

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Hinweise

Die in der Arbeit verwendeten, geschützten Warenzeichen sind nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen einer Kennzeichnung kann demnach nicht geschlossen werden, daß der entsprechende Produktname frei von den Rechten Dritter ist.

Falls für einzelne Methoden und Inkubationsschritte keine Temperatur angegeben wird, so wird bei Raumtemperatur gearbeitet. Alle Lösungen und Puffer werden – falls nicht anders angegeben – mit ELIX-Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore hergestellt. Dieses Wasser hat einen Reinheitsgrad, der mit bidestilliertem Wasser vergleichbar ist. Die verwendeten Materialien für die Zellkultur und für die molekularbiologischen Methoden sind entweder steril verpackte Einmalartikel oder sie werden vor ihrer Benutzung in einem Autoklaven bei 120 °C für 20 min dampfsterilisiert.

2.2 Geräte

2.2.1 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
- Stickstofftank zur Lagerung von Zellen M 305 CE; Taylor-Wharton, Hollywood, USA
- Warmlufttrumschüttler G 24 Environmental Incubator Shaker; New Brunswick Scientific, Edison, USA

2.2.2 Elektrophorese und Westernblot

- Entwicklermaschine Optimax Typ TR; MS Laborgeräte, Heidelberg
- Gelrockner 583; Bio-Rad, München
- Horizontal-Elektrophoresesystem Mini Sub Cell GT; Bio-Rad

- Netzgeräte E 734, E 802; Consort, Turnhout, B
- Vertikal-Elektrophoresesystem Mini Protean II; Bio-Rad
- *Semi-Dry*-Transferzelle Trans-Blot SD; Bio-Rad

2.2.3 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
- Vakuumpzentrifuge Centrivac; Heraeus-Christ
- Zellzentrifuge Megafuge 2.0 R; Heraeus-Christ

2.2.4 Sonstige Geräte

- Analysenwaage BP 211 D; Sartorius, Göttingen
- Chromatographieanlage ÄKTA Explorer; Amersham Biosciences, Freiburg
- Chromatographieanlage GradiFrac; Amersham Biosciences
- Feinwaage LC 821; Sartorius
- Flachsüttler 3016; GFL, Burgwedel
- Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät SpectraMax Gemini; Molecular Devices, Sunnyvale, USA
- Kippschüttler Rocky; Fröbel Labortechnik, Lindau
- Magnetrührer MR 3001; Heidolph, Schwabach
- Mikroplattenschüttler IS 89; Wesbart LTD, GB
- Mikro-Well Waschorrichtung Nunc-Immuno Wash 8; Nunc, Wiesbaden
- Mikroplattenphotometer SpectraMax 340 PC; Molecular Devices
- pH-Meter pH 526 Multical; WTW, Weilheim
- Photometer DU 640; Beckman-Coulter
- QBT Heizblock; Grant, Cambridge, GB
- Quarzküvette; Perkin-Elmer, Norwalk, USA
- Sequenzierautomat ABI Prism 310; Perkin Elmer, Weiterstadt
- *Thermocycler* Trio-Thermoblock; Biometra, Göttingen
- Überkopfschüttler Reax 2; Heidolph
- Ultraschallstab Sonoplus HD 2200; Bandelin, Berlin
- Ultra-Turrax T 25 basic; IKA Labortechnik, Staufen
- Vortex Reax top; Heidolph
- Wasseraufbereitungsanlage; Millipore, Neu Isenburg
- Wasserbad HB 4 basic; IKA Labortechnik
- Zellhomogenisator Potter-Elvehjem (2 ml); Wheaton Science Products, Milleville, USA

2.3 Verbrauchsmaterialien

2.3.1 Zell- und Bakterienkultur

- Ampicillin; Sigma, Deisenhofen
- Einfriermedium (*Cell-Culture-Freezing-Medium*); Gibco BRL, Eggenstein
- CircleGrow-Medium; Bio 101, Carlsbad, USA
- Collagen A-Lösung (1 mg/ml); Biochrom KG, Berlin
- Difco Trypton-Pepton; Beckton-Dickinson, Sparks, USA
- DMEM-Medium mit Glutamax (Dulbecco's modified Eagle Medium mit L-Alanyl-L-Glutamin); Gibco BRL
- 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
- Hefeextrakt; Roth, Karlsruhe
- Isopropyl- β -D-Thio-Galaktopyranosid (IPTG); Roth
- Kanamycin; Sigma
- Penicillin G-Streptomycin (10 000 U/ml, 10 000 $\mu\text{g/ml}$); Gibco BRL
- Rifampicin; Sigma
- Select-Agar; Gibco BRL
- Trypsin-EDTA (0.25 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA); Gibco BRL

