Resistenz (Abb. 8)

Quelle: D.Nathans, Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biology and Genetics, Baltimore

#### pPCH-1

Chimärer Two-Hybrid Vektor aus pPC97 und pPC86, der den Tryptophan-Selektionsmarker von pPC86 trägt und die DB sowie den Polylinker von pPC97. Dieses Bait-Plasmid ist mit kommerziell erhältlichen Prey-Plasmid-Bibliotheken kombinierbar. (Abb. 9)

Quelle: MSZ [83]

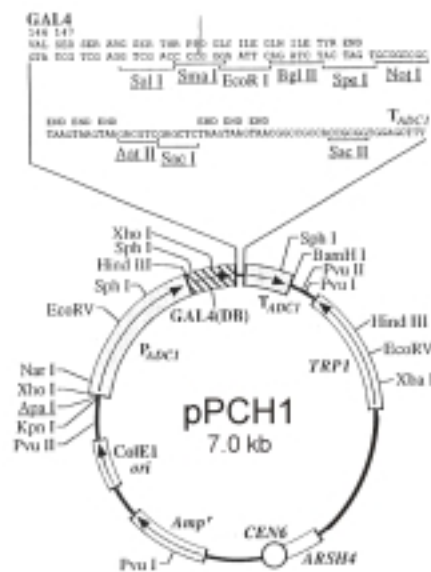


**Abb. 8: Struktur der Gal4-Fusionsvektoren pPC97 und pPC86**

Links: pPC97 codiert die Gal4p-DB, exprimiert von einem starken konstitutiven Promotor ( $P_{ADC1}$ ), gefolgt von einem Polylinker, der mit Terminationscodons (END) in allen drei Leserastern und einem Terminator ( $T_{ADC1}$ ) des Hefe ADC1-Gens endet. Er trägt den LEU2 Hefe-Selektionsmarker.

Rechts: pPC86 codiert die Gal4-TA und trägt den TRP1-Marker. Eine Sequenz, die ein Kern-Lokalisierungssignal (NLS) codiert, ist mit den Gal4-TA-Codons fusioniert, gefolgt von einem Polylinker. Zusätzlich tragen beide Shuttle-Plasmide ein Hefe-Centromer (CEN6), einen Hefe-Replikationsursprung (ARSH4), einen bakteriellen Replikationsursprung (ColE1<sub>ori</sub>) und ein Ampicillin-Resistenzgen (Amp<sup>r</sup>). Die letzten zwei Codons jeder Gal4-Domäne sind angegeben, wie auch der Beginn der ADC1-Terminationssequenzen. Restriktionsenzyme, die in jedem der Plasmide nur einmal schneiden, sind unterstrichen.





**Abb. 9: pPCH1-Vektor**

Der pPCH1 Two-Hybrid Vektor ist eine Chimäre aus pPC97 und pPC86, die den Tryptophan-Selektionsmarker von pPC86 trägt und die DB sowie den Polylinker von pPC97. Dadurch entstand ein Bait-Plasmid, das mit den kommerziell erhältlichen Prey-Plasmide-Bibliotheken kombinierbar ist.

#### 4.3.4.3 Säuger-Expressions-Konstrukte

Es wurden folgende bestehende Expressionskonstrukte verwendet:

- BXB-pCDNA3 verkürztes, aktives c-Raf-1, Kinasedomäne
- c-Raf-1-pCDNA3 c-Raf-1, vollständiger Klon
- c-Raf-C4B-RSV dominant negatives c-Raf-1, N-terminale regulatorische Domäne
- EHneo v-gag-Raf-1
- ERKB3-MC dominant negative ERK, K52 →R
- ERKC3-KRSPA dominant negative ERK, Y185 →F
- HA-c-Raf-BXB-KRSPA Ha-getaggttes aktives c-Raf-1
- HA-c-Raf-1-pCDNA3 Ha-getaggttes c-Raf-1, vollständiger Klon
- IκBα DN-CMV dominant negatives IκBα
- IKKαwt-pCMV wildtyp-Form von IKKα
- leuk Helferviruskonstrukt
- pJJ26 retrovirales onkogenes Cot Konstrukt
- pRK5 Her NA8 (CD533) dominant negativer EGF-Rezeptor (EGFR<sup>-</sup>)
- p38α-flag-KRSPA flag getaggttes p38α
- p44 wildtyp ERK
- SAPKβ-KRSPA wildtyp SAPKβ
- SEK K/R-pEBG dominant negative SEK

Es wurden folgende Reportergergenkonstrukte verwendet:

- 6κB luc                      6-faches NF-κB-Bindemotiv
- pB4x luc                    4 Kopien des ORE (oncogene responsive element), beinhaltet Ets und AP-1 Bindemotive

Alle Konstrukte stammen aus dem MSZ.

