

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Geräte

#### 2.1.1.1 PCR und Elektrophorese

- Horizontal-Elektrophoresesystem Mini Sub Cell GT System; Bio-Rad
- Thermocycler Trio-Thermoblock; Biometra
- Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele, Geldicke 0,75 mm; CBS

#### 2.1.1.2 Zentrifugen

- Kühlzentrifuge Evolution RC; Sorvall
- Tischzentrifuge 5415 C; Eppendorf
- Tischzentrifuge 5417 R; Eppendorf
- Ultrazentrifuge Optima L-90 K mit Ti 70.1-Rotor; Beckmann-Coulter
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R; Heraeus-Christ

#### 2.1.1.3 Westernblot und Filmentwicklung

- Entwicklermaschine Optimax Typ TR; MS Laborgeräte
- *Semidry*-Transferzelle Trans-Blot SD; Bio-Rad

#### 2.1.1.4 Photometer

- Mikroplatten-Photometer Spectra MAX 340 PC; Molecular Devices
- Mikroplatten-Fluoreszenz-Lesegerät Spectra MAX Gemini; Molecular Devices
- Küvettenphotometer DU 640; Beckmann-Coulter

#### 2.1.1.5 Sonstige Geräte

- FACS-Messgerät Coulter Epics X; Beckman Coulter
- Mikrowell-Waschvorrichtung Nunc-Immuno Wash 8; Nunc
- Sequenzierer ABI Prism 310; Perkin Elmer
- Ultraschallstab Sonopuls HD 2200; Bandelin
- Ultra-Turrax T 25 basic; IKA Labortechnik

### 2.1.2 Chemikalien

- 6-Biotin-17-NAD<sup>+</sup>; Trevigen
- Acrylamid 4K Lösung (30 %) Mix 37,5:1 Acrylamid : Bisacrylamid; AppliChem
- Agarose NEEO Ultra; Roth
- Ammoniumsulfat; Roth
- ATP; Fermentas
- Diphtheriatoxin; Sigma
- dNTP-Mix; Fermentas
- *Enhanced chemiluminescence*-Westernblot-Detektionsreagens; Perkin Elmer
- Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid; Roth
- Ni-NTA-Agarose; Qiagen
- Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF); Sigma
- Staurosporin; Sigma

Die Chemikalien wurden in *pro analysis*-Qualität bezogen. Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Sigma oder VWR bezogen.

### 2.1.3 Saponine

- $\beta$ -Aescin; Merck
- Ginsenosid Rd; Roth
- Glycyrrhizinsäure; Roth
- Hederasaponin C; Roth
- Helianthosid 2; aufgereinigt nach Hiegemann *et al.* [88]
- Quillajasaponin; Roth
- Saponinum album; Merck

Alle Saponine wurden freundlicherweise von Prof. Dr. M. F. Melzig, Institut für Pharmazie, Freie Universität Berlin, 14195 Berlin, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

- DyeEx 2.0 Spin Kit; Qiagen
- Mikrokonzentriersäulen Amicon 30 kDa / 50 kDa; Millipore
- Mikrolatteneinsätze Maxi Sorb U16 Module; Nunc
- Nitrocellulosemembran Hybond *enhanced chemiluminescence*; Amersham Biosciences
- Röntgenfilme Biomax MR-1; Kodak
- Dialyseschläuche, Ausschlussgrenze 12 bis 14 kDa; Roth

### 2.1.5 Kits

- »BigDye Terminator v1.1 Kit« und »Template Suppression Reagent«; Perkin Elmer
- »Advanced Protein Assay Reagent«; Cytoskeleton
- »OneStep RT-PCR Kit«; Qiagen
- »QIAquick Gel Extraction Kit«; Qiagen
- »RNeasy Mini Kit«; Qiagen
- »TOPO TA Cloning Kit«; Invitrogen

### 2.1.6 Bakterienstämme

- *E. coli* DH5 $\alpha$ ; Invitrogen
- *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS; Novagen

### 2.1.7 Hefestamm

- *Saccharomyces cerevisiae* TKY675, ohne endogenen EF2 aber mit 6  $\times$  His-tag-EF2, freundlicherweise von Prof. Dr. T. G. Kinzy, Molecular Genetics, Microbiology and Immunology, UMDNJ Robert Wood Johnson Medical School, NJ 08854-5635, USA, zur Verfügung gestellt.

### 2.1.8 Vektoren

Sämtliche in dieser Arbeit verwendete Vektoren sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tab. 2.1).

**Tab. 2.1:** Auflistung der Vektoren.

Vektor	Beschreibung	Quelle
DKFZp564B1070Q3	Vektor mit cDNA des humanen IL2	rzpd
pET11d	Vektor zur Expression in <i>E. coli</i>	Invitrogen
pLITMUS28	Vektor zur Klonierung und Sequenzierung in <i>E. coli</i>	Invitrogen

## 2.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von metabion bezogen und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tab. 2.2).

**Tab. 2.2:** Auflistung der Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
IL2 fl rev EcoRI	GGAAT TCTCA AGTCA GTGTT GAGAT GATGC
IL2 21-55 rev EcoRI	CGAAT TCTTA TTTGG GATTG TTGTA ATTAT TAATT CC
IL2 21-55 for XmaI	CCCCC CGGGG CACCT ACTTC AAGTT CTACA AAG
IL2aa20–35COMPLIMENT	AATTC TTACT CCAGT TGCAG CTGTG TTTTC TTTGT AGAAC TGGAA GTAGG TGCAC TCCC
fHA2-4E	TATGG GTCTG TTCGA AGCTA TCGCT GGTTT CATCG AAAAC GGTTC GGAAG GTATG ATCGA CGGTT GGTAC GGTGC G
rHA2-4E	GGCCC GCACC GTACC AACCG TCGAT CATA CTTCC CAACC GTTTT CGATG AAACC AGCGA TAGCT TCGAA CAGAC CCA
fHA2	TATGG GTCTG TTCGG TGCTA TCGCT GGTTT CATCG AAAAC GGTTC GGAAG GTATG ATCGA CGGTT GGTAC GGTGC G
rHA2	GGCCC GCACC GTACC AACCG TCGAT CATA CTTCC CAACC GTTTT CGATG AAACC AGCGA TAGCA CCGAA CAGAC CCA
Nco-His-DTA vor	GGCAT GCCAT GGGAC ATCAT CATCA TCATC ATAAG CTTGC TGATG ATGTT GTTGA TTC
DT390rev	CCCCG GAAGA AATGG TTGCG TTTTA TGC
RFT5 mut XmaI rev	GTGAT AGTGA TCTTC TCACC GGGAG ATGCA GC
RFT5 mut XmaI for	GCTGC ATCTC CCGGT GAGAA GATCA CTATC AC
RFT5 EcoRI rev	CGAAT TCTTA CCGTT TCAGC TCCAG CTTG
RFT5 XmaI for	CCCCC CGGGA TGGCC CAGGT GAAGC TG
RFT5 183 for	CCAGA AGTTC AAGGG CAAGG
SYNB1-PLUS	TATGA AGGGT GGCCG CCTGT CTTAT TCCCG TCGCC GTTTC AGCAC TTCTA CCGGC CGCGG GGGCC
SYNB1-MINUS	CCCGC GGCCG GTAGA AGTGC TGAAA CGGCG ACGGG AATAA GACAG GCGGC CACCC TTCA
Universal Primer	GTAAA ACGAC GGCCA GT
T7pBS	GGAAA CAGCT ATGAC CATG
DTA-265 for	GGACT GACGA AGGTT CTCGC

## 2.1.10 Puffer, Medien und Marker

Die hier aufgeführten allgemeinen Lösungen wurden für mehrere Methoden verwendet. Weitere versuchsspezifische Lösungen sind in Verbindung mit der jeweiligen Methode beschrieben. Alle Puffer wurden mit ELIX-Wasser hergestellt. Dieses Wasser wird in einer ELIX-Wasseraufbereitungsanlage produziert und hat einen Reinheitsgrad von Typ 2 bidestilliertem Wasser. Die Verwendung von zusätzlich autoklaviertem MilliQ-Wasser (Reinstwasser) beschränkte sich auf molekularbiologische und proteinchemische Arbeiten.