2.3.2 Chemikalien

- 6-Biotin-17-NAD⁺ (250 μM); Trevigen, Gaithersburg, USA
- Agarose NEEO Ultra; Roth
- Ammoniumsulfat (APS, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$); Sigma
- ATP (25 mM); Epicentre Technologies, Madison, USA
- Brij 58 (Polyethylenglykolhexadecylether); Merck
- Bromphenolblau; Serva, Heidelberg
- Coomassie Blue R-250; LKB, Bromma, S
- Desferal (Deferoxaminmesylat); Ciba Pharma, Wehr
- Desoxyribonukleotid-Triphosphat Mix (je 100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Roche-Diagnostics GmbH, Mannheim
- Dithiothreitol (DTT); Merck
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); Merck
- EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin; Pierce, Köln
- Fluoresceindiacetat; Sigma
- Formaldehyd; Merck
- HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure); Merck
- Magermilchpulver; Nestlé, Frankfurt / Main
- β -Mercaptoethanol (2-Sulfanylethan-1-ol); Merck, Darmstadt
- MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure); Calbiochem, Schwalbach

- Nonidet P-40 (NP-40); Sigma
- Natriumdodecylsulfat (SDS); Serva
- Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonsäurefluorid); Roche-Diagnostics GmbH
- PMSF (Phenylmethansulfonsäurechlorid); Sigma
- Polymyxin B-Sulfat; Sigma
- Ponceau S; Sigma
- Rotiphorese GEL 30 (30 % (w/v) Acrylamid / 0.8 % (w/v) Bisacrylamid); Roth
- SPDP (*N*-Succinimidyl 3-(2-pyridylsulfanyl)propionat); Pierce
- TCEP (Tris-(2-carboxyethyl)phosphin); Molecular Probes, Leiden, NL
- TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin); Sigma
- Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol); Merck
- Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol); Sigma
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat); Sigma

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

2.3.3 Antikörper

Primärantikörper

- Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen humanen Transferrinrezeptor, gereinigt aus den Zellkulturüberständen der Hybridomazelllinie OKT 9 (OKT 9); American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen grünfluoreszierendes Protein (Anti-GFP); Roche-Diagnostics GmbH
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Thioredoxin-Fusionsproteine generiert mit Hilfe von ThioFusion Vektoren (Anti-Thio); Invitrogen, Groningen, NL
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen die A-Kette von Diphtheriatoxin (Mab DTA); Biodesign, Saco, USA
- Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen humanes Transferrin (MAb 033); HB Diagnostika, Bad Nauheim
- Polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Diphtheriatoxin (Anti-DT); Biotrend, Köln
- Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen humanes Transferrin (RATf); DAKO, Hamburg
- Polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Biotin (Anti-Biotin); Sigma
- Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen *Pseudomonas* Exotoxin (Anti-PE); Sigma

Sekundärantikörper

- Kaninchen-IgG gegen Maus-IgG, HRP-(Meerrettichperoxidase-)konjugiert (RAM*); DAKO
- Kaninchen-IgG gegen Ziegen-IgG, HRP-konjugiert (RAG*); DAKO
- Monoklonaler Antikörper aus der Ratte gegen die κ -Kette aus Mäuse-IgG, HRP-konjugiert (mRAM κ^*); DAKO

- Ziegen-IgG gegen Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert (GAR*); DAKO
- Ziegen-IgG gegen Mäuse-IgG, rhodaminkonjugiert (GAM-rhodaminkonjugiert); Sigma

2.3.4 Enzyme

- Enterokinase EK-Max (1 U/ μ l); Invitrogen
- Furinconvertase, human rekombinant (1 U/ μ l); Alexis, Grünberg
- Lysozym; Sigma
- Pwo-DNA-Polymerase (5 U/ μ l); Roche-Diagnostics GmbH
- T4-Polynukleotidkinase (PNK, 10 U/ μ l); Epicentre Technologies
- T4-DNA-Ligase (2 U/ μ l); Epicentre Technologies
- Taq-DNA-Polymerase (1 U/ μ l); Roche-Diagnostics GmbH
- Trypsin, TPCK-(*N*-(1-Chlor-4-phenylbutan-2-on-3-yl)-*p*-toluonsulfonsäure-)behandelt; Sigma

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

2.3.5 Weitere Proteine und Peptide

- Aktiviertes Penetratin 1; Appligene Oncor, Heidelberg
- Aktiviertes, biotinyliertes Penetratin 1; Appligene Oncor
- Antipain; Sigma
- Apo-Transferrin / eisenfreies Transferrin, human; Sigma
- Biotinyliertes Transferrin, human, hergestellt aus ferri-Transferrin; Sigma
- Bovines Serumalbumin (BSA); Sigma
- Chymostatin; Sigma
- Ferri-Transferrin / eisenbeladenes (Fe^{3+}) Transferrin, human; Sigma
- Furinconvertaseinhibitor (Decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlormethylketon); Alexis
- Glutathion, oxidierte und reduzierte Form; Sigma
- Leupeptin; Sigma
- Pepstatin A; Sigma
- Streptavidin; Sigma
- Streptavidin-Peroxidase, HRP-konjugiert; Sigma
- Trypsininhibitor aus Sojabohnen; Sigma