Es wurden folgende Expressionskonstrukte hergestellt und in Experimenten verwendet:

#### **Cotwt-pCMV5**

Cotwt wurde EcoRI aus Cotwt-pUC19 (Quelle: Jun Miyoshi) herausgeschnitten und in pCMV5 subkloniert.

#### **CotΔC-pCMV5**

CotΔC wurde EcoRI aus CotΔC-pUC19 (Quelle: Jun Miyoshi) herausgeschnitten und in pCMV5 subkloniert.

#### **CotΔC-K167R-pCMV5**

Diese kinasetote Mutante wurde wie unter [85] beschrieben mit Hilfe des Site Directed Mutagenesis Kits hergestellt.

#### **CotΔCA-pCMV5**

Bei diesem Konstrukt wurde die onkogen-spezifische Sequenz mit Hilfe des Site Directed Mutagenesis Kits unter Verwendung des Primers 5'-GAT CAG CCA CGC TAG GCC CCA CC-3' und des entsprechenden Gegenstranges deletiert.

#### **CotΔC-Elneo**

CotΔC wurde über die EcoRI Schnittstelle in Elneo kloniert.

#### **CotΔC-pCDNA3**

CotΔC wurde über die EcoRI Schnittstelle in pcDNA3 kloniert.

#### **Cotwt-pCDNA3**

Cotwt wurde über die EcoRI Schnittstelle in pcDNA3 kloniert.

#### **Ran-pCDNA3**

Ran wurde NcoI/BamHI aus Ran-pET-3d (Quelle: Jörg Becker) herausgeschnitten, mit Hilfe des Klenow Fragments aufgefüllt und in die EcoRI-Stelle in pcDNA3 hineinkloniert, die vorher in blunt end umgewandelt worden war.

#### **RanQ69L-pcDNA3**

Diese dominant negative Mutante wurde mit Hilfe des Site Directed Mutagenesis Kits unter Verwendung des Primers 5'-GGA CAC AGC CGG CCT GGA GAA ATT CGG-3' und des entsprechenden Gegenstranges hergestellt.

#### 4.3.4.4 Hefe Two-Hybrid Konstrukte

##### **Cot $\Delta$ C-pPC86**

Mit Hilfe der Primer 5'-CCT GGA ATT CAA GAT CTA ATG GAG TAC-3' (kodierender Strang, eine EcoRI Schnittstelle einfügend) und 5'-GAA TCA CCG GTT CTC CAT GGT ACC-3' (Gegenstrang) wurde ein N-terminales 230 bp Cot-Fragment in der PCR amplifiziert und EcoRI/KpnI zusammen mit einem 1500 bp KpnI/EcoRI C-terminalen Cot $\Delta$ C-Fragment in einer Tripelligation in frame EcoRI in pPC86 kloniert.

##### **Cotwt-pPC86**

Ein C-terminales 1100 bp Cotwt-Fragment wurde NcoI/NotI aus Cotwt-pVL1393 herausgeschnitten und isoliert. Aus Cot $\Delta$ C-pPC86 wurde ein c-terminales 900 bp Fragment NcoI/NotI entfernt und das isolierte Cotwt Fragment subkloniert.

##### **Cot $\Delta$ C-pPC97**

Cot $\Delta$ C wurde durch Subklonierung eines SmaI/NotI Fragments aus Cot $\Delta$ C-pPC86 in die SmaI/NotI Schnittstellen von pPC97 kloniert.

##### **Cotwt-pPC97**

Cotwt wurde SmaI/NotI aus Cotwt-pPC86 herausgeschnitten und in die gleichen Schnittstellen in pPC97 subkloniert.

##### **Cot $\Delta$ C-pPCH-1**

Cot $\Delta$ C wurde SmaI/NotI aus Cot $\Delta$ C-pPC97 herausgeschnitten und in die gleichen Schnittstellen in pPCH-1 subkloniert.

#### 4.3.5 Two-Hybrid cDNA-Bibliotheken

##### **pPC67**

Poly(dT) geprimte cDNAs aus 14,5 Tage alten CD1 Maus-Embryos wurden über Sall und NotI-Linker in einen Two-Hybrid Vektor als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne kloniert. 0,3-2 kb große Inserts ergeben insgesamt  $2 \times 10^6$  transformierte Kolonien. Das Plasmid enthält einen Tryptophan-Selektionsmarker.

