

Kurswoche VI - *In vitro* Kinase Assays in Cell Cycle Control: Methods and Approaches

Betreuer:

Dr. Nico Dissmeyer, Maria Klecker

Unabhängige Nachwuchsforschungsgruppe Proteinerkennung und -abbau

IPB, Laborgebäude E2.

Weitere Details und aktuelles Skript siehe online: www.dissmeyerlab.org (>[Teaching](#)).

1 Kurzzusammenfassung

Thematisch wird es um die Bewertung der Aktivität von Kinasen in transgenen Pflanzen gehen, die durch gentechnische Methoden so modifiziert worden sind, dass ihre Aktivität nicht mehr dazu ausreicht, dass sich die Zellen fehlerfrei zu Tochterzellen teilen.

2 Hinweise

Dieses vorliegende Skript betrifft hauptsächlich die Vorbereitung einer Affinitätsmatrix sowie eines Pulldowns, beide Teile stellen lediglich Fragmente des eigentlichen Versuches dar. Die eigentliche Phosphorylierungsreaktion, also der Kern des Kinaseassays, ist in den angegebenen Publikationen sehr detailliert erklärt. Dies betrifft zum einen den eher fachlichen Hintergrund in Dissmeyer et al. 2007 und 2009 sowie die technischen Details in Dissmeyer und Schnittger 2011. Weitere Details werden in der Spezialvorlesung und während des Kurses erörtert.

Wichtig: Das Experiment muss unter Zuhilfenahme **kurzer Teile** eines ansonsten sehr ausführlichen Protokolls (das „*Literaturprotokoll*“, (Dissmeyer and Schnittger, 2011)) vorbereitet werden. Es enthält schrittweise alle notwendigen, sowie eine Vielzahl weiterer nützlicher Infos. Für unseren Kursteil sind die **Ab-schnitte 1., 2., 2.1, 2.3. bis 2.9. und 3., 3.1., 3.3. bis 3.9.** sowie die in selbigem Text verlinkten Bemerkungen (**Notes**) relevant. Der Artikel befindet sich als Download auf unserer Homepage (>[Teaching](#)).

Hintergründe zu den hier verwendeten Materialien (transgene Pflanzen) müssen **vor** dem Kurstag und **vor** den Literaturseminaren **von allen TeilnehmerInnen** durch Durcharbeiten 1) dieses Skriptes und 2) der entsprechenden Teile des Literaturprotokolls (Dissmeyer and Schnittger, 2011) erarbeitet werden. Eine der relevanten Publikationen wird im Journal Club besprochen während der Kurswoche. Dies wird während der Kurstage überprüft und diskutiert, es wird nicht ausreichen, sich dieses Skript kurz vorher „durchzulesen“. Bei der Vorbereitung sollen nicht alle Details auswendig gelernt und beherrscht, sondern ein Überblick über das Thema gewonnen werden, über das „*Wieso und Weshalb*“ und „*das große Ganze*“ der behandelten Experimente. In den vergangenen Jahren wurden teilweise kritische Fehler gemacht, wie bspw. die Ergebnisse des Kinaseassays mit dem des Western Blots vertauscht. Solche Protokolle können dieses Jahr nicht akzeptiert werden.

2.1 Genereller Sicherheitshinweis

Schwangere Studierende dürfen aufgrund von Arbeitsschutzbestimmungen keinen Teil dieses Praktikums absolvieren.

Eine **Schutzbrille** gehört zwingend zur persönlichen Schutzausrüstung und ist mitzubringen! Ohne Schutzbrille kann das Praktikum nicht durchgeführt werden. Im Protokoll sind Arbeiten mit verschiedenen Gefahrstoffen aufgeführt. Die Konzentrationen von β -Mercaptoethanol, Natriumfluorid, Natriumdodecylsulfat (SDS) und Ammoniumpersulfat sind jedoch so gering bzw. liegen die Stoffe gebunden oder in Lösung vor, sodass hier nicht gesondert darauf eingegangen wird. Zwei dennoch relevante Gefahrstoffe sind:

- ^{33}P im „Gamma-ATP“ oder in korrekter Isotopenschreibweise [γ - ^{33}P]-ATP (siehe hierzu Literaturprotokoll)
- **Acrylamid** für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; siehe hierzu Literaturprotokoll)

Im Praktikum werden Pufferreste mit Hilfe von Kanülen, die auf Spritzen aufgesetzt werden, abgesaugt. **Die benutzten Kanülen müssen gesondert in einem durchstichfesten Behälter gesammelt werden.** Dafür eignen sich z. B. leere Chemikalienflaschen aus Kunststoff sehr gut. Je nach Verschmutzung (Kontamination) können gut verschlossene Flaschen dann im Hausmüll entsorgt werden, ggfs. vorher (nicht verschlossen) autoklavieren oder - bei kurzlebigen radioaktiven Isotopen - abklingen lassen.