2.3.6 Sonstiges Verbrauchsmaterial

- Cellophanfolie Einmach-Cello; Rolf Heyne, Wallertheim
- Centriflex Gelfiltrationssäulen; Edge Biosystems, Gaithersburg, USA
- Einmalküvetten Plastibrand; Brand, Wertheim
- Filterpapier Whatman 3 MM; Whatman International Ltd., Maidstone, GB
- Mikrokollodiumhülsen SM 13202; Sartorius
- Mikrokonzentriervorrichtungen Centriprep 30 und Centriprep 10; Amicon, Witten
- Module für Mikroplatten MaxiSorb U 16; Nunc
- Nitrocellulosemembranen 0.2 μ m Porengröße; Sartorius

- Röntgenfilme Biomax MR-1; Kodak, Stuttgart
- Sterilfilter Minisart, Porengröße 0.2 µm; Sartorius
- Visking Dialyseschläuche, Ausschlußgrenze 12–14 kDa; Roth

Sterile Einwegwaren, wie Pipetten, Schraubdeckelröhrchen und Gefäße für die Zell- und Bakterienkultur, wurden von den Firmen Falcon/Beckton-Dickinson (Heidelberg), Nunc (Wiesbaden) oder Greiner (Nürtingen) bezogen.

2.4 Material für die Chromatographie

- Anionenaustauscher Mono Q; Amersham Biosciences
- Chelatsepharose Fast Flow; Amersham Biosciences
- Cyanbromaktivierte Sepharose 4B; Amersham Biosciences
- HIC Resource-Phenyl; Amersham Biosciences
- HiTrap Blue-Sepharose; Amersham Biosciences
- Ni-NTA-Agarose; Qiagen, Hilden
- Protein A-Sepharose CL-4B; Amersham Biosciences
- Superdex 75; Amersham Biosciences

2.5 Reagenziensätze und Molekulargewichtsmarker

- 100 bp DNA-Molekulargewichtsmarker (bp: Basenpaare); Invitrogen
- 1 kb DNA-Molekulargewichtsmarker (1 kb: 1 000 Basenpaare); Invitrogen
- ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit und Template Suppression Reagens; Perkin Elmer
- BCA-(2,2'-Bicinchoninsäure-)Proteinbestimmungsreagens; Pierce
- Benchmark Protein-Molekulargewichtsmarker; Invitrogen
- Benchmark vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (*prestained*); Invitrogen
- CyQuant-Zellproliferationskit; Molecular Probes
- GeneClean II Kit; Bio 101
- Qiagen Plasmid Mini Kit; Qiagen
- Qiaquick Gelextraktionskit; Qiagen
- Renaissance Plus Chemolumineszenzreagens; NEN Life Science Products, Boston, USA

2.6 Nukleotide und Primer

Synthetische Oligonukleotide für DNA-Sequenzierungen und PCR-Reaktionen wurden bei TIB Molbiol (Berlin), Metabion (Martinsried) oder BIG Biotech (Freiburg) bezogen (Tab. 2-1).

Tab. 2-1: Verwendete Oligonukleotide und Primer.