Quelle: D.Nathans, Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Biology and Genetics, Baltimore

##### **Jurkat T-Zell Bibliothek**

Oligo(dT) und random geprimte human leukemia cDNAs aus Jurkat T-Zellen wurden über EcoRI in den Two-Hybrid Library Vektor pGAD10 als Fusion mit der Gal4-Aktivierungsdomäne kloniert. 0,7-7 kb große Inserts ergeben insgesamt  $2 \times 10^6$  transformierte Kolonien. Das Plasmid enthält einen Leucin-Selektionsmarker.

Quelle: Clontech, #HL4015AB

## 4.4 Medien zur Aufzucht von Bakterien und Hefen

### 4.4.1 Bakterienmedien

#### Ampicillin

100 mg/ml Ampicillin wurde in Aqua bidest. gelöst, sterilfiltriert, aliquotiert und eingefroren.

#### LB-Medium

22 g LB Broth wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Sollten LB-Bodenagarplatten gegossen werden, so wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g Select Agar zugegeben. Nach Abkühlen des Mediums auf 50-60 °C wurde 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben.

#### SOC-Medium

2 % (w/v) Bacto Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM MgSO<sub>4</sub> wurden in 980 ml Aqua bidest. gelöst, auf pH 6,7-7,0 eingestellt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden 20 ml einer sterilen 1M Glucose-Lösung zugegeben und vermischt.

#### TB-Medium

47 g TB Broth wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst und autoklaviert. Vor Gebrauch wurde 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben.

#### 2× TY+Amp.-Medium

16g Bacto Trypton, 10 g Hefe-Extrakt und 5 g NaCl wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben. Sollten Platten gegossen werden, wurde vor dem Autoklavieren 15 g Select Agar zugegeben.

### 4.4.2 Hefe-Medien

#### Aminosäure-Dropout-Lösung (100× Stock)

Arginin	0,2 g
Histidin	0,1 g
Isoleucin	0,6 g
Leucin	0,6 g
Lysin	0,4 g
Methionin	0,1 g
Phenylalanin	0,6 g
Threonin	0,5 g
Tryptophan	0,4 g

wurden in 100 ml Aqua bidest. gelöst, sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Die im jeweiligen Dropout nicht benötigten Aminosäuren wurden weggelassen.

#### Glucose

20 % (w/v) Glucose wurde in Aqua bidest. gelöst und autoklaviert.

**Selektionsmedium**

8 g Difco Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 55 mg Tyrosin, 55 mg Uracil und 55 mg Adenin wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst, autoklaviert, auf 50-60 °C abkühlen gelassen und mit 100 ml 20 % Glucose und 10 ml der benötigten Aminosäure-Dropout-Lösung versetzt. Für die Herstellung von Kulturplatten wurde vor dem Autoklavieren 22 g Agar eingewogen.

**Vollmedium (YEPD)**

11 g Hefe-Extrakt, 22 g Bacto-Pepton und 55 mg Adenin wurden in 1 l Aqua bidest. gelöst, autoklaviert und auf 50-60 °C abkühlen gelassen. Anschließend wurden 100 ml 20 % Glucose zugegeben.

Für die Herstellung von Kulturplatten wurde vor dem Autoklavieren 22 g Bacto-Agar eingewogen.

## 4.5 Versuchstiere und Zellmaterial

### 4.5.1 Versuchstiere

**NFS Inbr. (N)-Mäuse**

Bei NFS-Mäusen handelt es sich um Albinomäuse, die von dem NIH Auszuchtstamm (Natl. Inst. Biol. Standards, Hamstead, England, 1968) abstammen. Die Tiere wurden mit Mäusefutter der Firma Altromin ernährt und erhielten Leitungswasser ad libitum.

Quelle: J. Forchhammer, Fibiger Institute, Danish Cancer Society, Kopenhagen, Dänemark

**NMRI-Mäuse**

NMRI-Mäuse stammen ursprünglich vom Naval Medical Research Institute und wurden 1955 an die Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten in Tübingen weitergegeben und dort als Auszuchtstamm weitergezüchtet. Die Tiere wurden mit Mäusefutter der Firma Altromin ernährt und erhielten Leitungswasser ad libitum.