- LB-Medium: 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH 7,0, autoklaviert, vor Verwendung auf 50 µg/ml Ampicillin eingestellt, für LB-Platten Zusatz von 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren
- PBS-Puffer: 150 mM Natriumchlorid, 8,33 mM Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, 1,67 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4
- *1 Kb DNA Ladder*; GibcoBRL
- *100 bp DNA Ladder*; GibcoBRL
- *Page Ruler Prestained Ladder*; Fermentas
- *Molecular Weight Marker*; Fermentas

### 2.1.11 Antikörper

- Polyklonale Kaninchen-IgG gegen Ziegen-IgG mit Peroxidase konjugiert (RAG); Dako
- Polyklonale Kaninchen-IgG gegen Ziegen-IgG mit FITC konjugiert (RAG-FITC); Sigma
- Polyklonale Ziegen-IgG gegen Biotin (GABiotin); Sigma
- Polyklonale Ziegen-IgG gegen DT ( $\alpha$ DT); Biotrend

### 2.1.12 Enzyme und weitere Proteine

- Albumin aus Rinderserum; Sigma
- Klenow-Polymerase mit Puffer; Fermentas
- Restriktionsenzyme und dazugehörige Puffer; NEB oder Fermentas
- T4-DNA-Ligase mit Puffer (mit ATP); Fermentas
- T4-Polynukleotidkinase (PNK) mit Puffer; Fermentas
- Taq-Polymerase; isoliert im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Charité — Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin

### 2.1.13 Zellkultur

- Dulbecco's *modified eagle medium* High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin; PAA
- Dulbecco's PBS mit Calcium und Magnesium (0,9 mM Calcium, 0,5 mM Magnesium); PAA
- Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium; PAA
- *Fetal calf serum*; Biochrom KG, Berlin
- Penicillin / Streptomycin (10 000 U / 10 000 µg/ml); PAA
- RPMI 1640 mit L-Glutamin; PAA
- Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA); PAA

### 2.1.14 Zelllinien

- HER14, murine embryonale Fibroblasten, NIH-3T3 transfiziert mit humanem EGFR; freundlicherweise von Prof. Dr. E. J. J. van Zoelen, Department of Cell Biology, University of Nijmegen, 6525 ED Nijmegen, Niederlande, zur Verfügung gestellt.
- L540Cy, humane Hodgkin Lymphom T-Zellen, freundlicherweise von PD Dr. Dr. S. Barth, Institut für Molekulare Biotechnologie, IME / RWTH Aachen, 52074 Aachen, zur Verfügung gestellt.
- NIH-3T3, murine embryonale Fibroblasten; DSMZ

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Alle Reaktionen erfolgten bei Raumtemperatur. Abweichende Reaktionsbedingungen sind angegeben.

### 2.2.1 PCR

**5 × PCR-Puffer:** 0,25 M Tris pH 8,5 bei 37 °C, 0,25 M Natriumchlorid, 10 mM Dithiothreitol, 12,5 mM Magnesiumchlorid

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) [139] dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen. Anhand verschiedener Primerkombinationen und der Auswahl bestimmter zu amplifizierender DNA-Sequenzen kann das Produkt der PCR bestimmt werden.

**Tab. 2.3:** Reaktionsansätze für die PCR.

Reagens	Menge
5 × PCR-Puffer	3,0 µl
2 mM dNTP	1,0 µl
<i>forward primer</i> (10 µM)	0,4 µl
<i>reverse primer</i> (10 µM)	0,4 µl
Plasmid-DNA-Lösung (etwa 50 ng/µl)	0,1 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
MilliQ-Wasser	10,0 µl

In der PCR-Maschine (2.1.1.1) wurde das folgende Programm durchlaufen:

- 94 °C, 3 min
- 30 Zyklen: 94 °C, 30 s  
52 oder 58 °C, 30 s  
72 °C, 75 s
- 72 °C, 3 min
- 14 °C

Zur Amplifikation der Sequenzen von IL2(35) und IL2 wurde eine Annealingtemperatur von 58 °C gewählt, für die beiden PCRs zur Amplifikation von RFT5 52 °C. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert (2.2.8).

### 2.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

**Puffer P1:** 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0

**Puffer P2:** 200 mM Natriumhydroxid, 1 %(w/v) SDS

**Puffer P3:** 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Die Präparation von Plasmid-DNA beruht auf der alkalischen Lyse der Zellen und einer Ethanol-fällung der Plasmid-DNA. Zunächst wurde für die Plasmidpräparation 3 ml LB-Medium (Zusatz Ampicillin) mit Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Warmlufttrumschüttler inkubiert. Von der Übernachtskultur wurden 2 ml zentrifugiert (5 min, 4 000 × g, 4 °C) und das Pellet in 300 µl der Lösung P1 resuspendiert. Anschließend wurden zur Lyse 300 µl der Lösung P2 zugesetzt und die Mikroreaktionsgefäße 3 × invertiert und 3 min inkubiert. Nach Zusatz von 300 µl der Lösung P3 wurde die neutralisierte Lösung zentrifugiert (10 min, 13 600 × g, 4 °C). Der Überstand der Zentrifugation wurde mit 900 µl 100%igem Ethanol versetzt und zentrifugiert (10 min, 13 600 × g, 18 °C). Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 20 µl MilliQ-Wasser resuspendiert.

### 2.2.3 Phosphorylierung und Dimerisierung von Oligonukleotiden

Die Phosphorylierung und anschließende Dimerisierung der Oligonukleotide diente der Vorbereitung einer Ligation der Oligonukleotide mit einem durch Restriktionsendonukleasen (2.2.7) geschnittenen Vektor. Die Phosphorylierung an den 5'-Enden der Oligonukleotide erfolgte durch die T4-Polynukleotidkinase (PNK) (2.1.12). Diese Reaktion erfolgte nach folgendem Schema (Tab. 2.4).

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung eines Phosphorylierungsansatzes.

Reagens	Menge
Oligonukleotid 1	100 pmol
Oligonukleotid 2	100 pmol
10 mM ATP	1 µl
10 × T4-PNK <i>Forward Buffer A</i>	1 µl
T4-PNK (10 U/µl)	1 µl
MilliQ-Wasser	ad 10 µl

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und die PNK durch nachfolgende 15-minütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert. Die Dimerisierung der komplementären Oligonukleotide erfolgte durch langsames, passives Abkühlen der Probe im Wasserbad.

## 2.2.4 DNA-Modifikationen durch Klenow-Polymerase

Durch die Klenow-Polymerase (das große Fragment der DNA-Polymerase I nach proteolytischem Verdau) können DNA-Sequenzen analog zu einer PCR an einer Primersequenz aufgefüllt werden. Durch die 5'-3'-Polymeraseaktivität der Klenow-Polymerase können einzelsträngige Bereiche in DNA-Doppelsträngen aufgefüllt werden. Wird die Klenow-Polymerase jedoch in Gegenwart geringer dNTP-Konzentrationen inkubiert, so entfernt sie durch ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität Nukleotide aus Bereichen einzelsträngiger DNA.

**Tab. 2.5:** Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes mit Klenow-Polymerase zum Auffüllen einzelsträngiger DNA.

Reagens	Menge
DNA	7 $\mu$ l
Klenow-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
10 $\times$ Klenow-Polymerasepuffer	1 $\mu$ l
2 mM dNTPs	1 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37 °C und dann zum Inaktivieren der Polymerase 10 min bei 70 °C inkubiert. Um Salze weitgehend zu entfernen, wurde anschließend eine Ethanolpräzipitation durchgeführt. Dazu wurde dem Ansatz 1  $\mu$ l (1/10tel Volumen) Natriumacetatlösung (3 M, pH 5,2) beigegeben und anschließend 25  $\mu$ l (2,5faches Volumen) Ethanol zugesetzt und gemischt. Die Probe wurde zentrifugiert (15 min, 16 100  $\times$  g, 4 °C), das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und rezentrifugiert. Nach Trocknen wurde das Pellet in 7  $\mu$ l MilliQ-Wasser resuspendiert.