Bezeichnung	Größe	Sequenz
DTA EcoR S rev	34-mer	5'-Cgg AAT TCC TAT TAA TTT CCT gCA CAg gCT TgA g
DTA Nde rev	35-mer	5'-Cgg gAA TTC CAT ATg ATT TCC TgC ACA ggC TTg Ag
DTA Nhe rev	32-mer	5'-CgC gCg gCT AgC ATT TCC TgC ACA ggC TTg Ag
DTA Xma rev	31-mer	5'-CTC CCC CCg ggA TTT CCT gCA CAg gCT TgA g
DTA-265 for	21-mer	5'-ggA CTg ACg AAg gTT CTC gC
eGFP EcoR S rev	33-mer	5'-Cgg AAT TCC TAT TAC TTg TAC AgC TCg TCC ATg
eGFP Hind for	34-mer	5'-gCC CAA gCT TgC CAT ggT gAg CAA ggg CgA ggA g
eGFP Nhe rev	32-mer	5'-CgC gCg gCT AgC CTT gTA Cag CTC gTC CAT gC
eGFP Xma rev	30-mer	5'-CTC CCC CCg ggC TTg TAC AgC TCg TCC ATg
ESP for	57-mer	5'-CgC gTC ATC gCC AgC CgC gCg gCA ATC gTg TCC gAC gCT CAC CCg ggT gTT AAT Agg
ESP rev	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
MTS EcoR S rev	30-mer	5'-Cgg AAT TCg TTA ggg TgC ggC AAg AAg AAC
MTS for	53-mer	5'-CT CAT ATg gCA gCC gTT CTT CTC CCT gTT CTT CTT gCC gCA CCC gCg ggC CCg
MTS rev	61-mer	5'-AAT TCg ggC CCg Cgg gTg Cgg CAA gAA gAA CAg ggA gAA gAA Cgg CTg CCA TAT gAg gTA C
Nco H DTA for	58-mer	5'-gg CAT gCC ATg ggA (CAT) ₆ AAg CTT gCT gAT gAT gTT gTT gAT TC
Nde PEN ESP for	81-mer	5'-Cgg gAA TTC CAT ATg CgC CAg ATT AAg ATT Tgg TTC CAg AAT Cgg CgC ATg AAg Tgg AAg AAg gCg ggC CCg CgT CAT CgC
Nde TLM ESP for	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
PE-255 Stu for	30-mer	5'-gCg CAg gCC TCT CTg gCC gCg CTg ACC gCg
PE-385 Stu for	30-mer	5'-gCg CAg gCC TgT AgC ggC gAC gCC CTg CTg
pET 11d-200 rev	22-mer	5'-AAA ggg AAT AAg ggC gAC ACg g
Reverse	23-mer	5'-AgC ggA TAA CAA TTT CAC ACA gg
T 7	19-mer	5'-ggA AAC AgC TAT gAC CAT g
TRBP EcoR S rev	72-mer	5'-CAA gAA TTC CTA TTA ACA Cgg CCA AAC Cgg AgA CCA CAT Cgg Cgg ACg gTg ggT CCC ggg TgA gCg TCg gAC
Trx for	18-mer	5'-TTC CTC gAC gCT AAC CTg
Universal	17-mer	5'-gTA AAA CgA Cgg CCA gT
Xma eGFP for	29-mer	5'-gCg gCC Cgg ggT gAg CAA ggg CgA ggA gC

2.7 Vektoren

- pBadMycHis C, Vektor zur Expression von Proteinen in *E. coli*; Invitrogen
- pBluescript II KS, Vektor zur Klonierung in *E. coli*; Stratagene, Heidelberg
- pEGFP-N3, Vektor zur Expression von Fusionsproteinen mit eGFP, optimiert für eine intensivere Fluoreszenz und für die Expression in Säugerzellen; Clontech, Palo Alto, USA
- pET 11d, Vektor zur Expression von Proteinen in *E. coli*; Novagen, Madison, USA
- pLitmus 28, Vektor zur Klonierung in *E. coli*; New England Biolabs, Schwalbach

- pThioHis A und B, His-Patch ThioFusion, Vektoren zur Expression von His-Patch-Thioredoxin-Fusionsproteinen in *E. coli*; Invitrogen
- pRBIPDI, Vektor mit Periplasmasignalsequenz vor allem zur Expression von Disulfidbrücken enthaltenden Proteinen in *E. coli*; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Martina Huber-Wunderlich, ETH Zürich

2.8 Bakterienstämme

- *E. coli* BL21 (Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm*)
- *E. coli* BL21(DE3) (Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)*)
- *E. coli* DH5 α (Genotyp: F⁻ Φ 80*dlacZ* Δ M15(*lacZY A-argF*)U169 *endA1 recA1 hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) deoR thi-1 supE44 λ^- gyrA96 relA1*)
- *E. coli* JM 83 (Genotyp: F⁻ Φ 80*dlacZ* Δ M15(*lac-proAB*) *ara rpsL*)
- *E. coli* LMG 194 (Genotyp: F⁻ Δ *lacX74 galE thi rpsL Δ phoA (Pvu II) Δ ara714leu::Tn10*)
- *E. coli* TOP 10 (Genotyp: F⁻ *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (araA-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG*)

2.9 Zelllinien

- HepG2-Zellen (humane Hepatokarzinomzellen); American Type Culture Collection
- TRVb-wt-Zellen, CHO-Zelllinie ohne endogene Transferrinrezeptoraktivität; Dr. T. E. McGraw, Cornell University, New York
- TRVb-hTfR-Zellen, TRVb-wt-Zellen transfiziert mit der cDNA des humanen Wildtyp-Transferrinrezeptors; Dr. T. E. McGraw, Cornell University, New York

2.10 Pufferlösungen und Bakterienmedien

An dieser Stelle wird nur auf Puffer und Medien hingewiesen, die sehr häufig Verwendung finden. Alle anderen Puffer sind ausführlich in Verbindung mit der entsprechenden Methode beschrieben.