Quelle: Harlan Winkelmann GmbH

### 4.5.2 Zellmaterial

**Sf9-Zellen**

Bei den Sf9-Zellen (ATCC [America Type Culture Collection] CRL 1711) für die Baculovirus-Infektionsversuche handelt es sich um Insektenzellen des ovarialen Gewebes der *Spodoptera frugiperda* Larven. Sie wurden von Gale E. Smith und Carol L. Cherry 1983 aus der Elternzelllinie IPLB-Sf 21 AE kloniert und wachsen bei Temperaturen zwischen 25 °C und 30 °C. Sie können sowohl in Suspension als auch in Monolayerkultur gehalten werden. Die Zellen verdoppeln sich unter optimalen Bedingungen alle 18-24 h.

**293-Zellen [77]**

Die für transiente Überexpressionsexperimente verwendeten 293-Zellen (ATCC [America Type Culture Collection] CRL-1573) sind menschliche, embryonale, epitheliale Nierenzellen, die durch Adenovirus 5 DNA transformiert wurden. Sie wachsen als Monolayer bei 37 °C.

**NIH3T3-Zellen [117]**

Bei den NIH3T3-Zellen (ATCC [America Type Culture Collection] CRL-1711) handelt es sich um immortalisierte, embryonale, kontakt-inhibierte Maus-Fibroblasten. Sie wachsen bei einer Temperatur von 37 °C als Monolayer.

**PC12-Zellen [78]**

Diese Ratten-Pheochromocytoma Zelllinie (ATCC [America Type Culture Collection] CRL-1721) wächst bei einer Temperatur von 37 °C in kleinen Clustern und ist nur leicht adhärent. Diese Zellen differenzieren nach NGF-Induktion zu einem neuronalen Phänotyp aus.

**32D-Zellen**

Bei den 32D-Zellen (ATCC [America Type Culture Collection] CRL-11346) handelt es sich um IL-3 abhängige Maus-Lymphoblasten, die teilweise adhärent und teilweise in Suspension wachsen. Diese Zellen wurden bei 37 °C kultiviert.

**WEHI-3B [38]**

Diese myelomonocytäre Leukämie-Zelllinie wurde bei 37 °C kultiviert und produziert IL-3.

## 4.6 Medien für die Zellkultur

**Sf9 Medium**

Zu 500 ml IPL-41 Insekten-Medium wurden 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml), 5 ml Pleuronic, 10 ml Tryptose und 50 ml hitzeinaktiviertes FCS zugefügt.

**293/NIH3T3-Zellen Medium**

Zu 500 ml DMEM wurden 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml) und 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) gegeben.

**293-Zellen low Serum Medium**

Zu 500 ml DMEM wurden 1,5 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml) und 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) hinzugegeben.

**WEHI-3B-Zellen Medium**

Zu 500 ml RPMI 1640 Medium wurden 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml) und 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) gegeben.

**32D-Zellen Medium**

Zu 500 ml RPMI 1640 Medium wurden 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml), 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) und 75 ml WEHI-Medium (15 % v/v) gegeben.

**PC12-Zellen Medium**

Zu 500 ml DMEM wurden 50 ml FCS, 25 ml Pferdeserum, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml) und 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) gegeben.

**Medium für primäre Zellen**

Zu 500 ml RPMI wurden 50 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration jeweils 100 U/ml), 5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 200 mM) und 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol hinzugegeben.

## 4.7 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Firma
Blottingpapier, 3 MM, 190 g/m <sup>2</sup>	Schleicher & Schuell
Bottle Top Filter 0,22 µm	Nalge Nunc International
ECL-Hyperfilm	Amersham
Eppendorf Combitips	Eppendorf
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	Hartenstein
Frischhaltefolie	alio
Gewebekulturflaschen	Sarstedt
Gewebekultur-Roller-Bottles	Sarstedt
Gewebekulturschalen	Sarstedt
Glasperlen 0,45-0,5 mm, Glaswolle	Braun
Greiner-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner
Hybond <sup>TM</sup> -C extra 82 mm	Amersham
Hyperfilm <sup>TM</sup> -MP	Amersham
Kulturschalen 9 cm	Sarstedt
Kulturschalen 15 cm	Greiner
Mullbinden	Apotheke
Parafilm	Hartenstein
Poly Screen PVDF Transfer Membran	NEN <sup>TM</sup> Life Science Products
Polystyrenröhrchen 5 ml	Sarstedt
Protran Nitrozellulose Transfer-Membran	Schleicher & Schuell
Sterilfilter Millex <sup>®</sup> -GS 0,22 µm	Millipore
Whatman-Rundfilter 8,5 cm	Whatman
Zahnstocher	Denta

## 4.8 Puffer und Lösungen

### Ammoniumpersulfat (APS)

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat wurde in Aqua bidest. gelöst.