2.2 Strahlenschutz

Um sich vor radioaktiver Strahlung zu schützen, ist es wichtig, den Begriff der **Dosis** zu kennen. Sie ist eine Einheit für biologisch relevante Einstrahlung auf einen Organismus oder Gewebe. Die von einer Strahlenquelle empfangene Dosis hängt direkt ab

1. von der **Aktivität** der Quelle,
2. von der **Aufenthaltsdauer** nahe der Strahlenquelle,
3. vom **Abstand** zur Strahlenquelle und
4. von der **Abschirmung** durch Materie zwischen Quelle und Person (siehe Abb. 1).

Maßnahmen, um unvermeidliche Belastungen beim Umgang mit Strahlenquellen möglichst gering zu halten, sind daher:

1. **kleinstmögliche Exposition**, um das erwünschte Ergebnis zu erreichen,
2. Vorausschauende **Organisation und Planung** des Arbeitsvorgangs, um die **Expositionsdauer** kurz zu halten,
3. möglichst großer **Bestrahlungsabstand**, beispielsweise durch Benutzung langer Greifzangen wenn nötig. Dies ist bei ^{32}P durchaus angebracht, nicht aber bei ^{33}P , ^{35}S , ^3H oder ^{14}C , die ebenfalls in der Biochemie breite Anwendung finden,
4. Benutzung geeigneter **Abschirmungen** (siehe Abb. 1, Acrylglas und Blei).

Ionisierende Strahlung hat im Vergleich zu anderen Arbeitsplatzrisiken (etwa luftgetragenen Giften oder Mikroorganismen) u. U. den Vorteil, dass sie mit kleinen, überall einsetzbaren Geräten (Dosimetern, Dosisleistungsmessgeräten,

„Geigerzähler“) leicht messbar ist. Dazu ist allerdings eine gewisse Strahlungsenergie vorzusetzen.

Innerhalb des Isotopenlabors darf Abfall ausschließlich nach **Freimessung durch den Kursleiter mit einem Strahlungsmessgerät (!!!)** in den regulären Abfall entsorgt werden. Bei Kontamination sind die Handschuhe und alles andere Material als radioaktiver Abfall zu sammeln.

Ein bloßer, oft unbemerkter Kontakt von Geräten, Einrichtung oder aber sich selbst mit bspw. Pipettenspitzen, die zum Abfüllen von Radioisotop verwendet worden sind, führen zu **Kontamination und erfordern den sofortigen Arbeitsstopp!** Nach Kontamination durch Radioisotopen muss sofort der Kursleiter unterrichtet werden, meist wird ein Abstreifen der Handschuhe bzw. ein Dekontaminieren mit einem feuchten Tuch vollkommen ausreichend sein.

Ganz besonders wichtig beim Umgang mit Radioisotopen ist, dass für Unbeteiligte nicht unmittelbar erkennbare Kontaminationen auf gar keinen Fall verbreitet werden dürfen, bspw. durch Verschleppung über kontaminierte Handschuhe, Geräte und Labornotizbücher, etc. Des Weiteren ist immer auf nicht beteiligte Personen im Raum zu achten, die durch unser hantieren mit Radionuklid einer erhöhten Strahlung ausgesetzt werden könnten. Also nicht nur sich selbst sondern ggfs. alles ringsherum abschirmen!

Im Praktikumsraum stehen Waschmittel für Hände und Arbeitsflächen zur Verfügung. Diese sind bei Kontamination zu verwenden, der Betreuer muss sofort informiert werden!