PBS:	150 mM NaCl, 8.33 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.67 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
LB-Medium:	1 % (w/v) Difco Trypton-Pepton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7.0 Antibiotikazusätze: Ampicillin 100 μ g/ml Kanamycin 50 μ g/ml
LB-Agar:	1.5 % (w/v) Select-Agar in LB-Medium Antibiotikazusätze: Ampicillin 50 μ g/ml Kanamycin 25 μ g/ml
2YT-Medium:	1.6 % (w/v) Difco Trypton-Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 0.5 % (w/v) NaCl, pH 7.0 Antibiotikazusätze: Ampicillin 100 μ g/ml Kanamycin 50 μ g/ml

Dulbecco-PBS⁺⁺: 1.5 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄, 35 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂

2.11 Zellbiologische Methoden

2.11.1 Zellkultur

Alle Zelllinien werden im Begasungsbrutschrank unter 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Sämtliche Arbeiten erfolgen unter einer sterilen Werkbank und fetales Kälberserum (FCS) wird vor Gebrauch hitzeinaktiviert (30 min, 56 °C).

2.11.2 Collagen A-Beschichtung von Zellkulturplatten

Collagenlösung: Collagen A-Lösung (1 mg/ml), 1:10 verdünnt mit Dulbecco-PBS⁺⁺

Zur Herstellung einer Collagenbeschichtung wird auf der Zellkulturplatte so viel Collagenlösung verteilt, daß der Boden vollständig bedeckt ist. Nach 15 min wird die Collagenlösung abgenommen und die Platte einmal mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen. Die Collagenlösung ist – gelagert bei 4 °C – bis zu fünfmal wiederverwendbar.

2.11.3 Passagieren der Zellen

Zunächst wird einmal mit Dulbecco-PBS gewaschen, anschließend wird Trypsin-EDTA-Lösung (3 ml) zugegeben. Abhängig von der Art der Zelllinie wird so lange inkubiert (3–5 min), bis man im Lichtmikroskop eine deutliche Abkuglung der Einzelzellen beobachten kann. Nach quantitativer Abnahme der Trypsin-EDTA-Lösung werden die Zellen durch leichtes Klopfen von der Zellkulturschale gelöst. Nach Zugabe von frischem Medium (10 ml) werden die Zellen durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt. Die suspendierten Zellen werden in der Regel in einer 1:10-Verdünnung ausgesät.

Soll eine definierte Anzahl Zellen ausgesät werden, wird die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellkonzentration eingestellt.

2.11.4 Kultivierung von HepG2-Zellen

Kulturmedium H: DMEM-Medium mit Glutamax, 100 U/ml Penicillin G (Natriumsalz), 100 µg/ml Streptomycinsulfat, 10 % (v/v) FCS

Die Kultivierung der adhärennten HepG2-Zellen erfolgt in Kulturmedium H auf kollagenbeschichteten Gewebekulturplatten.

2.11.5 Kultivierung von TRVb-Zellen

Kulturmedium T: DMEM-Medium mit Glutamax, 100 U/ml Penicillin G (Natriumsalz), 100 µg/ml Streptomycinsulfat, 5 % (v/v) FCS

Die Kultivierung der adhärennten TRVb-Zellen erfolgt in Kulturmedium T auf unbeschichteten Gewebekulturplatten.

2.11.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen einer konfluent bewachsenen Gewebekulturplatte (Durchmesser 100 mm, circa 5×10^6 Zellen) werden nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation ($200 \times g$, 5 min) pelletiert und in Einfriermedium (1 ml) resuspendiert. Die Zellsuspension wird in Kryoröhrchen überführt, die in einem Styroporbehälter über 2 Tage langsam auf -80°C abkühlen. Die Langzeitlagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Zur Reaktivierung werden die Zellen rasch in einem Wasserbad aufgetaut und nach und nach in Medium (10 ml, 4°C) resuspendiert. Nach Zentrifugation ($200 \times g$, 5 min) werden die Zellen erneut in Medium resuspendiert. Dieser Vorgang wird nochmals wiederholt, um das aus dem Einfriermedium stammende DMSO auszuwaschen. Anschließend werden die Zellen in Kultur genommen.

2.11.7 Zellfraktionierung

In beiden Fällen der Zellaufarbeitung wird ohne Zusatz von Proteaseinhibitoren gearbeitet, da mit den hergestellten Fraktionen anschließend in der Regel solche Versuche durchgeführt werden, die aktive Proteasen erfordern. Um dennoch proteolytische Prozesse während der Aufarbeitung zu minimieren, werden alle Schritte bei 4°C und mit vorgekühlten Puffern durchgeführt.

2.11.7.1 Zellfraktionierung nach Dignam

Dignam A-Puffer: 10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM β -Mercaptoethanol

Dignam C-Puffer: 20 mM HEPES, pH 7.9, 25 % (v/v) Glycerol, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM β -Mercaptoethanol

PBS T_x : PBS plus 1 % (v/v) Triton X-100

Bei der Zellfraktionierung nach Dignam *et al.*¹¹³ werden die Zellen zunächst einmal mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend in Dulbecco-PBS⁺⁺ von der Platte geschabt. Nach einmaligem kurzen Waschen mit Dignam A-Puffer werden die Zellen in einer geringen Menge dieses Puffers (circa $150 \mu\text{l}$ pro 5×10^5 Zellen) resuspendiert und auf Eis inkubiert (30 min). Durch die Hypotonie des Puffers lassen sich die aufgequollenen Zellen danach leicht durch Auf- und Abziehen durch eine Kanüle (5 ×, Größe 18) aufschließen. Die so erhaltene Zelllösung wird abzentrifugiert ($20\,000 \times g$, 10 min) und der resultierende Überstand ultrazentrifugiert ($100\,000 \times g$, 1 h) (Abb. 2-1). Im Überstand befindet sich nun die Cytosolfraktion, die durch Zugabe einer gesättigten Saccharoselösung stabilisiert wird (10 % (v/v)). Die sich im Pellet 2 befindenden Membranen und Vesikel werden in PBS T_x ($30 \mu\text{l}$) solubilisiert. Pellet 1 wird in Dignam C-Puffer ($100 \mu\text{l}$) aufgenommen, über Kopf geschüttelt

(30 min) und erneut zentrifugiert ($20\,000 \times g$, 10 min). Der Überstand besteht aus Kernlysät, Pellet 3 wird in PBS T_x (50 μ l) aufgenommen und enthält unter anderem Mitochondrien und Lysosomen.