### Assay-Puffer

125 mM Hepes (pH 7,8), 125 mM Tris (pH 7,8), 25 mM Magnesiumacetat und 5mM ATP wurden in Aqua bidest. gelöst. Der Puffer wurde erst kurz vor Gebrauch aus Stammlösungen hergestellt.

### 2× BES

50 mM BES, 280 mM Natriumchlorid und 1,5 mM Natriumphosphat wurde in 225 ml sterilem Wasser (Sigma) gelöst und der pH mit Salzsäure auf 6,96 eingestellt, auf 250 ml aufgefüllt und durch 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### Blocking-Puffer

5 % (w/v) Trockenmilchpulver wurde in 1× PBS/Tween gelöst.

### Blotting-Puffer

39 mM Glycin, 48 mM Tris Base und 0,037 % SDS (w/v) wurden in Aqua bidest. gelöst und der pH auf 8,3 eingestellt.

**Calciumchlorid-Lösung**

2,5 M Calciumchlorid wurde in 25 ml sterilem Wasser (Sigma) gelöst, durch 0,22 µm-Filter sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

**DNA Probenpuffer**

9 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,45 mM EDTA, 46 % (v/v) Glycerol wurden in Aqua dest. gelöst und mit einer Spatelspitze (0,005 % (w/v)) Bromphenolblau versetzt.

**DTT-Lösung**

1 M DTT wurde in 0,01 M Natriumacetat (pH 5,2 - mit Essigsäure einstellen) gelöst, sterilfiltriert (0,22 µm) und in 1 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahrt.

**Giensa-Färbelösung**

Die Giensa-Stammlösung wurde 1:20 mit Aqua.bidest verdünnt. 1 ml davon wurde mit 600 µl Methanol und 18,4 ml 1× PBS vermischt.

**Harvesting-Puffer**

50 mM Tris/HCl (pH 7,8), 50 mM MES (pH 7,8), 1 mM DTT und 0,1 % (v/v) Triton X-100 wurden in Aqua bidest. gelöst. Der Puffer wurde immer frisch vor Gebrauch aus Stammlösungen angesetzt.

**Kaliumphosphat-Puffer**

5 mM Kaliumphosphat wurden in Aqua bidest. gelöst.

**2× Kinasepuffer**

5 mM HEPES (pH 7,5), 50 mM β-Glycerolphosphat, 3 mM EGTA und 10 % (v/v) Glycerol wurden in Aqua bidest. gelöst. Kurz vor Verwendung des Puffers wurde 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 100 µM ATP zugegeben.

**1× Lämmli-Puffer (Protein-Probenpuffer)**

60 mM Tris-base (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerol, 3 % (w/v) SDS und 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol wurden in Aqua bidest. gelöst und mit einer Spatelspitze (0,005 % (w/v)) Bromphenolblau versetzt.

**Luciferin**

1 mM Luciferin wurde in 5 mM Kaliumphosphat-Puffer gelöst und lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

**Lithium-Acetat (10× Stammlösung)**

1 M LiAc wurde in 1 l Aqua bidest. gelöst und auf pH 7,5 eingestellt.

**LiAc/TE-Mix (40 ml)**

400 µl TE (100×) und 4 ml LiAc (10×) wurden mit 35,6 ml Aqua bidest. vermischt.

**Lithiumchlorid-Lösung 8 M**

8 M Lithiumchlorid wurde in Aqua bidest. gelöst und autoklaviert.

**MES-Stammlösung**

1 M MES wurden in Aqua bidest. gelöst und der pH auf 7,8 eingestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.



**NP-40 Lysispuffer**

25 mM Tris-Cl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM Na-Pyrophosphat und 0,2 % (v/v) NP40 wurden in Aqua bidest. gelöst. Kurz vor Verwendung des Puffers wurden 1 mM PMSF, 20 mM NaF, 1 mM DTT, 1mM Na-O-V und je 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin zugegeben.

**PBS/EGTA**

Eine 500 mM EGTA-Lösung wurde sterilfiltriert und 1 ml davon wurde in 500 ml PBS gegeben, so daß die EGTA-Konzentration 1 mM betrug.