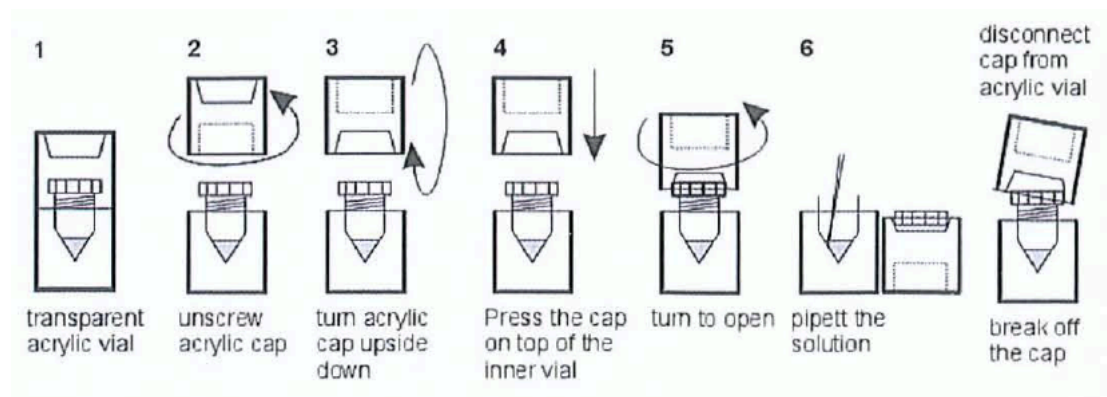


Abbildung 1. Benutzung von Strahlenschutzbehältern, in denen Radioisotopen geliefert und aufbewahrt werden. Quelle: Hartmann Analytic, Braunschweig.

2.3 Gentechnische Arbeiten

Die Arbeiten mit **nicht-reproduktionsfähigem** Material von gentechnisch veränderten Organismen (GVOs), die wir verwenden werden, hier tiefgefrorene Blüten und Blütenmeristeme transgener Pflanzen, fallen **nicht** unter die *Gentechnische Sicherheitsstufe S1*. Alle Arbeiten mit den *lebenden* Spenderorganismen dahingegen schon! Letzteres findet in unserem Kursteil allerdings nicht statt.

Aus Gründen guter Laborpraxis und um **Kontaminationen sowohl des Experimentators als auch des Probenmaterials (auch an die Qualität der Proben**

ist immer zu denken!) zu vermeiden, muss stets mit sauberen Handschuhen gearbeitet werden; Handschuhe (Latex, Nitril) werden gestellt. Dabei ist strikt darauf zu achten, dass, falls **außerhalb des Isotopenlabors** eine Kontamination der Handschuhe vorkommt, diese in den normalen Abfall gegeben werden müssen. **Innerhalb des Isotopenlabors** darf dies ausschließlich nach **Freimessung durch den Kursleiter** erfolgen, ggfs. wird das Material als radioaktiver Abfall behandelt und gesondert gesammelt.

Autoklaviermüll (**GVO-Abfall**), der GVOs enthält und zur Inaktivierung gesammelt werden muss, fällt in diesem Kursteil nicht an.

3 Aufgabenstellung und Ziele

Die Aktivität verschiedener Varianten der CYCLIN-DEPENDENT KINASE A;1 (CDKA;1)¹ sollen mit der wildtypischen Kinase in einem *In vitro*-Kinase-Assay unter Zuhilfenahme eines künstlichen Substrates unter Verwendung von Radioisotopen verglichen werden. Für weitere Details und Vorgehensweise, siehe angegebene Literatur (Dissmeyer et al., 2007; Dissmeyer et al., 2009; Dissmeyer and Schnittger, 2011).

3.1 Versuchsobjekt und Material

Blüten und Blütenmeristeme von unter Standard-Langtagbedingungen bei 10 bzw. 29°C angezogener *Arabidopsis thaliana* des Ökotyps Columbia (Col-0) werden verwendet. Die Genotypen sind wie folgt und in der korrekten, standardisierten Schreibweise (des Journals *The Plant Cell*) angegeben:

wt: Wildtyp = Col-0

13: *cdka;1 Pro35S::lt-degtron:CDKA;1*; Linie 13

15: *cdka;1 Pro35S::lt-degtron:CDKA;1*; Linie 15

Im als Referenz angegebenen Experimentalprotokoll (Dissmeyer and Schnittger, 2011) wird routinemäßig eine kommerziell verfügbare Suspension vom rekombinanten p13^{Suc1}:GST-Fusionsprotein als Affinitätsmatrix zum Pull-down verwendet. GST ist Glutathion-S-Transferase. Die Quelle des p13^{Suc1} ist *Schizosaccharomyces pombe*, MW=13 kDa, welches auch den Namenszusatz „p13“ erklärt. Das Fusionsprotein p13^{Suc1}:GST hat ein MW von 39 kDa (MW GST = 26 kDa) und ist nicht-kovalent an eine Glutathion-Agarose-Matrix gebunden.

In der kommerziell erhältlichen Packungsgröße von 250 uL dieser Agarose *beads* sind laut Hersteller MILLIPORE 2,5 mg p13^{Suc1} (anteilig in den insgesamt 7,5 mg p13^{Suc1}:GST-Fusion in den 250 uL) gebunden in Form einer 50% (v/v) Aufschlammungssuspension aus Glutathion-Agarose enthalten. Pro Kinaseassay-Ansatz werden normalerweise 30 uL dieser Suspension eingesetzt, das entspricht 0,3 mg p13^{Suc1}/Ansatz.

Eine Packungseinheit dieser Suspension mit 250 uL kostet mittlerweile ca. EUR 500. Für das Praktikum würden wir bei ursprünglich angedachten 12 Proben * 6 Gruppen mindestens 72, durch Pipettierfehler, da sich die Suspension sehr schlecht aliquotieren lässt, eher 80 Probenäquivalente benötigen. Dies entsprä-

¹ Nomenklatur und Schreibweise in *Arabidopsis*: PROTEINE, GENE, mutierte gene, TRANSGENE PROTEINE/PROTEINVARIANTEN

che ca. 2,4 mL der Suspension, also 10 käuflichen Einheiten für insgesamt ca. EUR 5000,-.

Daher haben wir uns zum einen entschlossen, die Anzahl der Reaktionsansätze zu reduzieren (siehe unten) und zum anderen selbst hergestellte Affinitätsmatrices zu verwenden. Somit wird ein dem p13^{Suc1}:GST-Agarose ähnliches Pull-down-Reagenz erzeugt. Weitere Details, siehe unter „**Abweichungen vom Literaturprotokoll**“.

Der Einfachheit halber wird im Weiteren und während des Kurses nur noch von „**Suc1**“ die Rede sein, nicht mehr von MBP:p13^{Suc1}, es sei denn, es soll explizit auf den Unterschied der beiden Fusionsproteine hingewiesen werden.

3.2 Hintergründe und Vorbereitung

Wir legen sehr viel Wert auf eine ausreichende Vor- und Nachbearbeitung des Experiments, insbesondere seiner Hintergründe. Dazu wurde das Experimentalprotokoll und diese Anleitung verfügbar gemacht, sowie auf die beiden später im Literaturseminar besprochenen Artikel hingewiesen.

4 Ablaufplan und Durchführung

An dieser Stelle noch einmal der Hinweis, dass sämtliche Reagenzien (Feststoffe, Lösungen, Enzyme, etc.) ausschließlich mit sauberen (= mit destilliertem Wasser gespülten!) oder sterilen Spateln, Löffeln oder Pipettenspitzen abgemessen werden dürfen! Nur dadurch kann vermieden werden, dass Reinstoffe verunreinigt werden und verlässlich funktionieren und Kosten eingespart werden können.

4.1 Kontrollen

Aus Platz- und Kostengründen sowie um die Übersichtlichkeit zu wahren, wird im Praktikum auf wichtige Kontrollen verzichtet. Im Normalfall sollten alle Gruppen im Rahmen guter wissenschaftlicher Praxis alle der nachfolgenden Kontrollen durchführen:

- Alle Ansätze erfolgen im **Duplikat**, ferner:
- Kinaseassay **ohne Proteinextrakt**
- Kinaseassay **ohne Substrat** (bovines Histon H1)
- Als **Pull-down-Kontrolle** sollte eine kommerziell verfügbare Matrix (p13^{Suc1}:GST) zusätzlich verwendet werden, um die Bindungsfähigkeit des abgewandelten Ansatzes (selbst produzierte Matrix) im Vergleich zum herkömmlichen zu bewerten.
- Separat sollten nochmals 150 µg Gesamtproteinextrakt ohne Agaroseaufreinigung auf jedes der final zwei Gele (für alle Praktikumsteilnehmer) geladen, um die Funktionalität des **Antikörpers** zu zeigen.

Einige davon werden exemplarisch und stellvertretend für alle von einer bzw. zwei Gruppen ausgeführt.

4.2 Abweichungen vom Literaturprotokoll

Folgende Änderungen am Protokoll werden im Praktikum vorgenommen:

- Probenaufbereitung (Blüten) ohne flüssigen Stickstoff, nur gekühlt auf Wassereis
- Verwendung des Proteinaseinhibitorcocktails (Roche Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets) anstelle der Einzelinhibitoren im „*Extraction buffer*“ (wird vorbereitet)
- Konzentrationsbestimmung des Gesamtproteins durch Plattenleser im 96er-Format anstelle von Einzelküvetten
- Verwendung einer abweichenden Bindematrix, siehe unter 3.1
- Um Pipettierverluste zu vermeiden, wird der ATP-Mix für alle Gruppen zusammen vorbereitet. Aus Sicherheitsgründen und um die Strahlungsemission (annähernd 500 uCi in 50 uL Gamma-ATP kommen zum Einsatz) zu minimieren, wird die benötigte Menge Radioisotop aus dem Vorratsgefäß in einen leeren Isotopen-Sicherheitsbehälter überführt und dann darin mit den weiteren Reagenzien durch Pipettieren vermischt.

4.3 Zeitablauf

Die unter Tag 2 in kursiv vermerkten Schritte können u. U. auch am darauffolgenden Tag bewerkstelligt werden. Der Western Blot kann ggfs. über Nacht laufen, kritisch wäre dann evtl. die relativ kurze Inkubationszeit des Primärantikörpers.

Experimental-Tag 0 (Mo)

Hier finden die Spezialvorlesung (sehr themennah) und die Vorbesprechung statt. Im Anschluss daran ist Zeit, individuelle Fragen zu klären.

Experimental-Tag 1 (Di, ganzer Tag)

Proteinextraktion, Konzentrationsbestimmung, Vorbereitung der Matrix, Komplexbindung (über Nacht).

Experimental-Tag 2 (Mi, ganzer Tag)

Pull-down, Reinigen der Komplexe, Vorbereitung SDS-PAGE, Vorbereitung Kinase-Mix (Isotopenlabor), Kinaseassay (Isotopenlabor), *SDS-PAGE (Isotopenlabor)*, *Western Blot (Isotopenlabor)*, *Blocking der Membran (Isotopenlabor)*, *Primärantikörper (über Nacht; Isotopenlabor)*.

Experimental-Tag 3 (Do, ganzer Tag)

Sekundärantikörper (Isotopenlabor), ECL-Detektion, Autoradiographie.

Experimental-Tag 4 (Fr)

An diesem Tag können bei Bedarf noch Nacharbeiten stattfinden.

4.4 Reihenfolge, Handling und Auftragung der Proben während des gesamten Praktikums

Durchweg sollen die Proben einer jeden Gruppe immer in der folgenden Reihenfolge gehalten werden, um Arbeitsabläufe zu vereinfachen und Übersicht zu garantieren:

Insgesamt werden drei Genotypen unter zwei Bedingungen untersucht, also sechs Proben pro Gruppe bearbeitet:

6 Proben:

- 1) wt warm
- 2) wt kalt
- 3) 13 warm
- 4) 13 kalt
- 5) 15 warm
- 6) 15 kalt

Wir verwenden SDS-PAGE-Gele, die 15 Taschen besitzen, daher werden Gruppen 1 und 2 sowie Gruppen 3 und 4 jeweils ein gemeinsames Gel beladen. Gruppe 5 belädt ein eigenes Gel. Beladung de Gels, siehe unten. Jedes Gel wird separat in einer Gelkammer laufen gelassen, um Zeitverzögerungen und eine Diffusion der Proben aus den Taschen so gut es geht zu vermeiden

Drei Gruppen (Gruppen 1, 3 und 5) bereiten während der Kinasereaktion Proteinrohextrakt der Linie wt zum Laden auf die SDS-PAGE vor, also einmal pro Gel. Dies soll nach dem Western Blot zeigen, ob der Antikörper CDKA;1 detektiert. Dazu wird der Extrakt, der 150 ug Gesamtprotein enthält, mit dem gleichen Volumen Ladepuffer versetzt, wie die anderen Ansätze auch und aufgekocht. Beladung de Gels, siehe unten.

Für das Praktikum werden daher in jeder Gruppe (6 Proben) folgende Bestandteile für den Pull-down pro Ansatz zusammengegeben:

- Suc1-Amylose/Agarose-Suspension (Matrix)
- zu berechnendes Volumen Proteinextrakt des jeweiligen Genotypes, um 150 ug Gesamtprotein zu erhalten
- jeweils eine Gruppe pro Gel (Gruppen 1, 3 und 5) soll Pflanzenextrakt des wt als Antikörperkontrolle auftragen

Jede Gruppe bereitet daher *zu Beginn* **6 Mikrozentrifugenröhrchen** vor (Beschriftung in der Reihenfolge 1 bis 6 enthält die Proben wie oben angegeben, also der reihe nach wt warm/kalt, 13 warm/kalt, 15 warm/kalt). Gruppen 1, 3 und 5 bereiten schon ein siebtes Röhrchen für den Proteinrohextrakt mit vor: *Nachdem die Kinasereaktion gestartet wurde*, werden 150 ug Protein der Linie wt mit Ladepuffer versetzt und mit den Kinasereaktionen im Anschluss aufgekocht.

Beladung des Gels:

M= Marker

1.1: Probe 1 der Gruppe 1, etc.

PE: Proteinextrakt

w: warm

k: kalt

Gelkammer 1:

Gel 1	Gruppe 1								Gruppe 2						
Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	M	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6	PE	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	M
Probe		wt	wt	13	13	15	15		wt	wt	13	13	15	15	
Bedingung		w	k	w	k	w	k		w	k	w	k	w	k	

Gelkammer 2:

Gel 2	Gruppe 3								Gruppe 4						
Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	M	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	PE	4.1	4.2	4.3	4.4	4.5	4.6	M
Probe		wt	wt	13	13	15	15		wt	wt	13	13	15	15	
Bedingung		w	k	w	k	w	k		w	k	w	k	w	k	

Gelkammer 3:

Gel 3	Gruppe 5														
Tasche	1	2	3	4	5	6	7	8							
	M	5.1	5.2	5.3	5.4	5.5	5.6	PE							
Probe		wt	wt	13	13	15	15								
Bedingung		w	k	w	k	w	k								

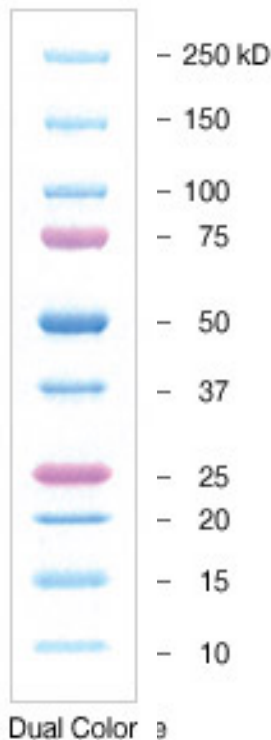


Abbildung 2. Verwendeter Proteinlängenstandard „Dual Color“. Laufhöhe CDKA;1: 34 kDa, Histon H1: 32 kDa. Radioaktives, nichtmetabolisiertes Gamma-ATP läuft auf der Höhe der Bromphenolblaubande ganz zu Beginn aller Banden. Quelle: Bio-Rad.

4.5 Bereitgestellte Lösungen

Die meisten Lösungen sind bereits vorbereitet, manche müssen während des Kurstages lediglich noch angemischt werden.

Wichtig! Für „MgCl₂“ verwenden wir das **Hexahydrat** (MgCl₂ · 6 H₂O, MW: 203,3 g/mol nicht das wasserfreie Salz mit 95,21 g/mol) und für „EDTA“ oder „Na₂-EDTA“, wie in unserem Skript angegeben, das **Dihydrat des Dinatriumsalzes** (Natriumedetatdihydrat, C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ · 2 H₂O, MW = 372,24 g/mol, keinesfalls etwa die freie Säure „EDTA“ mit einem MW = 292,24 g/mol oder aber das wasserfreie Dinatriumsalz).

Diese Kleinigkeiten können, falls nicht beachtet, zu komplett falsch eingestellten und falsch konzentrierten Puffern führen. Leider gibt es in ein und demselben Chemikalienschrank oft nebeneinander *freie Säure, wasserfreie Substanz, Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Penta-, Hexahydrat etc.* und zudem schlichtweg undeutliche Formulierungen in vielen Experimentalprotokollen. Daher müssen **immer** die für jedes Rezept absolut feststehenden Molaritäten ausgehend von den zur Verfügung stehenden Substanzen nachgerechnet werden und auf mögliche Unklarheiten in der Benennung der vermeintlich einzusetzenden Reagenzien zu achten. Beliebte ist auch die vollkommen falsche Nennung von „Na₃PO₄“ als Ausgangssubstanz für „Natriumphosphatpuffer“ (dieser muss aus verschiedenen Volumina von äquimolaren Lösungen des Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄ hergestellt werden bzw. durch Titration mit NaOH bzw. H₃PO₄, je nach pH-Wert). Die Einwaagen sind dementsprechend anzupassen.

Zum Ansetzen der Tris-haltigen Puffer wird die **Tris-Base** (Tris(hydroxymethyl)aminomethan, MW: 121,14 g/Mol) verwendet und entsprechend mit dem „Gegenanion“ Chlorid, also mit i.d.R. 1 oder 10 M HCl, bis zur

Einstellung des korrekten pH-Wertes **titriert**. Hier darf nicht etwa „Tris hydrochlorid“ oder „Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid“ (also das Salz mit MW = 157.60 g/Mol) verwendet werden.

5 Auswertung und Protokoll

Es soll ein Protokoll pro Gruppe (i. d. R. 3 Personen) angefertigt werden. Ein Protokoll kann einmal nachkorrigiert werden. Zu viele Rechtschreibfehler und unklare Versuchsbeschreibung führen zur sofortigen Retoure des Protokolls und schränken so die Möglichkeit ein, fachliche Fehler und Unklarheiten anschließend noch korrigieren zu können. Aus gegebenem Anlass stehen diese Hinweise hier bereits im Kursskript. Wir bitten unbedingt auch darauf zu achten, eine klare und wissenschaftlich vorsichtige aber auch korrekte Ausdrucksweise zu verwenden. Umgangssprache muss im Protokoll vermieden werden. Daher unbedingt *Korrekturlesen* und vor Abgabe die *Rechtschreibprüfung* verwenden! Es muss *in eigenen Worten* eine kurze (ca. fünf Sätze) **Einleitung (I.)** gegeben werden mit einer kurzen Darstellung von Versuchszweck und -prinzip. Unter **Ergebnisteil (II.)** werden Western Blot und Autoradiographie gezeigt; sie müssen beschriftet und beschrieben werden, siehe im Kurs diskutierte und hier aufgeführte Publikationen. Das Experiment soll kurz beurteilt werden und eine Aussage über die Qualität der Ergebnisse getroffen werden. Die Ergebnisse der Reaktionen sollen hier *beschrieben und verglichen* werden. Hier müssen auch sämtliche Änderungen und Abweichungen bei der Versuchsdurchführung im Vergleich zur Literatur-Anleitung (Dissmeyer & Schnittger, 2011) dokumentiert und erklärt werden. In der **Diskussion (III.)** müssen die Ergebnisse kurz *interpretiert* und in der Art eines Troubleshooting erörtert werden, weshalb es unter Umständen zu Problemen und von der Erwartung abweichenden Ergebnissen gekommen sein könnte. Im Teil **Material und Methoden (IV.)** muss sich kurz der Arbeitsablauf widerspiegeln. Hierzu soll eine Kurzzusammenfassung im Stil des „Material und Methoden“-Teiles im Format einer gängigen Publikation angefertigt werden, beispielsweise wie im nachfolgenden Ausschnitt in Abb. 3. Referenzen brauchen nicht angegeben zu werden. Für die folgenden, bereits vorbereiteten Puffer sind die absoluten, **im Volumen pro Probe verwendeten Stoffmengen** bei der gegebenen Konzentration im Protokoll (Material und Methoden) auszurechnen (gesamter Lösungsweg aufzeigen) und in einer einzelnen, ganzseitigen Tabelle anzugeben. Berechnet werden sollen jedoch nur die Mengen für Tris, NaCl, MgCl₂, NaF, Na₃VO₄, DTT, EDTA und EGTA (siehe dazu auch Info unter 3.5 bezüglich Kristallwasser):

- *Extraction buffer*: 2000 uL/Probe
- *Bead or wash buffer*: 2000 uL/Probe
- *Pre-kinase buffer*: 500 uL/Probe
- *Kinase buffer*: 31 uL/Probe

Hierfür müssen aus den verwendeten Volumina die finalen, realen Stoffmengen errechnet werden. Die Rechnungen müssen nachvollziehbar sein, also bitte strikt formal, inklusive aller Einheiten aufführen.

Purification of *Arabidopsis* Proteins Expressed in *Escherichia coli*

E. coli BL21 (DE3) pLysS cells carrying pGST-CTD (Umeda et al., 1998) were grown at 28°C to OD₆₀₀ of 0.4 to 0.6. Expression of the GST-CTD protein was induced by 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside for 4 h at 37°C. Cells were harvested by centrifugation and then resuspended and sonicated in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 0.1 mM benzamidine, 10 µg/mL aprotinin, and 10 µg/mL leupeptin, pH 8.0). The cell lysate was subjected to centrifugation (Sorvall HB-4 rotor; 16,500g for 30 min at 4°C), and the cleared extract was used for affinity purification on glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences) as described (Umeda et al., 1998; Bakó et al., 2003). *E. coli* BL21 (DE3) pLysS cells carrying pET201-Trx-CDKs-His₆, pET201-Trx-CyclinH;1-His₆, and pET201-Trx-CDKF;1-His₆ (see Supplemental Methods 1 online) were disrupted by sonication in lysis buffer, and upon centrifugation the cleared extracts were affinity purified on nickel-nitriloacetic acid agarose (Qiagen) according to the manufacturer's instruction. Elution of matrix-bound proteins was performed by increasing the imidazole concentration in stepwise manner from 60 to 250 using 20 mM intervals. Protein profiles of fractions were visualized by SDS-PAGE, and fractions containing apparently homogeneous proteins were pooled. The collected fractions were concentrated using buffer exchange in a 10K Amicon Ultra Centrifugal Filter (Millipore), and the final protein concentrations were adjusted based on Bradford assays (Bio-Rad) using a BSA standard curve.

Abbildung 3. Beispieltext für den Teil Material und Methoden (IV.). Alle finalen Pufferkonzentrationen sind aufgeführt, nicht allgemeinverständliche Abkürzungen ausgeschrieben und unter Umständen notwendige Informationen zu speziellen Verbrauchsmitteln gegeben. Entnommen Hajheidari M *et al.*, Plant Cell. 2012 Apr 30. [Epub ahead of print]. Als weitere Beispiele können die beiden im Literaturseminar besprochenen Artikel verwendet werden. Übrigens taucht hier ein Fehler bezüglich des Lysepuffers und seiner Pufferzusammensetzung/Pufferung auf. Welcher ist es?

Unter **Literatur (V.)** müssen die beiden im Literaturseminar sowie der Artikel, der die zugrundeliegenden Protokolle enthält (Dissmeyer und Schnittger 2011) im Zitierstil des Wissenschaftsjournals *Science Magazine* - und zwar wie in einem *Report* (bestimmtes Aufsatzformat) üblich - korrekt angegeben werden. Beispiele können in beliebigen *Report*-Artikeln auf der Homepage des Journals unter *References* angesehen werden. Diese Ressourcen sind aus dem Uninetz frei zugänglich.

Im Protokoll müssen alle schriftlichen und bildlichen Teile selbständig erarbeitet werden und ggfs. mit der korrekten Quelle ausgewiesen werden. Nicht gekennzeichnetes Verwenden fremder Inhalte (Textbausteine, Abbildungsteile, etc.) führt u.U. zur Nichtbewertung des Kursteiles.

6 Literatur

Dissmeyer, N. et al. (2007). T-loop phosphorylation of *Arabidopsis* CDKA;1 is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue. *Plant Cell* 19: 972–85.

Dissmeyer, N., and Schnittger, A. (2011). Use of phospho-site substitutions to analyze the biological relevance of phosphorylation events in regulatory networks. *Methods Mol Biol* 779: 93–138.

Dissmeyer, N. et al. (2009). Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA;1. *Plant Cell* 21: 3641–54.