**Tab. 2.6:** Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes mit Klenow-Polymerase zur Entfernung einzelsträngiger DNA.

Reagens	Menge
DNA	10,0 $\mu$ l
Klenow-Polymerase (2 U/ $\mu$ l)	1,2 $\mu$ l
10 $\times$ Klenow-Polymerasepuffer	1,0 $\mu$ l
2 mM dNTPs	0,2 $\mu$ l

Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 25 °C inkubiert und dann zum Inaktivieren der Polymerase 1,2  $\mu$ l 100 mM EDTA zugesetzt und 20 min bei 75 °C inkubiert. Um Salze weitgehend zu entfernen, wurde anschließend, wie oben beschrieben, eine Ethanolpräzipitation durchgeführt.

### 2.2.5 Gesamt-RNA-Isolierung aus Bakterien

Für die Isolierung der Gesamt-RNA<sup>2</sup> aus einer Kultur von *C. diphtheriae* wurde das »RNeasy Mini Kit« von Qiagen verwendet. Eine Kultur von *C. diphtheriae* in 20 ml LB-Medium wurde für die Präparation eingesetzt. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 5 000 × g, 4 °C) und das Pellet in 100 µl TE-Puffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 3 mg/ml Lysozym resuspendiert und 5 min inkubiert. Dann wurden 350 µl RLT Puffer aus dem Kit zugesetzt und durch Vortexen gemischt, bevor weitere 250 µl 100%iger Ethanol zugegeben wurden. Das Lysat wurde dann auf eine RNeasy Mini-Säule aus dem Kit pipettiert und kurz zentrifugiert (15 s, 8 000 × g) und die Säule mit 700 µl RW1-Puffer aus dem Kit gewaschen und rezentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit 500 µl RPE-Puffer aus dem Kit gewaschen und rezentrifugiert, wobei die letzte Zentrifugation für 2 min durchgeführt wurde. Zum Eluieren der RNA wurden 30 µl RNase freies Wasser aus dem Kit auf die Säule gegeben und durch Zentrifugation (1 min, 8 000 × g) in ein neues Mikroreaktionsgefäß eluiert und bei –20 °C gelagert.

### 2.2.6 Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

Um aus der in 2.2.5 gewonnenen Gesamt-RNA von *C. diphtheriae* die cDNA von den ersten 390 Aminosäuren von DT zu klonieren, wurde das »OneStep RT-PCR Kit« von Qiagen eingesetzt. Es wurde folgender Ansatz gewählt.

**Tab. 2.7:** Reaktionsansätze für die RT-PCR.

Reagens	Menge
5 × RT-Puffer (aus dem Kit)	10 µl
10 mM dNTP	2 µl
Nco-His-DTA vor (10 µM)	3 µl
DT390rev (10 µM)	3 µl
Gesamt-RNA-Präparation	5 µl
OneStep RT-PCR <i>Enzyme Mix</i> (aus dem Kit)	2 µl
RNase freies Wasser (aus dem Kit)	ad 50 µl

In der PCR-Maschine (2.1.1.1) wurde das folgende Programm durchlaufen:

- 94 °C, 3 min
- 30 Zyklen: 94 °C, 30 s  
52 °C, 30 s  
72 °C, 75 s
- 72 °C, 3 min
- 14 °C

Das erhaltene RT-PCR-Produkt wurde durch Agarosegelelektrophorese analysiert (2.2.8).

---

<sup>2</sup> Für die Arbeiten mit *C. diphtheriae* wurden die erforderlichen Labore freundlicherweise von Prof. Liesenfeld, Charité, Campus Benjamin Franklin, Institut für Mikrobiologie und Hygiene zur Verfügung gestellt.

## 2.2.7 Restriktionsverdau

Ein Restriktionsverdau wurde in der Regel mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig durchgeführt (Doppelverdau), um als Ergebnis aus einem Vektor eine bestimmte von zwei Restriktionsschnittstellen eingerahmte Sequenz auszuschneiden (Tab. 2.8).

**Tab. 2.8:** Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für einen Doppelverdau.

Reagens	Menge
präparierte Plasmid-DNA (etwa 0,5 µg/µl)	2,0 µl
Restriktionsenzym 1 (10 U/µl)	0,2 µl
Restriktionsenzym 2 (10 U/µl)	0,2 µl
10 × Restriktionsenzympuffer	1,0 µl
MilliQ-Wasser	ad 10,0 µl

Die Reaktionsansätze wurden mindestens 1 h bei 37 °C (25 °C für ApaI) inkubiert und die Produkte anschließend auf einem Agarosegel analysiert (2.2.8). Wenn an den Reaktionen Restriktionsendonukleasen mit unterschiedlichem Temperaturoptimum beteiligt waren, wurde zunächst 1 h bei der geringeren Temperatur inkubiert und anschließend 1 h bei der höheren Temperatur. Als Puffer wurden die zu den Restriktionsendonukleasen vom Hersteller NEB empfohlenen Puffer verwendet.

Für einen Einfachverdau wurde nur eine Restriktionsendonuklease eingesetzt. Ansonsten wurden die gleichen Bedingungen wie für einen Doppelverdau eingehalten. Da die DNA nach einem Einfachverdau direkt weiter verwendet wurde, wurde die Restriktionsendonuklease durch 20 min Inkubation bei 65 °C hitzeinaktiviert. War die zu verdauende DNA ein Oligonukleotid, so wurde für einen Einfachverdau 1,1 µg Oligonukleotid (phosphoryliert und dimerisiert) eingesetzt. Für den Einfachverdau eines PCR-Produktes wurde das Gesamtvolumen verdoppelt und 17,8 µl des PCR-Produktes mit 2 µl des Restriktionsenzympuffers und 2 U des Restriktionsenzymes versetzt.

## 2.2.8 DNA-Agarosegelelektrophorese

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,2

**Ethidiumbromidlösung:** 10 mg/ml

**6 × DNA-Ladepuffer:** 60 % (w/v) Saccharose, 20 mM EDTA, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau

Zur Analyse von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen wurden 10 µl des Ansatzes mit 2 µl 6 × Ladepuffer versetzt auf ein Agarosegel aufgetragen. In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden DNA wurden 1%ige, 1,5%ige oder 2%ige Agarosegele verwendet. Von den Markern (2.1.10) wurden 4 µl eingesetzt. Die Verwendung des jeweiligen Markers war abhängig von der erwarteten Fragmentgröße. Die Elektrophorese

wurde bei 100 V für 30 min durchgeführt und anschließend eine Aufnahme des Gels unter UV-Licht gemacht.

## 2.2.9 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen wurde mit dem »QIAquick Gel Extraction Kit« (2.1.5) durchgeführt. Die Reinigung der DNA erfolgte durch Bindung an einen Anionenaustauscher und Elution durch Wasser. Unter UV-Licht wurden Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit 60–120 µl QB-Puffer in Abhängigkeit der Größe des Gelfragmentes unter regelmäßigem Schütteln 10 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in ein Zentrifugationsfiltergefäß überführt. Nach der Zentrifugation (1 min, 10 000 × g) wurde das Zentrifugationsfiltergefäß (aus dem Kit) mit 800 µl PE-Puffer gewaschen und zweimal zentrifugiert (1 min, 10 000 × g). Dann erfolgte die Elution der DNA mit 20 µl MilliQ-Wasser nach 1 min Inkubation auf dem Zentrifugationsfiltergefäß durch Zentrifugation (1 min, 10 000 × g).

## 2.2.10 Ligation von DNA

Die Ligation mit der T4-DNA-Ligase war der Standardprozess für Ligationen. Die Ligation mit dem »TOPO TA Cloning Kit« wurde nur für die Klonierung von PCR-Produkten verwendet.

### 2.2.10.1 Ligation mit T4-DNA-Ligase

Die Ligation dient der Synthese einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Strängen. Für die Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase (2.1.12) mit dem Ligasepuffer verwendet. Die Ligationen wurden nach dem folgenden Schema durchgeführt (Tab. 2.9).

**Tab. 2.9:** Zusammensetzung eines Ligationsansatzes mit T4-DNA-Ligase.

Reagens	Menge
geschnittener Vektor (etwa 0,5 µg/µl)	2–4 µl
<i>insert</i> <sup>a</sup>	1–6 µl
T4-DNA-Ligase (2 U/µl) (aus dem Kit)	1 µl
10 × T4-DNA-Ligasepuffer (aus dem Kit)	1 µl
PEG 4 000 (50 % (w/v), aus dem Kit)	1 µl
MilliQ-Wasser	ad 10 µl

<sup>a</sup> Bei dem *insert* kann es sich um aus einem Vektor herausgeschnittene DNA, um ein Oligonukleotid oder um ein geschnittenes Oligonukleotid handeln.

Das *insert* und der Vektor wurden etwa im Massenverhältnis 3:1 eingesetzt, wobei die eingesetzten Mengen anhand einer Schätzung aus der Intensität der Banden im Agarosegel kalkuliert wurden. Die Proben wurden mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz noch 10 min bei 65 °C inkubiert, um den Ligase-DNA-Komplex zu dissoziieren und damit die Effektivität der anschließenden Transformation zu

erhöhen. Für die Ligation von *blunt end* DNA wurde die doppelte Menge an Ligase und 0,5 mM ATP eingesetzt. Die Ligation wurde dann über Nacht bei 16 °C inkubiert.

### 2.2.10.2 Ligation mit dem »TOPO TA Cloning Kit«

Für die Ligation von PCR-Produkten wurde das »TOPO TA Cloning Kit« (2.1.5) verwendet. Die Besonderheit des bei diesem System verwendeten pCR2.1-TOPO-Vektors ist eine mit dem offenen Plasmid verknüpfte Topoisomerase, die einen anderen DNA-Strang mit dem Vektor verbinden kann und dabei freigesetzt wird. Topoisomerasen dienen der Relaxation von DNA-Strängen, indem sie Phosphodiesterbindungen spalten und dabei eine kovalente Bindung mit der DNA ausbilden. Durch eine chemische Reaktion mit einer 5'-Hydroxylgruppe eines anderen DNA-Stranges wird die Topoisomerase freigesetzt und die DNA-Stränge werden verbunden. Die Topoisomerase am pCR2.1-TOPO-Vektors verknüpft zugesetzte DNA mit dem Vektor in einer Reaktion analog zum Verbinden entwundener Stränge. Da die PCRs (2.2.1) mit Taq-Polymerase durchgeführt wurden, weisen die Amplifikate an den 3'-Enden einen Überhang durch ein Adenosin auf. Daher besitzt der pCR2.1-TOPO-Vektor an den 3'-Enden einen Thymidinüberhang, wodurch das PCR-Produkt problemlos mit dem Vektor ligiert werden kann.

**Tab. 2.10:** Zusammensetzung einer Ligation mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor.

Reagens	Menge
pCR2.1-TOPO-Vektor	1 µl
PCR-Produkt (etwa 100 ng/µl)	1 µl
<i>Salt Solution</i> (aus dem Kit)	1 µl
MilliQ-Wasser	ad 6 µl

Der Ligationsansatz wurde 30 min inkubiert.

### 2.2.11 Transformation

Die Transformation dient der Aufnahme von Vektoren in transformationskompetente *Escherichia coli*-Zellen (*E. coli*). Die Transformation wurde nach der Methode von Hanahan *et al.* durchgeführt [80]. Dabei erfolgt die Aufnahme der Plasmide in die Zellen durch einen Hitzeschock. Den 10 µl-Ligationsansätzen (6 µl mit dem »TOPO TA Cloning Kit«) wurden 70 µl kompetente Zellen zugesetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Bei einer Transformation aufgereinigter Plasmid-DNA wurden zu 0,5 µl Plasmidlösung 30 µl kompetente Zellen pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C und dann sofort ein Abkühlen auf Eis für 1 min. Die Zellen wurden mit 300 µl LB-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation (1 min, 4 000 × g) wurden 300 µl Medium abgenommen und der Rest auf

LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.12 Sequenzierung von DNA

Um die erhaltenen Produkte zu sequenzieren, wurde das »BigDye Terminator v1.1 Kit« und das »Template Suppression Reagent« (2.1.5) verwendet. Die Sequenzierung der DNA erfolgte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* [170], bei der eine PCR mit nur einem Primer durchgeführt wird. Zum Abbruch der DNA-Synthese kommt es durch 3',5'-Didesoxynukleotide im Reaktionsgemisch, die von der Polymerase erkannt und in den neuen DNA-Strang eingebaut werden. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe verhindern die Didesoxynukleotide jedoch Verlängerungen des Stranges und bewirken einen Abbruch der Synthese, statistisch zufällig, an irgendeiner Stelle der wachsenden Kette. Sie tragen unterschiedliche Fluorophore, aufgrund deren Emissionseigenschaften nach Auftrennung der Kettenabbruchprodukte im Sequenziergerät (2.1.1.5) die Sequenz bestimmt werden kann.

Für die Sequenzierungsreaktion wurden der Universal Primer, T7pBS, RFT5 183 for und DTA-265 for eingesetzt (Tab. 2.11).

**Tab. 2.11:** Zusammensetzung der Sequenzieransätze.

Reagens	Menge
aufgereinigtes Plasmid (etwa 0,5 µg/µl)	1 µl
Primer (10 µM)	0,5 µl
BDT v1.1 (aus dem Kit)	0,25 µl
5 × Puffer	1,875 µl
MilliQ-Wasser	ad 10 µl

In der PCR-Maschine (2.1.1.1) wurde folgendes Programm durchlaufen:

- 96 °C, 1 min
- 25 Zyklen: 96 °C, 10 s  
50 °C, 5 s  
60 °C, 4 min
- 15 °C

Die erhaltenen Kettenabbruchprodukte wurden auf DyeEx-Säulen (aus dem Kit) aufgetragen, nachdem diese vorher zum Beseitigen von Restwasser zentrifugiert wurden (3 min, 800 × g). Die Proben wurden durch eine zweite Zentrifugation (3 min, 800 × g) durch die Säulen zentrifugiert und 5 min im Vakuumkonzentrator eingeeengt. Die verbliebene Restlösung wurde mit 20 µl *template suppression reagent* vermischt, 3 min auf 96 °C erhitzt und im Sequenzierer analysiert (2.1.1.5).

### 2.2.13 Lagerung von *E. coli* in Glycerol

Zur Aufbewahrung von gentechnisch veränderten Organismen wurden 567 µl einer Bakterienkultur mit 100 µl 100%igem Glycerol versetzt und bei -20 °C gelagert.

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Expression von Proteinen in *E. coli*

Die Expression von Proteinen in *E. coli* erfolgte im Rosetta (DE3) pLysS-Stamm, da dieser zusätzliche tRNAs seltener Codons von *E. coli* besitzt und damit eine wesentlich verbesserte Expression von Proteinen anderer Organismen erreicht werden kann. Von den Bakterien üblicherweise nur selten verwendete Codons können dann in der Proteinbiosynthese gleichermaßen abgelesen werden.

Für die Expression wurden einzelne Kolonien von den LB-Agarplatten gepickt und in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht bei 220 Umdrehungen pro Minute im Warmluftrundschüttler bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde dann in 150 ml neues LB-Medium mit Ampicillin überführt und unter den gleichen Bedingungen kultiviert, bis eine optische Dichte bei  $\lambda = 600$  nm von 0,4–0,6 erreicht wurde. Dann wurde eine Endkonzentration von 1 mM Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid zum Auslösen der Expression eingestellt. Die Kulturen wurden weitere 3 h inkubiert und die Zellen schließlich in einer Zentrifugation (15 min, 5 000  $\times$  g, 4 °C) pelletiert. Die Pellets wurden in etwa 10 ml PBS vollständig resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.3.2 Proteinexpression in Hefe

**YEPD:** 10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, pH 7,0, autoklaviert, vor Verwendung auf 2 % (w/v) sterilfiltrierte Glucose eingestellt

Für die Aufreinigung von His-tag-EF2 (<sup>H6</sup>EF2) wurde der *S. cerevisiae* Stamm TKY675 kultiviert (2.1.7). Dieser Stamm exprimiert nur <sup>H6</sup>EF2 und keinen unmarkierten EF2, da die für den endogenen EF2 kodierende DNA durch Mutationen verändert wurde.

Es wurde eine einzelne Kolonie von einer YEPD-Platte gepickt und in 20 ml YEPD-Medium 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde diese Vorkultur in 400 ml YEPD-Medium überführt und weitere 2 Tage bei 30 °C im Inkubationsschüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann zentrifugiert (10 min, 4 000  $\times$  g, 4 °C) und die Zellen bei -20 °C gelagert.

## 2.3.3 Proteinaufreinigung über Ni-NTA-Affinitätschromatographie

### 2.3.3.1 Native Aufreinigung aus *S. cerevisiae*

**Puffer A<sub>10</sub>:** 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,6, 300 mM Kaliumchlorid, 10 mM Imidazol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,4 mM PMSF

**Puffer A<sub>20</sub>:** 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,6, 300 mM Kaliumchlorid, 20 mM Imidazol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,4 mM PMSF

**Puffer A<sub>250</sub>:** 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,6, 300 mM Kaliumchlorid, 250 mM Imidazol, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 0,4 mM PMSF

Bei der Aufreinigung von Proteinen über eine Nickel-Nitrilotriacetat-Säule (Ni-NTA-Säule) wird die Bindung von einer Abfolge von üblicherweise 6–10 Histidinresten (*His-tag*) des Proteins an Ni-NTA ausgenutzt, um reine Proteine zu gewinnen. Die pelletierten Hefezellen (2.3.2) wurden in 20 ml Puffer A<sub>10</sub> resuspendiert und mit dem halben Volumen *glassbeads* versetzt. Der Aufschluss der Hefen erfolgte durch Vortexen (20 × 20 s) wobei die Proben zwischen den Schritten jeweils mindestens 1 min auf Eis gelagert wurden. Der Überstand des Aufschlusses wurde durch zwei aufeinander folgende Zentrifugationen gewonnen (20 min, 3 400 × g, 4 °C und 30 min, 110 000 × g, 4 °C) und auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 2 ml Puffer A<sub>10</sub> und 8 ml Puffer A<sub>20</sub> entfernt. Die Elution des mit *His-tag* markierten Proteins erfolgte mit 5 ml Puffer A<sub>250</sub>.

### 2.3.3.2 Aufreinigung aus *E. coli*

#### Puffer für denaturierende Aufreinigung

**Puffer B:** 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, pH 8,0

**Puffer B<sub>20</sub>:** 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 20 mM Imidazol, pH 8,0

**Puffer B<sub>250</sub>:** 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 10 mM Tris, 8 M Harnstoff, 250 mM Imidazol, pH 8,0

**Dialysepuffer:** 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 10 mM Tris, 0,5–2 M Harnstoff, 3 mM reduziertes Glutathion, 0,3 mM oxidiertes Glutathion, pH 8,0

#### Puffer für native Aufreinigung

**Puffer C<sub>30</sub>:** 50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 30 mM Imidazol, pH 8,0

**Puffer C<sub>50</sub>:** 50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 50 mM Imidazol, pH 8,0

**Puffer C<sub>100</sub>:** 50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 100 mM Imidazol, pH 8,0

**Puffer C<sub>150</sub>:** 50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 150 mM Imidazol, pH 8,0

Die in PBS resuspendierten Zellen der Expression (2.3.1) wurden im Wasserbad aufgetaut und durch  $5 \times 20$  Ultraschallpulse (Sonopuls HD 2200, 20 % Leistung) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (30 min,  $16\,100 \times g$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen *Inclusion bodies* abgetrennt. Für die native Aufreinigung von Proteinen wurde der Überstand dieser Zentrifugation auf die Ni-NTA-Säule (0,5 ml Ni-NTA-Agarose) aufgetragen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die Säule mit 4 ml Puffer C<sub>30</sub> und 4 ml Puffer C<sub>50</sub> gewaschen. Dann wurde das gebundene Protein mit  $3 \times 1$  ml Puffer C<sub>100</sub> und  $3 \times 1$  ml Puffer C<sub>150</sub> von der Säule eluiert. Die eluierten Proteine wurden  $3 \times 20$  min gegen PBS dialysiert.

Die *Inclusion bodies* wurden einmal mit Wasser gewaschen, in 400  $\mu\text{l}$  Puffer B resuspendiert und unter Drehen am Überkopfschüttler 30 min inkubiert. Der Überstand der folgenden Zentrifugation (30 min,  $16\,100 \times g$ ) wurde auf die Ni-NTA-Säule (0,5 ml Ni-NTA-Agarose) geladen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und die Säule mit 5 ml Puffer B<sub>20</sub> gewaschen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit  $3 \times 1$  ml Puffer B<sub>250</sub> von der Säule eluiert. Die folgende Dialyse der denaturierend aufgereinigten Proteine diente der Renaturierung und wurde langsam durch in mehreren Schritten abgesenkte Harnstoffkonzentrationen erreicht. Die erste Dialyse (etwa 12 h) wurde gegen den Dialysepuffer durchgeführt, danach folgten zwei Dialysen (jeweils etwa 24 h) gegen den Dialysepuffer mit 1 M und 0,5 M Harnstoff. Anschließend wurde zweimal gegen 20 mM Tris, pH 8,0 dialysiert (zusammen 24 h) und zweimal gegen PBS (zusammen 24 h). Die Dialysen wurden jeweils gegen ein Volumen von 400–500 ml durchgeführt. Um während der Dialyse ausgefallene Proteine zu entfernen, wurden die Proben zentrifugiert (10 min,  $16\,100 \times g$ ,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ ).

### 2.3.4 Anreicherung von EF2 aus Weizenkeimlingen

**Puffer 1:** 50 mM Tris, 5 mM Magnesiumacetat, 50 mM Kaliumchlorid, 4 mM Calciumchlorid, 5 mM 2-Mercaptoethanol, pH 8,0

**Puffer 2:** 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (frisch zugesetzt), pH 7,5

Die Präparation von EF2 erfolgte nach Passador *et al.* [154]. Für sämtliche Arbeitsschritte wurde bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  und mit vorgekühlten Puffern gearbeitet. Weizenkörner (ungefähr 100 g) wurden zunächst 2 h in Wasser und danach im Dunkeln in einer feuchten Atmosphäre zum Auskeimen bei Raumtemperatur für etwa 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Keimlinge abgeschnitten und mit der 8fachen Menge (v/w) Puffer 1 versetzt. Die durch einen Ultra-Turrax homogenisierte Suspension ( $5 \times 10$  s, 800 Umdrehungen pro min) wurde unter Nachspülen von Puffer 1 durch unsterile Gaze filtriert. Nach Zentrifugation (15 min,  $21\,000 \times g$ ) wurde der Überstand mit Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt, rezentri-

fugiert und der Überstand mit Kaliumchlorid auf eine Endkonzentration von 0,1 M eingestellt. Nach Ultrazentrifugation (1 h, 200 000 × g) wurde der Überstand mit festem Ammoniumsulfat gefällt. Zuerst wurden 20 % (w/v) Ammoniumsulfat eingestellt und weitere 30 min gerührt. Anschließend wurde zentrifugiert (30 min, 17 000 × g), der Überstand auf 40 % (w/v) Ammoniumsulfat eingestellt und weitere 30 min gerührt. Das Pellet der nachfolgenden Zentrifugation (30 min, 17 000 × g) wurde in 3 ml Puffer 2 resuspendiert. Nach mehrfacher Dialyse gegen Puffer 2 wurden Präzipitate einer abschließenden Zentrifugation (20 min, 20 000 × g) verworfen und der Überstand in Aliquots bei –80 °C eingefroren.