**PBS/Tween**

0,05 % (v/v) Tween 20 wurden mit PBS vermischt.

**50 % PEG**

50 % (w/v) PEG wurde in Aqua bidest. gelöst und dann sterilfiltriert.

**PEG/LiAc-Mix (70 ml)**

56 ml PEG (50 %), 7 ml LiAc (10×), 750 µl TE (100×) und 6,25 ml Aqua bidest. wurden gemischt. (Für eine Hefe-cDNA-Bibliotheks-Transformation werden 4 × 70 ml dieser Lösung benötigt.)

**Plasmidaufreinigungs-Lösungen****Lösung A**

50 mM Glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8 und 10 mM EDTA wurden in Aqua bidest. gelöst.

**Lösung B**

0,2 M NaOH und 1 % (w/v) SDS wurden in Aqua bidest. gelöst.

**Lösung C**

3 M Na- oder K-Acetat und 2 M Essigsäure wurden in Aqua bidest. gelöst.

**Plate-Mixture**

45 % PEG 4000 (sterilfiltriert), 1 M Lithiumacetat, 1 M Tris-Cl (pH 7,5) und 0,5 M EDTA wurden in Aqua bidest. gelöst.

**RIPA-Puffer**

50 mM Tris-Cl (pH 7,2), 150 mM NaCl, 0,1 % SDS (w/v), 0,5 % (w/v) Desoxycholat, 1 % (v/v) Triton X-100, 10 mM Na-Pyrophosphat, 25 mM β-Glycerophosphat und 2 mM Na-O-Vanadat wurden in Aqua bidest. gelöst. Der pH wurde auf 7,2 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert. Kurz vor Verwendung des Puffers wurden 1 mM PMSF, 50 mM NaF, 1 mM DTT, 1mM Na-O-V, 1mM Benzamidin und je 1 µg/ml Aprotinin und Leupeptin zugegeben.

**1 x SDS-Page (Proteingel-Laufpuffer)**

25 mM Tris Base, 190 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS wurden in Aqua bidest. gelöst.

**STET-Puffer**

8 % (w/v) Saccharose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-Cl (pH 8) und 5 % (v/v) Triton X-100 wurden in Aqua bidest. gelöst.

**TB-Puffer**

10 mM PIPES, 15 mM CaCl<sub>2</sub> und 250 mM KCl wurden in Aqua bidest. gelöst und mit KOH auf pH 6,7 eingestellt. Anschließend wurden 55 mM MnCl<sub>2</sub> zugegeben und sterilfiltriert (0,22 µm).

**10× TBE-Puffer**

1 M Tris-Base, 20 mM EDTA und 0,9 M Borsäure wurden in Aqua bidest. gelöst und auf pH 8,3 eingestellt.

**TE-Puffer (100× Stock-Lösung)**

1 M Tris-Cl wurde in Aqua bidest. gelöst, mit HCl auf pH 8 eingestellt, 100 mM EDTA wurden zugegeben und der pH nachreguliert. Die Lösung wurde autoklaviert, bevor sie in einer Verdünnung von 1:100 verwendet wurde.

**Western-Strip-Puffer**

60 mM Tris-Cl (pH 6,8), 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 2 % (w/v) SDS wurden in Aqua bidest. gelöst.

**X-Gal Stock-Lösung**

20 mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) wurde in DMF gelöst, aliquotiert und bei -20 °C in Dunkelheit gelagert.

**Z-Puffer**

60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 10 mM KCl und 1 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  wurden in Aqua bidest. gelöst, der pH auf 7,0 eingestellt und autoklaviert.

**Z-Puffer/X-Gal-Mix**

10 ml Z-Puffer wurden mit 27  $\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol und 500  $\mu\text{l}$  X-Gal Stocklösung vermischt, so daß sich eine Endkonzentration von 1 mg X-Gal pro 1 ml Puffer ergab. Diese Mischung wurde immer erst kurz vor ihrer Verwendung angesetzt.

## 4.9 Sonstiges

**Aufgereinigte Proteine**

Bakteriell exprimierte, kinasetote MEK1 K97M, MEKwt, ERK, MBP, 3pK, cJun und kinasetote SEK werden routinemäßig im MSZ gereinigt und als Substrat in Kinase-Assays eingesetzt.

**Säuregewaschene Glasperlen**

Glasperlen wurden über Nacht unter leichtem Schwenken in 1 N HCl und anschließend mehrmals mit Aqua bidest. gewaschen. Die Perlen wurden dann bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet.