

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

2.1.1 Elektrophorese und Westernblot

Entwicklermaschine Optimax Typ TR; MS Laborgeräte, Heidelberg

Geltrockner 583; Bio-Rad, München

Horizontal-Elektrophoresesystem Mini Sub Cell GT; Bio-Rad

Netzgeräte E 734, E 802; Consort, Turnhout, USA

Semi-Dry-Transferzelle Trans-Blot SD; Bio-Rad

Vertikal-Elektrophoresesystem für Minigele; CBS, Del Mar, USA

2.1.2 Zell- und Bakterienkultur

Begasungsbrutschrank BB 16; Heraeus-Christ, Hanau

Brutschrank B 6060; Heraeus-Christ

Lichtmikroskop Axiovert 25; Zeiss, Jena

Sterile Werkbank Herasafe HS 12; Heraeus-Christ

Warmlufttrumschüttler G 24 Environmental Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Edison, USA

2.1.3 Zentrifugen

Kühlzentrifuge RC-5 Superspeed (SS 34- und GSA-Rotoren); Sorvall / Du Pont, Bad Homburg

Tischzentrifuge 5415; Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge 5402, temperierbar; Eppendorf

Ultrazentrifuge Optima L 90 K (70.1 Ti-Rotor); Beckman-Coulter, München

Vakuumzentrifuge Centrivac; Heraeus-Christ, Hanau

Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R; Heraeus-Christ

2.1.4 Weitere Geräte

Analysenwaage BP 211 D; Sartorius, Göttingen

Chromatographieanlage ÄKTA Explorer; Amersham Biosciences, Freiburg

Feinwaage LC 821; Sartorius

Flachschtüttler 3016; GFL, Burgwedel

Fluoreszenz-Mikroplattenphotometer SpectraMax Gemini; Molecular Devices, Sunnyvale, USA

Kippschtüttler Rocky; Fröbel Labortechnik, Lindau

Lumiimager FujiFilm LAS-1000; FujiFilm, Düsseldorf

Lyophilisator Lyovac GT-2; Heraeus-Christ, Hanau

Mikroplattenphotometer SpectraMax 340 PC; Molecular Devices

pH-Meter pH 526 Multical; WTW, Weilheim

Photometer DU 640; Beckman-Coulter, München

Sequenzierautomat ABI Prism 310; Perkin Elmer, Weiterstadt

Thermocycler Trio-Thermoblock; Biometra, Göttingen

Überkopfschtüttler Reax 2; Heidolph, Schwalbach

Ultraschallstab Sonoplus HD 2200; Bandelin, Berlin

Wasseraufbereitungsanlage; Millipore, Neu Isenburg

Zelleinfrierer Nicool, Air Liquide (DMC); Marne La Vallée Cedex, France

2.2 Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Zell- und Bakterienkultur

Ampicillin; Sigma, Deisenhofen

Chloramphenicol; Sigma

Circle Grow-Medium; Bio 101, Carlsbad, USA

DMEM-Medium mit L-Alanyl-L-glutamin; Gibco BRL, Eggenstein

DMEM-Medium mit Glutamax; Gibco

Dulbecco-PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} ; Gibco BRL

Dulbecco-PBS⁺⁺ mit Ca^{2+} (0.9 mM) und Mg^{2+} (0.5 mM); Gibco BRL

Fetales Kälberserum (FCS); Biochrom KG, Berlin

Hefeextrakt; Roth, Karlsruhe

Isopropyl- β -D-thio-galaktopyranosid (IPTG); Roth

Kanamycin; Sigma

Penicillin G-Streptomycin (10000 U/ml, 10000 $\mu\text{g/ml}$); Gibco BRL

Select-Agar; Gibco BRL

Trypsin-EDTA (0.25 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA); Gibco BRL

2.2.2 Chemikalien

β -Mercaptoethanol (2-Sulfanylethan-1-ol); Merck, Darmstadt

Agarose NEEO Ultra; Roth, Karlsruhe

ATP (25 mM); Epicentre Technologies, Madison, USA

Brij 58 (Polyethylenglykolhexadecylether); Merck

Bromphenolblau; Serva, Heidelberg

Complete Protein-Inhibitor Mix; Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim

Coomassie Blue R-250; LKB, Bromma, Schweden

Desoxyribonucleosid-Triphosphat-Mix (dNTP) (je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Roche-Diagnostics GmbH

Dithiothreitol (DTT); Merck

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Merck

Fluoresceindiacetat; Sigma, Deisenhofen

Formaldehyd; Merck

HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure); Merck

Magermilchpulver; Nestlé, Frankfurt / Main

MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure); Calbiochem, Schwalbach

Natriumdodecylsulfat (SDS); Serva

Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonsäurefluorid); Roche-Diagnostics GmbH

PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid); Sigma

Ponceau S; Sigma

Rotiphorese GEL 30 (30 % (w/v) Acrylamid / 0.8 % (w/v) Bisacrylamid); Roth

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin); Sigma

Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol); Merck

Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol); Sigma

Alle weiteren, nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden von den Herstellern Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg) bezogen.

2.2.3 Primärantikörper

Ratten-IgG gegen HER1, Abcam, Cambridge, UK

Ratten-IgG gegen Saporin (Serum), BioGenes (Berlin)

2.2.4 Sekundärantikörper

Schwein-IgG gegen Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert (SAR*); DAKO, Glostrup, DK

Ziege-IgG gegen Ratte-IgG, HRP-konjugiert (GAR*), Abcam, Cambridge, UK

2.2.5 Enzyme

T4-Kinase; Roche-Diagnostics GmbH; Mannheim

5'-Nucleotidase; Sigma, Deisenhofen

Furinconvertase, human rekombinant (1 U/ μ l); Alexis, Grünberg

Anorganische Pyrophosphatase, Sigma

Pwo-DNA-Polymerase (5 U/ μ l); Roche-Diagnostics GmbH

T4-DNA-Ligase (2 U/ μ l); Epicentre Technologies, Madison, USA

T4-Polynucleotidkinase (PNK, 10 U/ μ l); Epicentre Technologies

Taq-DNA-Polymerase (1 U/ μ l); Roche-Diagnostics GmbH

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche-Diagnostics GmbH (Mannheim) oder New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

2.2.6 Kits

ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und Template Suppression Reagents; Perkin Elmer, Weiterstadt

BCA-(2,2'-Bicinchoninsäure-) Proteinbestimmungsreagenz; Pierce, Rockford, USA

GeneClean II Kit; Q-Biogene, Heidelberg

Pyrophosphat Detection Kit; Molecular Probes, Oregon, USA

Qiagen Plasmid Maxi Kit; Qiagen, Hilden

Qiagen Plasmid Mini Kit; Qiagen

Qiagen RNA midi Kits; Qiagen

Qiaquick Gelextraktionskit; Qiagen

Renaissance Plus Chemolumineszenzreagens; NEN Life Science Products, Boston, USA

2.2.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien

1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker; Invitrogen, Karlsruhe

100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker; Invitrogen

Affi-10-Säulenmaterial, Bio-Rad, München

Aufkonzentratoren, Centricon und Centriprep; Millipore, Neu Isenburg

Benchmark Protein-Molekulargewichtsmarker; Invitrogen

Benchmark vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (prestained); Invitrogen

Dialyseschläuche; Roth, Karlsruhe

Heringssperma DNA (hsDNA); Invitrogen

Mikrokollodiumhülsen; Serva, Heidelberg

Ni-NTA-Agarose; Qiagen, Hilden

Mono S HR 5 / 5; Pharmacia, Freiburg

Poly(A)-RNA; Invitrogen

Superdex 75 und 200 Säulenmaterial; Pharmacia

2.2.8 Oligonucleotide

Synthetische Oligonucleotide (siehe Tabelle 5) für DNA-Sequenzierungen oder PCR-Reaktionen wurden bei TIB Molbiol (Berlin), Metabion (Martinsried) oder BIG Biotech (Freiburg) bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Oligonucleotide

Bezeichnung	Größe	Sequenz
IH1-vor	60-mer	5'-gg CCg gCC ATg ggA <u>CAT CAT CAT CAT CAT CAT</u> CCC gCg gTC ACA TCA ATC ACA TTA gAT C-3'
IH2-rück	35-mer	5'-Cgg Cgg Cgg TTC gAA ATC TTA CgC CAg CTg ACT TC-3'
IH3-vor	37-mer	5'-gCC gCC AgA TCT CCA Tgg gTC AAT ACT CAT CTT TTT gT-3'
IH4-rück	21-mer	5'-AAA ATA ggC gTA TCA CgA ggC-3'
IH5-rück	36-mer	5'-ggC gAA TTC CTA ACA CAA gTC CTT CAg CTg CCT CAC-3'
IH6-vor	41-mer	5'-CCg CCg CCg CgT TCg AAT AAA gAT TAT gAT TTC ggg TTT gg-3'
IH7-vor	53-mer	5'-CT CAT ATg gCA gCC gTT CTT CTC CCT gTT CTT CTT gCC gCA CCC gCg ggC CCg-3'
IH8-rück	61-mer	5'-AAT TCg ggC CCg Cgg gTg Cgg CAA gAA gAA CAg ggA gAA gAA Cgg CTg CCA TAT gAg gTA C-3'
IH9-vor	36-mer	5'-TAT gTA TgT TCA CgA TgA AgT CgA TCg Tgg TCC TCA-3'
IH10-rück	36-mer	5'-TAT gAg gAC CAC gAT CgA CTT CAT CgT gAA CAT ACA-3'
IH11-vor	30-mer	5'-CAT ATg CTT Tgg TTT gCC CAA ATA CAT AAG-3'
IH12-rück	38-mer	5'-gCg AAT TCg CTA gCC TTT ggT TTg CCC AAA TAC ATA Ag-3'
IH13-vor	57-mer	5'-CgC gTC ATC gCC AgC CgC gCg gCA ATC gTg TCC gAC gCT CAC CCg ggT gTT AAT Agg-3'
IH14-rück	65-mer	5'-CCT TCC TAT TAA CAC CCg ggT gAg CgT Cgg ACA CgA TTg CCg CgC ggC Tgg CgA TgA CgC ggg CC-3'
IH15-vor	69-mer	5'-Cgg gAA TTC CAT ATg CCC TTA TCg TCA ATC TTC TCg CgC ATT ggg gAC CCT gCg ggC CCg CgT CAT CgC-3'
IH16-rück	22-mer	5'-AAA ggg AAT AAg ggC gAC ACg g-3'
IH17-vor	46-mer	5'-gCg CTA gCA Agg AgC ATg ATg TTC CCg ATg AAg TCg ATC gTg gTC C-3'
IH18-vor	27-mer	5'-ggg AAT AgT gAC TCT gAA TgT CCC CTg-3'
IH19-rück	30-mer	5'-gAA TTC TTA gCg CAg TTC CCA CCA CTT CAg-3'
IH20-vor	27-mer	5'-CGG CTA GCC CCG GGA ATT AGT GAC TCT-3'
IH21-rück	36-mer	5'-ggC CCg ggT gAg CgA CCg ACA CgA TTg CCg CgC ggC-3'
Reverse	23-mer	5'-AgC ggA TAA CAA TTT CAC ACA gg-3'
T 7	19-mer	5'-ggA AAC AgC TAT gAC CAT g-3'

2.2.9 Bakterienstämme

E. coli BL21(DE3) (Genotyp: F⁻ ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3))

E. coli DH5α (Genotyp: F⁻ Φ80dlacZΔM15Δ(lacZY A-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(rK⁻mK⁺) deoR thi-1 supE44 λ⁻ gyrA96 relA1)

E. coli TOP 10 (Genotyp: F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG)

E. coli Rosetta (DE3) (Genotyp: F⁻ ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3))

2.2.10 Bakterienmedien und Pufferlösungen

LB-Medium:	1 % (w/v) Difco Trypton-Pepton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7.0
SOC-Medium:	LB-Medium, 20 mM Glucose
LB-Agar:	1.5 % (w/v) Select-Agar in LB-Medium
2YT-Medium:	1.6 % (w/v) Difco Trypton-Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 0.5 % (w/v) NaCl, pH 7.0
PBS:	150 mM NaCl, 135 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
Dulbecco-PBS ⁺⁺ :	1.5 mM KH ₂ PO ₄ , 135 mM Na ₂ HPO ₄ , 35 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.9 mM CaCl ₂ , 0.5 mM MgCl ₂
M9-Salze (10 ×):	6 % (w/v) Na ₂ HPO ₄ , 3 % (w/v) KH ₂ PO ₄ , 0.5 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) NH ₄ Cl, Thiaminchlorid / HCl (1 mM)

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standardmäßig wurden in einem 20 µl-PCR-Ansatz 1–5 µg DNA, je 10 pmol sequenzspezifischer 5'- und 3'-Primer und je 250 µM dGTP, dATP, dCTP und dTTP in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 2.5 U Polymerase (Pwo) gestartet.

Nach einem 3-minütigen Denaturierungsschritt bei 96 °C folgten 25 Zyklen nach folgendem Temperatur- und Zeitschema: 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 1 min Primeranlagerung bei T_{annealing}, 90 sec Strangverlängerung bei 72 °C. Die Annealingtemperatur (T_{annealing}) variierte je nach verwendeten Primern und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_{\text{annealing}} = [4 \times n_{\text{C+G}} + 2 \times n_{\text{T+A}} - 5] \text{ °C}$$

n = Anzahl der Purin- bzw. Pyrimidinreste innerhalb des paarenden Anteils der Primersequenz

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

TAE:	40 mM Tris / Essigsäure, 1 mM EDTA
Probenpuffer (6 ×):	60 % (w/v) Saccharose, 20 mM EDTA, 0.02 % (w/v) Bromphenolblau
EtBr-Lösung:	1 % (w/v) Ethidiumbromid

In Abhängigkeit der Größe der erwarteten DNA wurden Agarosegele mit Konzentrationen zwischen 1.0 % und 2.0 % (w/v) gewählt. Zur Bereitung der Gele wurde Agarose in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst, auf etwa 50 °C abgekühlt, Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.2 µg/ml) zugesetzt und in die Gelschlitten gegossen. Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Probentaschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde je nach Größe der zu trennenden Fragmente 30–60 min bei 80 bis 100 V durchgeführt. Die Detektion erfolgte im Transilluminator durch Fluoreszenzemission im UV-Licht. Die Gele wurden durch einen Videoausdruck dokumentiert.

2.3.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Bande wurde unter UV-Lichtkontrolle mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und die DNA mithilfe des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.3.4 Restriktionsverdau

DNA-Spaltungen mittels Restriktionsendonukleasen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. In den Ansätzen (20 µl) wurden die empfohlenen Puffer verwendet, wobei pro µg DNA pro Schnittstelle 1 U Enzym eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte bei den empfohlenen Temperaturen über 1–16 h, je nach Lage der Schnittstellen auf der DNA. Die Effizienz wurde über Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.2) kontrolliert.

Im Falle einer anschließenden Klonierung wurde die geschnittene DNA entweder über eine Gelextraktion gereinigt oder die Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

2.3.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Im Anschluß an einen *blunt end* Restriktionsverdau wurde der 5'-Terminus des gewünschten Fragmentes durch Alkalische Phosphatase (*calf intestinal alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Dazu wurden 3–4 µg DNA (entsprechend 1 pmol freier 5'-Enden) in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 0.02 U Enzym im vom Hersteller (Invitrogen) empfohlenen Dephosphorylierungspuffer für 30 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym nachfolgend durch Hitze (30 min, 65 °C) in Gegenwart von 5 mM EDTA inaktiviert. Abschließend wurde die dephosphorylierte DNA wie unter 2.3.3 beschrieben aufgereinigt.

2.3.6 Phosphorylierung von DNA

Zur Ligation hybridisierter Oligonukleotide mussten die DNA-Fragmente zuvor mittels T4-Kinase phosphoryliert werden. Die Reaktion wurde in dem nach Angaben des Herstellers empfohlenen Puffer für 60 min bei 37 °C durchgeführt. Im Anschluss wurde die T4-Kinase für 20 min bei 60 °C hitzeinaktiviert.

2.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für einen Standard-Ligationsansatz von 10 µl wurde zum linearisierten Vektor (10–30 ng) das DNA-Fragment im 3-10fachen molaren Überschuss zugegeben. Dieser Ansatz wurde auf Eis gestellt und mit Wasser (Milli Q) auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Nach Zusatz von 1 µl des vom Hersteller empfohlenen (NEB) 10fach-Ligasepuffers wurde die Ligationsreaktion mit 1 µl T4-DNA-Ligase (2.5 U) gestartet. Die Ligation erfolgte bei 14 °C für 4–16 h.

2.3.8 Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach Hanahan

TFB I:	30 mM Kaliumacetat / Essigsäure, pH 5.8, 50 mM MnCl ₂ , 100 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerol
TFB II:	10 mM MOPS / NaOH, pH 7.0, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerol
TSS:	85 % (v/v) LB-Medium, 10 % (w/v) PEG 8 000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl ₂

Die Methode nach Hanahan [145] fand für die *E. coli*-Stämme Rosetta DE3 pLysS, BL21 (DE3) und DH5α Anwendung. Kompetente TOP 10 Zellen wurden käuflich erworben.

LB-Medium (100 ml) wurde mit einer Übernachtskultur (10 ml) angeimpft und bis zu einer OD₅₅₀ von 0.3 angezogen. Die Bakterien wurden pelletiert (3 300 × g, 10 min, 4 °C), in TFB I (30 ml) aufgenommen und nach 2 h auf Eis erneut zentrifugiert (850 × g, 5 min, 4 °C). Das Pellet wurde vorsichtig in TFB II (4 ml) resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei –80 °C. Für den Bakterienstamm *E. coli* DH5α wurde eine vereinfachte Methode angewendet. Statt in TFB I wurden die pelletierten Bakterien in TSS (10 ml) resuspendiert, mit Glycerol (2 ml) versetzt, in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

2.3.9 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Transformation kompetenter Bakterien wurde nach der Hitzeschock-Methode durchgeführt. Hierzu wurden 75 μl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 5 μl des Ligationsansatzes, bei reinen Plasmiden mit 10 ng DNA, versetzt und 30 min auf Eis ruhen gelassen. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec und nach Zugabe von 600 μl SOC-Medium eine Regenerationsphase von 60 min bei 37 °C unter langsamen Schütteln. Die Suspension wurde entweder auf LB-Agarplatten ausgestrichen (je 200 μl pro Agarplatte) oder für eine spätere Expression direkt in LB-Medium überimpft.

2.3.10 Präparation von Plasmid-DNA

2.3.10.1 Maxipräparation

Zur Aufreinigung großer Mengen an Plasmid-DNA (bis etwa 500 μg) wurde eine Reinigung über Maxisorb-500-Säulen (Qiagen) durchgeführt. Hierzu wurden zwischen 100 ml (für *high-copy* Plasmide) und 500 ml (für *low-copy* Plasmide) Übernachtskulturen nach den Anweisungen des Herstellers pelletiert, lysiert, und über die Maxisorb-500-Säulen (Qiagen Maxi-Kit) gereinigt. Die eluierte DNA wurde durch Zugabe von 2 Vol. absoluten Ethanol gefällt und abzentrifugiert (20 000 $\times g$, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70 %) gewaschen, erneut zentrifugiert (20 000 $\times g$, 5 min, 4 °C), getrocknet und in Wasser (100 μl , Milli Q) resuspendiert. Die Menge der DNA wurde photometrisch bestimmt und nach folgender Formel berechnet:

$$1 \text{ OD}_{260} \cong 50 \mu\text{g dsDNA} / \text{ml Lösungsmittel}$$

Die Reinheit wurde aus dem Quotienten der $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ abgeleitet. Für die gelöste dsDNA sollte dieser einen Wert zwischen 1.8 und 2.0 haben [146]. Die Lagerung der gelösten DNA erfolgte bei -20 °C.

2.3.10.2 Minipräparation

Zur Reinigung kleinerer Mengen Plasmid-DNA wurde eine modifizierte Methode in Anlehnung an das Qiagen Plasmid Mini Kit-Protokoll durchgeführt. Es wurden nur die Puffer P1 bis P3 aus dem Kit (Qiagen) verwendet. Statt der Reinigung über Anionenaustauschersäulen wurde eine Ethanol fällung durchgeführt. Die Ausbeute dieser Methode variiert je nach Plasmid zwischen 2 und 6 μg .

Standardgemäß wurden 2–5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur pelletiert (2 000 $\times g$, 5 min, RT), in 150 μl Puffer P1 resuspendiert, anschließend die gleichen Volumina der Puffer P2 und P3 zugesetzt und leicht geschüttelt. Nach einer Inkubation auf Eis, (20 min) wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (20 000 $\times g$, 20 min, 4 °C). Die DNA

im Überstand wurde durch Zusatz von 2 Volumina Ethanol gefällt, das Pellet in 70%igem Ethanol (1 ml) gewaschen und in Wasser (40 μ l, Elix) resuspendiert.

2.3.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode [147] unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTPs. In einem Standardansatz für die Sequenzierungsreaktion wurden ca. 1 μ g Plasmid-DNA, Sequenzierprimer (10 pmol) und Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (4 μ l) mit Wasser (Milli Q) in einem Endvolumen von 10 μ l gemischt und anschließend in einem *Thermocycler* Trio-Thermoblock folgenden Temperaturzyklen ausgesetzt: 96 °C, 1 min; [96 °C, 10 sec; 50 °C, 5 sec; 60 °C, 4 min] \times 25; 60 °C, 2 min; 16 °C. Zur weiteren Aufarbeitung wurde der Ansatz bei Raumtemperatur auf eine vorzentrifugierte (700 \times g, 1 min) Centriflex Gelfiltrationssäule aufgetragen und zentrifugiert (700 \times g, 2 min). Der Durchlauf wurde auf etwa 1–3 μ l eingeeengt (Centrивac, 15 min), mit Template Suppression Reagens (20 μ l) versetzt, erhitzt (96 °C, 3 min) und in einem ABI Prism 310 Sequencer sequenziert.

2.3.12 Herstellung von EGF-cDNA

Zur Herstellung der cDNA wurden zunächst etwa 0.5×10^6 HL60-Zellen mit 1.25 % DMSO für 18 h inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Qiagen RNA midi Kits isoliert. Die EGF-cDNA wurde durch reverse Transkription von 5 μ g Gesamt-RNA mit 200 U Superscript II reverser Transkriptase (Invitrogen) nach Herstellerangaben unter Verwendung spezifischer Primer (IH18-vor und IH19-rück, je 100 pmol) mittels PCR [95 °C, 30 sec, 58 °C 60 sec, 72 °C 60 sec] \times 35 synthetisiert.

2.3.13 Reinigung der 60S-Ribosomen und deren 28S-rRNA aus Leber

Die Aufreinigung der 60S ribosomalen Untereinheit wurde modifiziert nach Matasova *et al.* [148] durchgeführt, wobei statt humaner Plazenta Schweineleber als Ausgangsmaterial verwendet wurde. Die gereinigten Ribosomen wurden in RNase-freiem Wasser (Elix) in einer Konzentration von 80–120 A_{260} U/ml (eine A_{260} Unit entspricht 25 pmol der 60S-Ribosomen) resuspendiert und bei –80°C gelagert.

Die 28S-rRNA wurde durch Zugabe von SDS und mehrmalige Phenolextraktion aus den 60S-Ribosomen gewonnen. Dazu wurden zunächst 0.1 Vol. einer 10% igen SDS-Lösung hinzugefügt und mehrmals mit 1.2 Vol. Phenol extrahiert. Die rRNA wurde mittels Ethanol gefällt (2 Vol.) und in steriler Luft getrocknet.

2.3.14 Reinigung mitochondrialer DNA

Lysepuffer: 40 mM Tris, pH 7.8, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, 1% SDS

Mitochondriensuspensionen aus Kartoffel wurden über differentielle Zentrifugation nach Yu *et al.* [149] unter Auslassung der Gradientenzentrifugation gewonnen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von H. Heisler (Institut für Angewandte Genetik, FU-Berlin). Zu 4 ml der Suspension wurden 12 ml Lysepuffer und 6 ml NaCl-Lösung (5 M) zugesetzt und zentrifugiert ($12000 \times g$, 10 min, 4 °C). Die mtDNA wurde aus dem Überstand durch Chloroform-Extraktion (3×1 Vol.) und anschließende Ethanol-Präzipitation gereinigt, im Vakuum getrocknet, anschließend in RNase-freiem Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.3.15 Umsetzung der Toxine mit Nukleinsäure-Substraten

Inkubationspuffer 1: 20 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NH_4Cl , 1 mM MgCl_2

Inkubationspuffer 2: 50 mM Na-Acetat, pH 4.0, 160 mM KCl, 1.25 mM Mg-Acetat

Inkubationspuffer 3: 20 mM Na-Acetat, pH 6.0, 10 mM Mg-Acetat, 100 mM NH_4Cl

Die Toxinreaktion der unterschiedlichen Substrate erfolgte in für Saporin optimierten Puffersystemen nach Fabbrini *et al.* [150]. In Tabelle 6 sind die Pufferbedingungen und Substratmengen für die Reaktionen angegeben.

Tabelle 6: Reaktionsbedingungen für die Toxin-Substrat-Reaktion

Substrat	Menge	Reaktionsvolumen	Inkubationspuffer
60S-Ribosomen	20 A_{260} units	200 μl	1
28S-rRNA	50 μg	50 μl	2
hsDNA	100 μg	50 μl	2
mtDNA	100 μg	50 μl	2
poly(A)-RNA	100 μg	50 μl	3

Die optimierte Reaktion wurde in 1.5-ml-Inkubationsgefäßen im Wasserbad (30 °C, 60 min) durchgeführt. Die Menge an eingesetzten Toxinen variierte zwischen 3 pmol für Dianthin, Saporin und Saporinfusionsproteine und 50 pmol für Ricin A. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol_{abs} (-20°C) gestoppt und die Substrate der Toxine durch Zentrifugation ($16000 \times g$, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde für die weitere Quantifizierung vakuumgetrocknet. Für die Kalibrierung wurden

zwischen 0.2 und 20 nmol Adenin ohne Zugabe von Toxin in die Ansätze gegeben und analog verfahren.

2.3.16 Adeninquantifizierung

Reaktionspuffer:	400 mM Tris pH 7.5, 20 mM MgCl ₂ , 2 mM Natriumazid
Mastermix:	8 µl APRT (0.3 mg/ml), 2 µl PNP (100 U/ml), 3 µl PRPP (10 mM), 50 µl MESG (1 mM), 17.5 µl Reaktionspuffer, 19.5 µl H ₂ O
Startermix:	10 µl Anorganische Pyrophosphatase (1 U/ml), 5 µl 5'-Nucleotidase (5 U/ml), 2.5 µl Reaktionspuffer, 32.5 µl H ₂ O

Die in 2.3.15 getrockneten Überstände der Ethanolpräzipitation wurden in 50 µl Wasser (Elix) resuspendiert und in eine 96-Well-Platte überführt. Nach Zugabe des Mastermix (100 µl / Well) wurde die 96-Well-Platte im spektralen Einkanalphotometer (SpectraMax 340PC) vermessen ($\lambda = 360$ nm) und als Nullwert für die Messung der Proben verwendet. Zu den Proben wurde Startermix (50 µl) zugesetzt und nach einer Inkubation von 15 min (25 °C) die Absorption ($\lambda = 360$ nm) gemessen.

Die Menge an Adenin wurde durch Adenin-Standardkalibrierungskurven berechnet.

2.4 Chromatographische Methoden

2.4.1 Affinitätschromatographie (Nickel-NTA)

Das Anhängen einer Histidin-Sequenz (6 × His-Tag) an rekombinant zu exprimierende Proteine ermöglicht deren Reinigung über ihre Komplexbildung mit Metallionen (Nickel). Dabei wird entweder unter nativen Bedingungen (Elution durch Konkurrenz mit Imidazol) oder unter denaturierenden Bedingungen (Elution durch pH-Wertänderung) gearbeitet. Als Affinitätsmaterial diente hier Ni-NTA-Agarose

2.4.1.1 Reinigung unter nativen Bedingungen

Lysepuffer:	10 mM Hepes, pH 8.0, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 1 mM PMSF
Waschpuffer:	Lysepuffer mit 50 mM Imidazol
Elutionspuffer:	Lysepuffer mit 150 mM Imidazol

Bakterienpellets wurden zunächst in Lysepuffer (2 ml/100 ml Expressionsmedium) resuspendiert und mit Ultraschall aufgeschlossen (Sonoplus HD 2200, Stufe 4, 30–40%, dreimal 30 sec). Der Überstand des folgenden Ultrazentrifugationschrittes (1 h, 4 °C,

130 000 × g) wurde auf die zuvor mit Lysepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule geladen und mit drei Vol. Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit zwei Vol. Elutionspuffer.

2.4.1.2 Reinigung unter denaturierenden Bedingungen (nach Qiagen)

Startpuffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, pH 8.0, 8 M Harnstoff
Waschpuffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, pH 6.3, 8 M Harnstoff
Elutionspuffer 1:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, pH 5.9, 8 M Harnstoff
Elutionspuffer 2:	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris, pH 4.5, 8 M Harnstoff

Die Bakterienpellets wurden zunächst mit dem Startpuffer aufgeschlossen und zentrifugiert (siehe 2.4.1.1). Zur weiteren Reinigung wurde die Probe auf die mit Startpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und nacheinander mit 4 Vol. Waschpuffer und anschließend mit jeweils zwei Vol. Elutionspuffer 1 und 2 von der Säule eluiert.

2.4.2 Kationenaustauschchromatographie

Säule:	Mono S HR 5 / 5 (Pharmacia)
Puffer A:	5 mM MES, pH 6.5, 10 mM NaCl
Puffer B:	5 mM MES, pH 6.5, 1 M NaCl

Proteine können aufgrund ihrer positiven Nettoladung an eine negativ geladene Säulenmatrix binden. Diese Bindung ist vom isoelektrischen Punkt des Proteins sowie vom pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers abhängig. Eine Elution von der Säule kann über einen Salz- oder pH-Gradienten erfolgen.

Für diese Aufreinigung wurden die Bakterienpellets zunächst in Puffer A aufgenommen und, wie unter 2.4.1.1 beschrieben, aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die zuvor mit Puffer A äquilibrierte Säule über eine Probenschleife automatisch geladen (Flussrate 0.5 ml/min) und die Säule mit Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten (0–100 % Puffer B) über 40 Säulenvolumina mit einer Flussrate von 1 ml/min. Verwendet wurde eine Chromatographieanlage vom Typ ÄKTA Explorer.

2.4.3 Peptid-Affinitätschromatographie

2.4.3.1 Herstellung einer Saporinpeptidsäule mit Affi-10-Säulenmaterial.

Bei Affi-10-Säulenmaterial handelt es sich um eine aktivierte Agarosematrix, die über N-Hydroxysuccinimidester primäre Amine an eine C₁₀-Spacersequenz kovalent binden kann. Dieses Material ermöglicht es, spezielle Affinitätsmatrizes zu erzeugen. In dieser

Arbeit wurde ein Saporinpeptid, gegen das zuvor Antikörper generiert wurden, an dieses Material gekoppelt. Für die Herstellung der Saporinpeptid-Säule wurde zunächst 1 ml Affi-10-Säulenmaterial mit 2×3 ml MOPS (10 mM, pH 7.5) äquilibriert und anschließend mit 3.4 mg des zu koppelnden Peptides (CRYIQNLVTKNFPNKFDS) inkubiert (6 h, 4 °C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethanolamin (1 M, 0.1 ml/ml Gelmatrix) abgestoppt und anschließend das Säulenmaterial gründlich gewaschen (10 mM MOPS, pH 7.5). Zur Lagerung wurde NaN_3 in einer Endkonzentration von 0.02 % zugesetzt.

2.4.3.2 Affinitätschromatographie mittels einer Saporinpeptid-Säule

Puffer W1:	10 mM MOPS, pH 7.5
Puffer W2:	20 mM Mg-Acetat, pH 4.2
Puffer E1:	20 mM Glycin, pH 2.5
Puffer N1:	100 mM Tris, pH 8.0
Puffer R1 :	10 mM MOPS, pH 7.4, 0.02 % NaN_3

Zur Reinigung von spezifischen Antikörpern gegen Saporin wurden 2 ml Antiserum auf das Säulenmaterial aufgetragen, anschließend mit W1 (10 ml) und W2 (3×1 ml) gewaschen und mit E1 (4×1 ml) eluiert. Allen Eluaten wurde zur Neutralisation 1/5 Vol.. Puffer N1 zugesetzt. Der gereinigte Antikörper wurde mit 0.02 % NaN_3 versetzt und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Zur Regeneration wurde die Säule mit Puffer R1 gespült und bei 4 °C gelagert.

2.4.4 Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine mit Hilfe von porösen Säulenmatrizes in Abhängigkeit ihrer Struktur und molekularen Masse getrennt. Die Trennung beruht auf der Diffusion der Proteine in die Poren des Säulenmaterials, wobei durch den Porendurchmesser der mögliche Trennbereich vorgegeben ist. Bei der Gelfiltration eluieren die Proteine nach abfallender Größe, bei gleich großen Proteinen eluieren langgestreckte vor globulären. Die Reinigung erfolgte mit den Säulenmaterialien Superdex 75 oder Superdex 200 in einer Chromatographieanlage vom Typ ÄKTA Explorer.

Um eine gute Auftrennung zu gewährleisten, mussten die zu trennenden Proteine zunächst auf ein Volumen von höchstens 500 μl mittels Centricons eingeeengt werden. Die Proben wurden automatisch über die Probenschleife geladen. Die Trennung erfolgte in allen Fällen mit 1.5 Säulenvolumina des verwendeten Puffers bei einer Flussrate von 0.5 ml/min.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinexpression

Die optimierte Proteinexpression erfolgte ausschließlich in dem Bakterienstamm Rosetta DE3 pLysS. Hierfür wurden Übernachtskulturen (50 ml, LB-Medium, M9 Salze, 1 % Glucose) 1:10 verdünnt (LB-Medium, 2YT-Medium oder Circle Grow-Medium) und bis zu einer OD_{600} von 0.8–1.0 bei 37 °C kultiviert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) eingeleitet und nach 3 h durch Pelletieren (10 min, 4 °C, $3\,300 \times g$) und Einfrieren (–20 °C) der Bakterien gestoppt.

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die hier verwendete Methode des BCA-Protein-Assays beruht darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduzieren, die anschließend mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex bilden, dessen Absorptionsmaximum bei 562 nm liegt.

Für die Bestimmung wurden in den Vertiefungen einer 96-Well-Mikroplatte jeweils 10 µl der zu untersuchenden Probe mit 200 µl BCA-Reagenz versetzt und inkubiert (37 °C, 30 min). Anschließend wurde die Absorption im Mikroplattenphotometer bei 562 nm gemessen. Alle Werte wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Proteinmenge wurde aus der mit Hilfe von BSA erstellten Standardkurve errechnet.

2.5.3 Dialyse von Proteinen

Durch Dialyse in Mikrokollodiumhülsen können geringvolumige Proteinlösungen umgepuffert werden. Hierzu wurde die Probe in zuvor dreimal mit Wasser gespülte Hülsen gefüllt und gegen die 300–500fache Menge des gewünschten Puffers mehrfach für jeweils 1 h dialysiert.

Größere Volumina wurden mit Hilfe von Dialyseschläuchen umgepuffert, die zuvor in EDTA-haltigem Wasser aufgeköcht und anschließend dreimal mit Wasser gewaschen wurden. Dialysiert wurde ebenfalls gegen die 300–500fache Menge Puffer, entweder ohne Pufferwechsel über mindestens 12 h oder stundenweise unter mehrfachem Pufferwechsel.

2.5.4 Aufkonzentrierung von Proteinen

Die Proteinlösungen wurden mit Hilfe von Mikrokonzentriervorrichtungen in einer Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor solange zentrifugiert ($1\,420 \times g$, 4 °C), bis die

gewünschte Probenkonzentration erreicht war. Je nach Größe des zu konzentrierenden Proteins wurden Centriprep 30 oder Centriprep 10-Konzentratoren (Ausschlußgrenze 30 bzw. 10 kDa) verwendet.

2.5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngelpuffer:	1.5 M Tris / HCl, pH 8.8, 0.4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris / HCl, pH 6.8, 0.4 % (w/v) SDS
APS:	10 % (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ in H_2O
4 × SDS-Probenpuffer:	250 mM Tris / HCl, pH 6.8, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0.04 % (w/v) Bromphenolblau, 8 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Elektrophoresepuffer:	20 mM Tris / HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (DISK-PAGE) [151] beruht auf der Trennung von Proteinen im elektrischen Feld nach Ladung, Größe und Form. Da sich in der SDS-PAGE das negativ geladene Detergenz SDS so an die Aminosäuren anlagert, dass die negative Nettoladung des Proteins zu der molaren Masse proportional ist, ergibt sich eine Trennung nach Größe. Zudem sorgt das SDS nach Reduktion der Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol für eine fast vollständige Denaturierung der Proteine, so dass auch die Form keinen Einfluss mehr auf die Trennung ausübt.

Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist im folgenden Pipettierschema in Tabelle 7 dargestellt. Die Polymerisation der Lösungen erfolgt nach Zugabe von TEMED als Katalysator und APS als Radikalstarter. Daher wurden diese Komponenten zuletzt zugesetzt.

Tabelle 7: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgele.

Lösungen	Sammelgel (4.5 %)	Trenngel (7.5 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamid / Bisacrylamid(19/1)	0.36 ml	2.5 ml	3.6 ml
Sammelgelpuffer	0.6 ml	–	–
Trenngelpuffer	–	2.5 ml	2.5 ml
TEMED	4 μl	5 μl	5 μl
APS	12 μl	50 μl	50 μl
Wasser	1.44 ml	5.0 ml	3.1 ml

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 4 × SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Die Trennung der Proteingemische erfolgte unter Verwendung von Elektrophoresepuffer in einem CBS-System zunächst für 15 min bei 20 mA und anschließend 50 min bei 25 mA bei maximal 200 V.

2.5.6 Gelfärbungen und Trocknen von Gelen

2.5.6.1 Färbung mit Coomassie-Blau

Coomassielösung: 0.1 % (w/v) Coomassie Blue R-250, 10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol

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

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mindestens 30 min in der Coomassielösung inkubiert, anschließend durch mehrfaches Wechseln des Entfärbers entfärbt und in Wasser gelagert. Mit dieser Methode lassen sich circa 0.1 µg Protein pro Bande nachweisen.

2.5.6.2 Silberfärbung

Fixierer I: 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Fixierer II: 30 % (v/v) Ethanol, 0.5 M Natriumacetat, frisch zusetzen: 0.5 % (v/v) Glutardialdehyd, 0.2 % (w/v) Na₂S₂O₄

Silberlösung: 0.1 % (w/v) AgNO₃ frisch zusetzen: 0.01 % (v/v) Formaldehyd

Entwickler: 2.5 % (w/v) Na₂CO₃ / Essigsäure, pH 11.2 frisch zusetzen: 0.01 % (v/v) Formaldehyd

Stopplösung: 10 % (v/v) Essigsäure

Zur Silberfärbung von Proteinen nutzt man aus, dass Ag⁺-Ionen durch negativ geladene Glutamat-, Aspartat- und Cysteinreste der im Gel fixierten Proteine komplexiert werden können. Im alkalischen Milieu reduziert Formaldehyd die komplexierten Ag⁺-Ionen zu elementarem Silber, die Proteinbanden erscheinen folglich dunkel. Die Detektionsgrenze dieser Methode liegt bei etwa 1 ng Protein pro Bande.

Die Gele wurden zunächst 20 min in Fixierer I, dann 25 min in Fixierer II inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen in Wasser (10 min) und eine anschließende Inkubation in der Silberlösung. Nach wiederholtem, kurzen Spülen mit Wasser (10 sec) wurde das Gel durch Zugabe von Entwicklerlösung unter Sichtkontrolle bis zu einer ausreichenden Farbentwicklung gefärbt. Durch Zugabe der Stopplösung wurde die Färbung beendet, das Gel wurde anschließend gründlich mit Wasser gespült.

2.5.6.3 Trocknen von Gelen

Das zu trocknende Gel wurde in zuvor gewässerte Cellophanfolie luftblasenfrei eingeschlagen und zwischen Filterpapier auf einem Geltrockner 583 unter langsamem Erwärmen auf 80 °C über 1.5 h getrocknet.

2.5.7 Westernblot

2.5.7.1 Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (*Semi-Dry-Verfahren*)

Blotpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Ethanol,
0.037 % (w/v) SDS

Ponceau S-Lösung: 0.2 % (w/v) Ponceau S, 1 % (v/v) Essigsäure

Das ungefärbte Polyacrylamidgel wurde zunächst für 15 min in Blotpuffer äquilibriert. Der Proteintransfer auf die Nitrocellulosemembran erfolgte in einer Trans-Blot SD-Zelle im *Semi-Dry-Verfahren*. Für den Transfer der Proteine wurde eine Spannung von 10 V für 20 bis 45 min je nach Größe der zu transferierenden Proteine angelegt. Zur Kontrolle der Transfereffizienz wurde die Nitrocellulosemembran für 1 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert, nach Sichtbarwerden der angefärbten Proteine, wurde das Ergebnis dokumentiert und der Farbstoff durch kurzes Waschen mit Wasser wieder komplett entfernt.

2.5.7.2 Immunoblot

PBSB: 0.2 % (w/v) Brij 58 in PBS

Blockierlösung: 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS

Inkubationslösung: 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBSB

Auf Nitrocellulosemembranen fixierte Proteine können mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen das zu untersuchende Protein (Primärantikörper) markiert werden und anschließend durch einen peroxidasekonjugierten (HRP-konjugiert) Sekundärantikörper mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden.

Dazu wurde die Membran mit den transferierten Proteinen zunächst 30 min in der Blockierlösung geschüttelt und anschließend der in der Inkubationslösung verdünnte Primärantikörper zugegeben. Je nach Antikörper erfolgte die Inkubation zwischen 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C (Tabelle 8). Nach Waschen mit PBSB (3 × 5 min) wurde der erforderliche Sekundärantikörper, verdünnt in Inkubationslösung (1:2000), für 1 h zugesetzt. Unspezifisch gebundener Sekundärantikörper wurde durch Waschen mit PBSB (4 × 10 min) entfernt. Für die Detektion wurde die Membran mit 2 ml Chemolumineszenzreagens Plus (NEB, jeweils 1 ml Lösung A und B) versetzt, anschließend nach Entfernen des Reagenz mit Filterpapier abgetrocknet und zwischen zwei klare Plastikfolien eingeschlagen. Die Membran wurde in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm bedeckt. Die nachfolgende Belichtung des Röntgenfilms variierte in Abhängigkeit der Bandenintensität zwischen 30 sec und 18 h. Nötigenfalls wurden mehrere Filme für unterschiedliche Zeiten durch eine Membran belichtet.

Tabelle 8: Verwendungparameter der Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Sekundärantikörper (HRP-konjugiert)
anti-Saporin	1:1000	16 h	Schwein IgG anti-Kaninchen
anti-HER1	1:2000	1 h	Ziege IgG anti-Ratte

2.5.8 Toxinspaltung *in vitro*

2.5.8.1 Spaltung im Cytosol und durch Caspasen

Caspasepuffer: 50 mM HEPES, pH 7.4, 0.1 % CHAPS, 5 mM DTT, 1 mM PMSF

Zur funktionellen Charakterisierung der cytosolisch spaltbaren Peptidsequenz (CSP) innerhalb des für die Immunotoxine verwendeten Adapters wurden die Adapter-Fusionsproteine sowohl mit rekombinanter Caspase-3 als auch mit Lysaten aus staurosporinbehandelten apoptotischen und nicht behandelten Zellen inkubiert.

Das zu untersuchende Konstrukt (5 µg) wurde mit rekombinanter Caspase-3 (0.1 µg) in 80 µl Caspasepuffer für bis zu 24 h inkubiert und der Verdau durch Zugabe von SDS-Probenpuffer (siehe 2.5.5) gestoppt.

Für die Inkubation mit Zelllysat wurden 5 µl Konstrukt mit 20 µl Lysat (siehe 2.6.6) versetzt, mit Caspasepuffer auf 60 µl aufgefüllt und bei 37 °C für 1 bis 24 h in An- und Abwesenheit des Caspase-3 Inhibitors Ac-DEVD-CHO (1 µM) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt.

2.5.8.2 Spaltung durch Membranfraktionen und Furin

Die Charakterisierung der endosomal spaltbaren Peptidsequenzen (ESP) wurde mit rekombinantem Furin und mit Membranfraktionen, die nach der Methode der differentiellen Zentrifugation (siehe 2.6.7.3) gewonnen wurden, durchgeführt.

Das zu untersuchende Konstrukt (1 µg in 5 µl PBS) wurde entweder mit rekombinantem Furin (0.1 mU in 20 µl PBS) oder mit Membranfraktionen (20 µl) aus 2.6.7.3 versetzt und bei 37 °C in An- und Abwesenheit eines Furinconvertaseinhibitors (vorinkubiert, 10 min, 100 µM, 37 °C) für 6 h inkubiert.

2.5.8.3 Spaltung in humanem Serum

Für die Spaltung in humanem Serum wurde das Konstrukt (mit 6 × His-Tag, 0.5 µg in 5 µl PBS) zusammen mit 10 µl humanem Serum bei 37° C für 1 bis 24 h inkubiert. Zum Abtrennen der Serumproteine wurde das Konstrukt über seinen His-Tag unter

denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Hierzu wurde die Probe mit 150 μl Harnstoffpuffer (Startpuffer siehe 2.4.1.2) aufgefüllt und mit 50 μl Säulenmaterial unter den in 2.4.1.2 angegebenen Bedingungen aufgereinigt.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Begasungsbrutschrank (5 % CO_2 , 95 % Luftfeuchtigkeit, 37 °C) kultiviert. Sämtliche Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank. Fetales Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch hitzeinaktiviert (30 min, 56 °C). Alle Materialien für die Zellkultur waren entweder steril verpackte Einmalartikel oder wurden vor der Benutzung in einem Autoklaven bei 120 °C und 1200 hPa mit Wasserdampf sterilisiert.

2.6.2 Kultivierung der Zelllinien

Alle verwendeten Zellen wurden in DMEM-Medium (mit Glutamax, 100 U/ml Penicillin G (Natriumsalz), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycinsulfat, 10 % (v/v) FCS) gehalten.

Für das Passagieren der Zellen wurden diese 3 \times mit 10 ml Dulbecco-PBS gewaschen und bis zum ersten Ablösen der Zellen vom Boden mit 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert (ca. 3 min). Anschließend wurde die Lösung vorsichtig entfernt, die Zellen durch Klopfen an die Zellkulturschale vom Boden gelöst und in 10 ml frischem Medium vereinzelt. Die Zelldichte wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.6.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieremedium 40 % v/v DMEM-Medium, 40 % v/v FCS, 20 % v/v DMSO

Von konfluent bewachsenen Gewebekulturplatten (Durchmesser 100 mm, circa 5×10^6 Zellen) wurden die Zellen, wie unter 2.6.2 beschrieben, abgelöst und in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (200 \times g, 5 min) und in Zellkulturmedium (0.5 ml) vorsichtig resuspendiert. Nach Zugabe von 0.5 ml Einfrieremedium wurde die Zellsuspension vorsichtig in 2-ml-Kryoröhrchen überführt und mit dem Zelleinfrierer Nicool eingefroren (45 min Stufe 3, 15 min, Stufe 9).

Zur Reaktivierung wurden die Zellen schnell aufgetaut (Wasserbad, 37 °C), in Medium (10 ml, 37 °C) überführt und resuspendiert. Nach Zentrifugation (200 \times g, 5 min) wurde das Medium erneuert, die Zellen auf Gewebekulturplatten überführt und kultiviert.

2.6.4 Cytotoxizitätsassay

FDA-Stammlösung: 10 mg Fluoresceindiacetat in 1 ml DMSO

FDA-Lösung: FDA-Stammlösung 1:1 000 verdünnt mit vorgewärmtem (37 °C) Dulbecco-PBS⁺⁺

Zur Messung der cytotoxischen Aktivität der gereinigten Toxine wurde ein von Larsson und Nygren [152] beschriebener Fluoresceindiacetatassay (FDA-Assay) verwendet. Bei diesem Assay werden die Zellen mit einer Lösung farblosen Fluoresceindiacetats versetzt, das nach Aufnahme in stoffwechselaktive Zellen von kurzlebigen cytoplasmatischen Esterasen zu Fluorescein hydrolysiert wird. Das entstehende Fluorescein lässt sich anschließend im Überstand der Zellen mittels Photospektrometrie quantitativ bestimmen.

Die für den jeweiligen Versuch erforderliche Zellzahl wurde in einem Volumen von 200 µl Kulturmedium in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 16 h im Brutschrank inkubiert. Je nach Zellart variierte die Zellzahl zwischen 2 000 und 8 000. Um den Effekt der Toxine zu quantifizieren, wurden diese 10fach konzentriert in 20 µl PBS angesetzt und zusammen mit 180 µl Medium zuden zuvor mit PBS⁺⁺ einmal gewaschenen, adhärenen Zellen gegeben und die Ansätze weitere 48 h im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen nochmals gewaschen (2 × Dulbecco-PBS⁺⁺), restlicher, verbliebener Puffer durch vorsichtiges Klopfen der umgedrehten 96-Well-Platte auf Papiertücher entfernt und eine frisch zubereitete FDA-Lösung (200 µl pro Vertiefung) zugegeben. Nach einer 45-minütigen Inkubation im Brutschrank wurden die Fluoreszenzsignale in einem SpectraMax Gemini Fluoreszenzlesegerät für Mikroplatten (Exzitation 485 nm, Emission 538 nm) gemessen. Der prozentuale Überlebensindex (SI) wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{SI (\%)} = \frac{\text{Test} - \text{A}}{\text{B} - \text{A}} \times 100$$

Test ist die gemessene Emission mit Toxin, A die Emission der Kontrolle ohne Zellen und B die Emission der Kontrolle mit Zellen, aber ohne Toxin

2.6.5 Transferassay

Um den Einfluss der Zellen auf die Stabilität der Immunoadaptortoxine zu untersuchen, wurden die Toxine mit Medium in Zellkulturschalen (Ø 60 mm) mit und ohne Zellen (5×10^5) in der gewünschten Endkonzentration für 1–6 h vorinkubiert. Anschließend

wurden 200 μ l des toxinhaltigen Mediums auf frische Zellen transferiert und die Cytotoxizität nach 48 h im FDA-Assay gemessen.

2.6.6 Induktion einer Apoptose durch Staurosporin

Staurosporin-Stammlösung: 1 mM Staurosporin in DMSO

Zur Induktion der Apoptose wurden die Zellen mit einer finalen Konzentration von 1 μ M Staurosporin behandelt und nach 16 h wie unter 2.6.7.1 beschrieben lysiert und weiterbehandelt.

2.6.7 Zellaufschlussverfahren

2.6.7.1 Zellyse

Lysepuffer: 10 mM Imidazol pH 6.8, 100 mM KCl, 300 mM Saccharose, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 1 mM NaF, 1 mM Na₂MbO₄, 1 mM VaVO₃, 0.2 % Triton X-100

Zunächst wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend der Lysepuffer zugegeben (500 μ l bei \varnothing 100 mm; 200 μ l bei \varnothing 60mm) und bei 4 °C für 10 min inkubiert. Das Zellysate wurde abgenommen, zentrifugiert (16 000 \times g, 10 min, 4 °C) und der Überstand bei -20 °C gelagert.

Bei Zellansätzen, die aufgrund ihrer Vorbehandlung bereits nicht mehr adhären waren, wurden die Zellen aus dem Zellkulturüberstand und den Waschfraktionen abzentrifugiert und gesondert in Lysepuffer aufgenommen.

2.6.7.2 Cytosolisierung modifiziert nach Dignam *et al.* [153]

Dignam A-Puffer: 10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM β -Mercaptoethanol

Bei dieser Methode werden die Zellen durch einen hypotonen Schock aufgeschlossen und fraktionell zentrifugiert. Die adhären Zellen werden mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen, mit Hilfe eines Zelllifters von der Platte abgelöst, mit Dignam A-Puffer vorsichtig gewaschen und in Dignam A-Puffer (150 μ l pro 5×10^5 Zellen) auf Eis inkubiert (30 min). Der Aufschluss erfolgt durch Scherkräfte, die mittels Auf- und Abziehen durch eine Kanüle oder Hamilton-Spritze erzeugt wurden. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (20 000 \times g, 10 min) und der Überstand ultrazentrifugiert (100 000 \times g, 1 h). Die im Überstand befindliche Cytosolfraction wurde durch Zugabe einer gesättigten Saccharoselösung stabilisiert (10 % (v/v)).

2.6.7.3 Zellaufschluss durch fraktionelle Zentrifugation

Fraktionierungspuffer F: 50 mM Tris / HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

Zur Isolierung von Zellmembranen wurde eine fraktionelle Zentrifugation eingesetzt. Nach einmaligem Waschen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ wurden die Zellen in Fraktionierungspuffer F von der Platte geschabt, resuspendiert (circa 5×10^5 Zellen in 300 μ l) und auf Eis in einem Zellhomogenisator durch *Pottern* aufgeschlossen. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt ($540 \times g$, 10 min, 4 °C), der der Abtrennung ganzer Zellen und Kerne diente, wurde der Überstand erneut zentrifugiert ($2\,500 \times g$, 15 min, 4 °C), um nun Lysosomen und Peroxisomen zu pelletieren. Der verbliebene Überstand wurde anschließend ultrazentrifugiert ($100\,000 \times g$, 1 h, 4 °C), um Membranen und Vesikel abzutrennen (Pellet) und die Cytosolfraktion zu erhalten (Überstand).