### 2.3.5 SDS–Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS–PAGE)

**Laufpuffer:** 192 mM Glycin, 20 mM Tris, 0,1 % SDS

**4 × Probenpuffer:** 0,25 M Tris, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, 8 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, pH 6,8

**Trenngelpuffer:** 1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS

**Sammelgelpuffer:** 0,5 M Tris, pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS

**Acrylamidmix:** 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid

Die SDS–PAGE wurde nach der Methode von Laemmli [112] im CBS-Gelkammersystem (2.1.1.1) durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurden 10%ige oder 12%ige Trenngele und 4,5%ige Sammelgele verwendet (Tab. 2.12).

**Tab. 2.12:** Ansätze für Trenn- und Sammelgele.

Reagens	10 % Trenngel	12 % Trenngel	4,5 % Sammelgel
Wasser	1 770 µl	1 488 µl	800 µl
Trenngelpuffer	1 062 µl	1 062 µl	-
Sammelgelpuffer	-	-	333 µl
Acrylamidmix	2 124 µl	1 700 µl	200 µl
10 % APS <sup>a</sup>	30 µl	30 µl	10 µl
TEMED <sup>b</sup>	3 µl	3 µl	3 µl

<sup>a</sup> Ammoniumperoxodisulfat

<sup>b</sup> Tetramethylethylendiamin

Von den aufzutragenden Proben wurden 15 µl, 24 µl oder 30 µl mit jeweils 1/3 des Volumens 4 × Probenpuffer vermischt und 3 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben vollständig auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 30 mA pro Gel mit 200 V für 65 min mit dem Laufpuffer durchgeführt.

### 2.3.6 Coomassiefärbung von SDS–Gelen

**Färbelösung:** 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol, 0,1 % (w/v) Coomassie Blau R-250

**Entfärber:** 10 % (v/v) Essigsäure, 20 % (v/v) Ethanol

Die Coomassiefärbung beruht auf der Anlagerung des Coomassiefarbstoffes an hydrophobe Bereiche der Proteine. Nach der SDS-PAGE wurden die Sammelgele von den Trenngelen abgetrennt und in einer Schale mit Färbelösung bedeckt. Das Gel mit der Färbelösung wurde unter Schütteln für mindestens 30 min inkubiert. Nach Abgießen der Färbelösung wurde das Gel kurz mit Wasser gespült und über Nacht mit Entfärber geschüttelt. Der Entfärber wurde ausgetauscht und das Gel nochmals einige Stunden entfärbt.

### 2.3.7 Westernblot und Immunodetektion

**Semidry-Blotpuffer:** 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Ethanol, 0,04 % SDS

**PBSB<sub>0,2</sub>:** PBS mit 0,2 % (w/v) Brij 58

**Magermilchlösung:** PBSB<sub>0,2</sub> mit 5 % (w/v) Magermilch

Zur Detektion der Proteine durch Antikörper musste zunächst der Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgen. Dazu wurde das *Semidry*-Blotverfahren angewandt. Das Gel und die gleich große Nitrocellulosemembran wurden jeweils für 5 min im *Semidry*-Blotpuffer vorinkubiert. Dann wurde das Gel auf die Membran gelegt und diese zwischen je zwei mit *Semidry*-Blotpuffer angefeuchteten Filterpapieren in der Größe des Gels auf die Anode der Blotkammer gelegt. Nach Verschließen der Blotkammer wurde der Proteintransfer durch Anlegen einer Spannung von 10–12 V für 20–40 min durchgeführt.

Nach dem Transfer erfolgte die Immunodetektion. Zunächst wurde die Membran zum Blockieren nichtspezifischer Proteinwechselwirkungen 10 min in Magermilchlösung auf einem Kippschüttler inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers GABiotin in frisch zugesetzter Magermilchlösung in einer Verdünnung von 1:10 000 mit anschließender Inkubation über Nacht auf einem Kippschüttler bei 4 °C. Zweimaliges kurzes Spülen (weniger als 1 min) in PBSB<sub>0,2</sub> und einmaliges Waschen der Membran für 5 min in PBSB<sub>0,2</sub> entfernte nicht gebundene Antikörper von der Membran. Anschließend wurde der Sekundärantikörper RAG 1:5 000 in PBSB<sub>0,2</sub> verdünnt für 30 min auf der Membran inkubiert. Nicht gebundener Sekundärantikörper wurde wie oben beschrieben abgelöst. Es folgten mindestens zwei weitere Waschschriffe mit PBSB<sub>0,2</sub> für jeweils 5 min. Dann wurde die Membran zweimal kurz mit ELIX-Wasser gespült und einmal 5 min mit ELIX-Wasser auf dem Kippschüttler gewaschen. Zuletzt wurden je 0,5 ml der beiden *enhanced chemiluminescence*-Reagenzien vermischt und 1 min auf der zuvor durch Auflegen auf Filterpapier etwas abgetrockneten Membran inkubiert. Abschließend wurde die Membran wieder kurz auf Filterpapier getrocknet, dann in einer lichtundurchlässigen Kassette in eine Folie gelegt und auf diese ein Film gelegt. Der Film wurde nach 2 min entwickelt und dann ein zweiter Film für 5 min auf die Membran gelegt und ebenfalls entwickelt (2.1.1.3).

### 2.3.8 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Um die Konzentrationen von Proteinen zu erhöhen, wurden die Lösungen auf Amicon-Säulen pipettiert und mehrmals einige Minuten zentrifugiert ( $3\,400 \times g$ ), bis das Volumen auf etwa 0,5–1 ml eingeeengt war. Dabei passieren nur kleine Moleküle bis zu einer bestimmten Ausschlussgröße die Poren eines Filters, wodurch sich die zu konzentrierenden Proteine über dem Filter ansammelten. Abhängig von der molekularen Masse der zu konzentrierenden Proteine wurden Amicon-Säulen mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa oder 50 kDa verwendet. In der Regel wurden aufkonzentrierte Proteine bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

Die Konzentrierung von  $^{\text{H}6}\text{EF2}$  konnte nicht mit Amicon-Säulen durchgeführt werden, da das Protein nach der Zentrifugation an der Membran adhierte. Stattdessen wurde das Eluat der Aufreinigung (2.3.3.1) in 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, 25 % (w/v) Polyethylenglycol 20 000, pH 7,4 für etwa 4 h bei  $4\text{ °C}$  inkubiert, bis das Volumen auf 0,5 ml verringert war. Danach wurde noch für 30 min gegen 20 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,4 dialysiert.

### 2.3.9 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit dem »Advanced Protein Assay Reagent-Kit« (2.1.5) durchgeführt. Dazu wurden zu 200  $\mu\text{l}$  der Färbelösung 10  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Proteinlösung gegeben. Nach Vermischen der Lösungen wurde die Absorption ohne Inkubationszeit bei  $\lambda = 595\text{ nm}$  am Mikroplatten-Photometer gemessen und anhand von mitgemessenen BSA-Standards die Proteinkonzentration ermittelt.