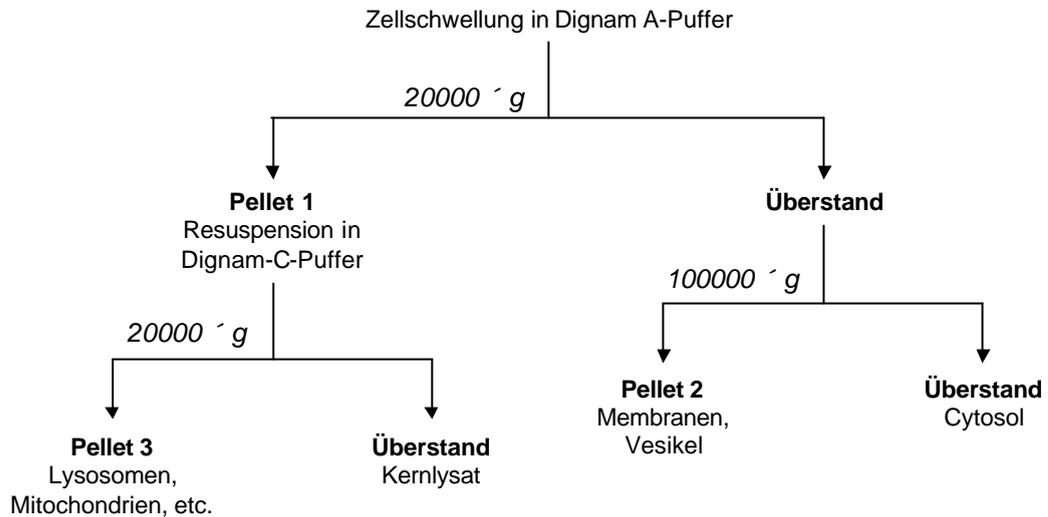


Abb. 2-1: Zellfraktionierung nach Dignam.¹¹³

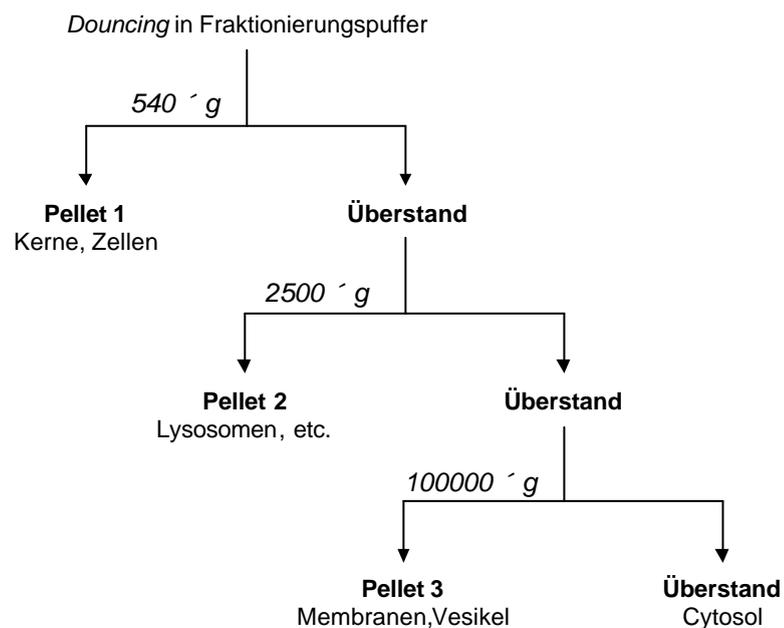


Abb. 2-2: Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation.

2.11.7.2 Zellfraktionierung durch differentielle Zentrifugation

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

PBS T_x: PBS plus 1 % (v/v) Triton X-100

Nach einmaligem Waschen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ werden die Zellen in Fraktionierungspuffer von der Platte geschabt, resuspendiert (circa 5×10^5 Zellen in 300 μ l) und in einem Zellhomogenisator durch *Douncing* aufgeschlossen (Auf- und Abbewegens des Stempels im Zellhomogenisator, 25 \times). Nach dem ersten Zentrifugationsschritt ($540 \times g$, 10 min) befinden sich ganze Zellen und Kerne in Pellet 1, welches in PBS T_x (100 μ l) aufgenommen wird (Abb. 2-2, siehe vorherige Seite). Der Überstand wird zentrifugiert ($2\,500 \times g$, 15 min), um Lysosomen und Peroxisomen in Pellet 2 abzutrennen. Dieses wird in PBS T_x (50 μ l) aufgenommen, während der Überstand ultrazentrifugiert wird ($100\,000 \times g$, 1 h). Der so erhaltene Überstand bildet die Cytosolfraktion, Pellet 3 besteht aus Membranen und Vesikeln und wird in PBS T_x (50 μ l) solubilisiert.

2.11.8 Solubilisierung von Zellen

Solubilisierungspuffer: 20 mM Tris / HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA,
1 % (v/v) NP-40, 0.02 % (w/v) Natriumazid

Pefabloc SC-Stammlösung: 100 mM in H₂O

PIC-Mix: je 1 mg/ml Antipain, Leupeptin, Pepstatin, Chymostatin

Zur Solubilisierung werden die Zellen zweimal mit Dulbecco-PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend in einer möglichst geringen Menge Solubilisierungspuffer von der Platte geschabt (circa 0.5 ml pro 5×10^6 Zellen). Nach Zugabe von Pefabloc SC-Stammlösung (Endkonzentration 1 mM) und PIC-Mix („Protease-Inhibitor-Cocktail“, 5 μ l/ml) wird die Probe mindestens 2 h bei 4 °C geschüttelt. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wird die Probe zentrifugiert ($20\,000 \times g$, 20 min). Das Pellet wird verworfen, während der Überstand für die Experimente verwendet wird.

2.11.9 Quantifizierung von funktionellen Transferrinbindungsstellen an der Zelloberfläche

Dulbecco-PBS⁺⁺, pH 5.5: Dulbecco-PBS⁺⁺ / HCl, pH 5.5

TBS: 10 mM Tris / HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl,
0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂

Lösung 1: 0.4 mM Deferoxaminmesylat (Desferal) in Dulbecco-PBS⁺⁺,
pH 5.5

Lösung 2: 50 μ M Deferoxaminmesylat in Dulbecco-PBS⁺⁺, pH 5.5

Lösung 3: 50 μ M Deferoxaminmesylat in TBS

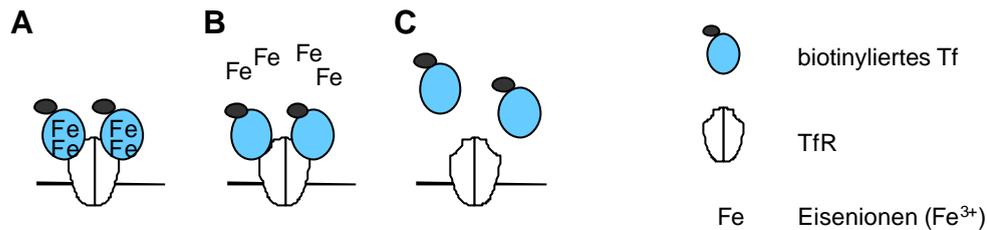


Abb. 2-3: Imitation des Tf-Cycluses mit Hilfe von Deferoxaminmesylat – **A** Ausgangssituation, **B** Ablösen von Eisenionen (Fe³⁺) durch Deferoxaminmesylat bei pH 5,5, **C** Ablösen von Tf bei pH 8.