## 2.4 Zellbiologische Methoden und Zellkultur

### 2.4.1 Nachweis der ADP-Ribosylierungsaktivität *in vitro*

**EF2-Puffer:** 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (frisch zugesetzt), pH 7,4

Durch Affinitätschromatographie aufgereinigte chimäre Toxine wurden auf vorhandene ADP-Ribosylierungsaktivität untersucht. Hintergrund für diesen Nachweis ist die Diphtheriatoxin vermittelte Übertragung von ADP-Riboseeinheiten aus  $\text{NAD}^+$  auf den eukaryotischen EF2, der damit inaktiviert wird. Durch die Markierung des  $\text{NAD}^+$  mittels Biotin kann im Westernblot eine ADP-Ribosylierung am EF2 durch einen Antikörper gegen Biotin nachgewiesen werden [232]. Der Versuch wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt (Tab. 2.13).

**Tab. 2.13:** Zusammensetzung der Ansätze für den *In-vitro*-ADP-Ribosylierungsnachweis der chimären Toxine.

Reagens	Menge
EF2	4,0 µl
6-Biotin-17-NAD <sup>+</sup> (250 µM)	0,4 µl
Toxinlösung	1,0 µl
EF2-Puffer	ad 10,0 µl

Für die Reaktion wurde EF2 aus Weizenkeimlingen verwendet (2.3.4) und von den chimären Toxinen jeweils 1 ng eingesetzt. Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktionen durch Zugabe von 3 µl 4 × Probenpuffer (2.3.5) gestoppt. Nach 3-minütiger Inkubation bei 95 °C wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Westernblot (2.3.7) analysiert.

**Tab. 2.14:** Zusammensetzung der Ansätze für den *In-vitro*-ADP-Ribosylierungsnachweis mit <sup>H6</sup>EF2.

Reagens	Menge
<sup>H6</sup> EF2 (etwa 300 ng/µl)	1,0 µl
6-Biotin-17-NAD <sup>+</sup> (250 µM)	0,5 µl
Diphtheriatoxin	1,0 µl
EF2-Puffer	ad 24,0 µl

Die Konzentration von <sup>H6</sup>EF2 (2.3.3.1) betrug etwa 300 ng/ml. Von Diphtheriatoxin wurden verschiedene Mengen eingesetzt, um Endkonzentrationen von 1–100 ng/ml zu erhalten. Zu einigen Proben wurden 1 µl oder 10 µl BSA (300 ng/µl) oder 5 µl Guanosintrisphosphat (250 µM), gegeben. Die Ansätze wurden 120 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktionen durch Zugabe von 3 µl 4 × Probenpuffer (2.3.5) gestoppt. Nach 3-minütiger Inkubation bei 95 °C wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Westernblot (2.3.7) analysiert.

## 2.4.2 Zellkultur

### 2.4.2.1 Zellkultur von HER14- und NIH-3T3-Zellen

**Kulturmedium:** Dulbecco's *modified eagle medium* High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % *fetal calf serum*

**Kulturbedingungen:** 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid, 95 % Luftfeuchtigkeit

HER14- und NIH-3T3-Zellen (2.1.14) sind adhärenente Zellen, die im Kulturmedium auf 0,1 % Gelatine beschichteten Petrischalen als Monolayer wachsen. Zum Passagieren der Zellen wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, einmal mit 5 ml Dulbecco's PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und 0,3 ml Trypsin-EDTA (2.1.13) auf die Zellen pipettiert. Nach 3 min Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen in 3 ml Kulturmedium

resuspendiert und in neue Schalen überführt. Dort wurden sie 1:5 mit frischem Medium verdünnt. Bei Bedarf wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

#### 2.4.2.2 Zellkultur von L540Cy-Zellen

**Kulturmedium:** RPMI 1640 mit L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 20 % *fetal calf serum*

**Kulturbedingungen:** 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid, 95 % Luftfeuchtigkeit

Bei L540Cy-Zellen (2.1.14) handelt es sich um Suspensionszellen. Zum Passagieren der Zellen wurde 1 ml der Zellsuspension in eine neue Schale gegeben und mit 9 ml frischem Kulturmedium verdünnt. Bei Bedarf wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt.

#### 2.4.3 Colorimetrischer Festphasenassay

**Färbelösung:** 40 mM Citronensäure, pH 3,95, 0,02 % (v/v) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und 0,01 % (v/v) Wasserstoffperoxid (frisch zugesetzt) und filtriert

**PBST<sub>0,05</sub>:** PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20

Der colorimetrische Festphasenassay ist eine Methode zum quantitativen Nachweis von Protein-Proteininteraktionen. Die Detektion der Proteine erfolgt, ähnlich dem Westernblot, über Primärantikörper und Sekundärantikörper. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Einerseits sollte die Bindung von chimären Toxinen an eukaryote Zellen nachgewiesen werden, andererseits sollte der zuvor beschriebene Nachweis der ADP-Ribosylierungsaktivität *in vitro* in der Festphase erfolgen.

Bei beiden Methoden wurde folgende Waschprozedur verwendet. Mit der Mikrowell-Waschvorrichtung wurde die zu entfernende Lösung aus den Vertiefungen gesaugt und dann in jede Vertiefung  $3 \times 200 \mu\text{l}$  PBST<sub>0,05</sub> gegeben und sofort wieder abgesaugt. Anschließend wurden nochmals 200 µl PBST<sub>0,05</sub> eingefüllt und die Mikroplatte wurde 5 min in einem Schüttler inkubiert. Dann folgte die gleiche Waschprozedur mit drei Waschschrritten und dem vollständigen Absaugen der letzten Waschlösung.

Nach Entfernen des Sekundärantikörpers und erneutem Waschen wurden jeweils 100 µl der Färbelösung in die Vertiefungen pipettiert und im Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 2 M Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und die Konzentration des gebildeten gelben Farbstoffes wurde am Mikroplatten-Photometer bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  gemessen. Um minimale Variationen in der Schichtdicke der Vertiefungen zu korrigieren, wurde von jedem Messwert die Absorption bei  $\lambda = 492 \text{ nm}$  abgezogen.

### 2.4.3.1 Bindung chimärer Toxine an Zellen

**Blockierungslösung:** PBS + 10 % *fetal calf serum* und 3 % (w/v) BSA

Für die Untersuchung der Bindung der chimären Toxine wurden 25 000 HER14 oder NIH-3T3 Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium (2.4.2.1) in die mit 0,1 % Gelatine vorinkubierten Vertiefungen der Maxi Sorb U16 Module pipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 5 % Kohlenstoffdioxid im Brutschrank wurden die Zellen zweimal mit 200  $\mu$ l Dulbecco's PBS mit Calcium und Magnesium gewaschen und in 100  $\mu$ l Kulturmedium mit einer Endkonzentration von 100 nM des zu untersuchenden chimären Toxins 2 h inkubiert. Die Messungen erfolgten als Vierfachbestimmung und wurden bei 4 °C und bei 37 °C durchgeführt. Um die Spezifität der Bindung bei 4 °C zu untersuchen, wurden Zellen mit 50  $\mu$ l 1 nM EGF in Kulturmedium 10 min bei 4 °C vorinkubiert und erst dann die chimären Toxine in weiteren 50  $\mu$ l Kulturmedium für die zweistündige Inkubation zugesetzt. Anschließend wurde viermal mit 200  $\mu$ l Dulbecco's PBS mit Calcium und Magnesium gewaschen und für 15 min mit 150  $\mu$ l 1 % Paraformaldehydlösung fixiert. Für die Messung der Bindung bei 4 °C wurden Dulbecco's PBS und die Paraformaldehydlösung vorgekühlt. Nach der Fixierung der Zellen wurde nach jeder Inkubation die oben beschriebene Prozedur zum Waschen der Zellen eingesetzt. Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur. Zum Blockieren wurden alle Vertiefungen mit 200  $\mu$ l der Blockierungslösung 30 min inkubiert. Als Primärantikörper wurde der polyklonale  $\alpha$ DT in einer Verdünnung von 1:2 000 verwendet und als Sekundärantikörper RAG in einer Verdünnung von 1:2 000. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte jeweils in Blockierungslösung für 45 min. Abschließend wurde mit der Färbelösung und der Messung wie oben beschrieben verfahren. Die Farbentwicklung wurde jeweils nach 10 min gestoppt.

### 2.4.3.2 Festphasennachweis der ADP-Ribosylierung

**ADP-Ribosylierungspuffer:** 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol (kurz vor Verwendung zugesetzt), pH 7,4

**$^{\text{H}6}$ EF2-Lösung:** 1,5 ng/ml  $^{\text{H}6}$ EF2 (2.3.3.1) in ADP-Ribosylierungspuffer

**Blockierungslösung:** 0,1 % (w/v) Gelatine, 1 mM Dithiothreitol (kurz vor Verwendung zugesetzt)

Es wurden 100  $\mu$ l  $^{\text{H}6}$ EF2-Lösung in die Vertiefungen der Maxi Sorb U16 Module pipettiert und in einem Schüttler 120 min inkubiert. Die Lösung wurde entfernt und durch 150  $\mu$ l Blockierungslösung ersetzt und für 30 min inkubiert. Dann wurde einmal mit 200  $\mu$ l ADP-Ribosylierungspuffer gewaschen. In den Vertiefungen wurden dann die ADP-Ribosylierungsansätze angesetzt. Dazu wurde Diphtheriatoxin in unterschiedlichen Endkonzentrationen von 1–100 ng/ $\mu$ l in 100  $\mu$ l ADP-Ribosylierungspuffer mit 2  $\mu$ l 6-Biotin-

17-NAD<sup>+</sup> (250  $\mu$ M) angesetzt. Als Variation nach erfolgter Optimierung wurde auch BSA in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml eingesetzt und das 6-Biotin-17-NAD<sup>+</sup> zuletzt dem Ansatz zugesetzt. Die Proben wurden dann 120 min bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die oben beschriebene Waschprozedur und anschließend die Inkubation des Primärantikörpers GABiotin in einer Verdünnung von 1:2 000 in PBST<sub>0,05</sub> für 45 min. Im Folgenden wurde wie oben beschrieben gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper RAG in einer Verdünnung von 1:2 000 in PBST<sub>0,05</sub> für 45 min inkubiert. Abschließend wurde mit der Färbelösung und der Messung wie oben beschrieben verfahren.

### 2.4.4 Cytotoxizitätsassays

#### 2.4.4.1 Cytotoxizitätsassays an HER14- und NIH-3T3-Zellen

Zur Ermittlung der Cytotoxizität der chimären Toxine mit EGF als tumorspezifischem Liganden wurden Versuche an EGFR exprimierenden HER14-Zellen und an den entsprechenden untransfizierten NIH-3T3-Zellen durchgeführt. Um eine gute Adhäsion der Zellen zu erreichen, wurden die 96 Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit 100  $\mu$ l 0,1 % Gelatinelösung für einige Minuten vorinkubiert. Die Gelatinelösung wurde entfernt und anschließend 2 000 Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium in jede Vertiefung ausgesät und über Nacht bei 5 % Kohlenstoffdioxid im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch 180  $\mu$ l frisches Medium ersetzt. In jede Vertiefung wurden dann noch 20  $\mu$ l PBS mit unterschiedlichen Konzentrationen der chimären Toxine gegeben. Für die Versuche zur Analyse der Cytotoxizität von Saponinen wurden zu den Zellen nach den 180  $\mu$ l Kulturmedium 20  $\mu$ l PBS mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Saponine (2.1.3) gegeben. Um die Cytotoxizität der Kombination von Saponinen und chimären Toxinen zu ermitteln, wurden 180  $\mu$ l Kulturmedium mit 1,5  $\mu$ g/ml Saponin 5 min auf den Zellen inkubiert, bevor die chimären Toxine in 20  $\mu$ l PBS in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben wurden. Die Zellen wurden 48 h bei 5 % Kohlenstoffdioxid im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Überleben der Zellen in einem Assay mit Fluoresceindiacetat gemessen [147]. Der Assay beruht auf der Spaltung von Fluoresceindiacetat in Fluorescein, das anschließend fluorometrisch gemessen wird. Dazu wurde das alte Medium von den Zellen entfernt und die Zellen zweimal mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 1 h bei 37 °C mit 200  $\mu$ l Fluoresceindiacetatlösung (10 mg/ml Fluoresceindiacetat in PBS) inkubiert. Die Messung erfolgte durch Exitation bei  $\lambda = 485$  nm und Emission bei  $\lambda = 538$  nm am Mikroplatten-Fluoreszenz-Lesegerät Spectra MAX Gemini (2.1.1.4). Das Überleben der Zellen wurde anhand von Referenzen mit unbehandelten Zellen (100 % Überleben) und ohne Zellen (0 % Überleben) ermittelt. Für die Kombinationsmessungen mit Saponinen und chimären

Toxinen wurde der ermittelte Wert von Zellen, die mit 1,5 µg/ml Saponin behandelt wurden, als 100 % Überleben angesehen.

#### 2.4.4.2 Cytotoxizitätsassay an L540Cy-Zellen

Die Ermittlung der Cytotoxizität an L540Cy-Suspensionszellen erfolgte mit einem modifizierten MTT-Test. In 80 µl Kulturmedium (2.4.2.2) wurden 5 000 L540Cy-Zellen in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen ausgesät und über Nacht bei 5 % Kohlenstoffdioxid im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurden 20 µl PBS mit den chimären Toxinen in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen pipettiert und die Zellen dann weitere 72 h bei 5 % Kohlenstoffdioxid im Brutschrank inkubiert. Zur Ermittlung des Überlebens der Zellen wurden 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in Wasser) in jede Vertiefung pipettiert und 4 h bei 37 °C inkubiert. Durch lebende Zellen bildet sich ein violetter Formazanfarbstoff, der nach Auflösen photometrisch bestimmt werden kann. Dazu wurden 100 µl Isopropanollösung (Isopropanol mit 40 mM Salzsäure) in jede Vertiefung gegeben und die Platte gut abgedichtet über Nacht geschüttelt. Danach wurde die Absorption bei  $\lambda = 570$  nm gemessen. Zusätzlich wurde die Absorption bei  $\lambda = 630$  nm gemessen und von dem ersten Wert abgezogen, um minimale Variationen in der Schichtdicke der Vertiefungen zu korrigieren. Das Überleben der Zellen wurde anhand von Referenzen mit unbehandelten Zellen (100 % Überleben) und ohne Zellen (0 % Überleben) ermittelt.

#### 2.4.5 *Fluorescence activated cell sorting* (FACS)

**Blockierungslösung:** 1 % Ziegen Serum in PBS

Die Bindung der chimären Toxine mit Liganden für den IL2R wurde durch *fluorescence activated cell sorting* gemessen. Sämtliche Schritte wurden in Mikroreaktionsgefäßen bei 4 °C durchgeführt und alle Puffer waren vorgekühlt. Es wurden  $1 \times 10^6$  L540Cy-Zellen für jede Messung verwendet. Die Zellen wurden zentrifugiert (1 min,  $800 \times g$ ), zweimal mit 100 µl PBS gewaschen und jeweils rezentrifugiert. Dann wurden die Zellen 4 h mit chimären Toxinen in einer Konzentration von 100 nM in 100 µl PBS inkubiert und anschließend wieder zweimal mit PBS gewaschen. Zur Blockierung wurden die Zellen dann 30 min mit 100 µl Blockierungslösung inkubiert und anschließend wieder zweimal mit PBS gewaschen. Der erste Antikörper  $\alpha$ DT wurde 1 h in 100 µl Blockierungslösung in einer Verdünnung von 1:3 000 inkubiert. Der Antikörper wurde durch zwei Waschschrte mit 500 µl Blockierungslösung entfernt und der zweite Antikörper  $\alpha$ Ziege-FITC 30 min in 100 µl Blockierungslösung in einer Verdünnung von 1:50 mit den Zellen inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrten mit 500 µl Blockierungslösung wurden die Zellen in 150 µl PBS resuspendiert und am FACS-Messgerät die auftretende Fluoreszenz auf den Zellen gemessen.