Diese Methode bedient sich der Wirkung der Substanz Deferoxaminmesylat, um den natürlichen Tf-Cycluse zu imitieren (Abb. 2-3).¹¹⁴ Alle Schritte erfolgen bei 4 °C, um eine Internalisierung von TfR zu unterbinden und somit nur Tf-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche zu bestimmen.

Die verschiedenen Zelllinien werden auf 6-Well-Platten ausgesät (circa 1×10^6 Zellen pro Vertiefung) und für mindestens 14 h zum Adhären im Brutschrank gelagert.

Ablösen des aus dem FCS stammenden Kälber-Tf: Die Zellen werden zunächst viermal mit Dulbecco-PBS⁺⁺, pH 5,5, gewaschen. Anschließend wird mit Lösung 1 (2×5 min) inkubiert und einmal mit Lösung 2 gewaschen. Auf diese Weise lösen sich Eisenionen (Fe³⁺) von Tf, welches anschließend durch Inkubation mit Lösung 3 (2×5 min) vom Rezeptor gelöst wird.

Inkubation mit biotinyliertem Transferrin: Nach Waschen der Zellen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ ($3 \times$) folgt eine einstündige Inkubation mit biotinyliertem Tf (1 µg pro Vertiefung in 500 µl Dulbecco-PBS⁺⁺). Für Wettbewerbsversuche wird zusätzlich nichtbiotinyliertes ferritin-Tf (100 µg) zugesetzt.

Ablösen des biotinylierten Transferrins: Zunächst werden die Eisenionen (Fe³⁺) durch verschiedene Inkubationsschritte von Tf gelöst ($1 \times$ waschen mit Dulbecco-PBS⁺⁺, $3 \times$ mit Dulbecco-PBS⁺⁺, pH 5,5, 3×10 min mit Lösung 1). Die Dissoziation von Tf erfolgt anschließend durch Inkubation mit Lösung 3 (3×5 min, jeweils 500 µl). Diese Überstände werden für die Quantifizierung von biotinyliertem Tf gesammelt.

Zählen der verbliebenen Zellen pro Vertiefung: Nach Waschen der Zellen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ werden diese durch Zusatz von Trypsin-EDTA-Lösung von der Platte gelöst. Nach Absaugen der Lösung werden die Zellen in Dulbecco-PBS⁺⁺ resuspendiert und gezählt.

Quantifizierung von biotinyliertem Transferrin: Die Quantifizierung erfolgt mittels eines ELISA (siehe Abschnitt 2.12.6, Seite 41). Hierfür werden die gesammelten Überstände 1:5 mit PBST verdünnt und als Ligand eingesetzt.

2.11.10 Immunfluoreszenz mit TRBP-Proteinen

Block-FS: 3 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Ziegen Serum in Dulbecco-PBS⁺⁺

Auf Deckgläschen ausgesäte HepG2- oder TRVb-Zellen werden in serumfreiem Medium mit eisengesättigtem ferri-Tf oder eGFP-Konstrukten inkubiert (1 h, 4 °C bzw. 37 °C). Anschließend erfolgt die Fixierung und Permeabilisierung entweder mittels Methanol (−20 °C, 10 min) oder durch sequentielle Inkubation mit Paraformaldehyd (3 % (w/v), 30 min) und Tween 20 (0.01 % (v/v), 1 min). Nach Blockierung mittels Block-FS (40 min) wird zunächst OKT 9 bzw. Anti-GFP (1:300 in Block-FS, 30 min) zugegeben. Nach mehrfachem Waschen mit Block-FS wird mit rhodaminkonjugiertem Ziegen-anti-Maus-IgG inkubiert (GAM-rhodaminkonjugiert, 1:80 in Block-FS, 30 min). Schließlich wird gründlich mit Block-FS, Wasser (zum Entsalzen) und Ethanol (zum Entwässern) gewaschen, bevor die Präparate auf Objektträgern fixiert werden.

2.12 Proteinchemische Methoden

2.12.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit Hilfe der BCA-Methode beruht darauf, daß durch Proteine im alkalischen Milieu Kupferionen reduziert werden (Cu^{2+} zu Cu^+), welche dann mit 2,2'-Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Komplex formen, dessen Absorption bei 562 nm mit Hilfe eines Mikroplattenphotometers SpectraMax 340 PC gemessen wird.

Auf einer Mikroplatte werden in Doppelbestimmung jeweils 10 µl proteinhaltige Probe mit 200 µl, nach Herstellerangaben frisch zubereitetem, Reagens versetzt. Nach 35minütiger Inkubation bei 35 °C wird die Absorption gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Standardkurve mit BSA bestimmt.

2.12.2 Pufferwechsel und Konzentrierung von Proteinlösungen

2.12.2.1 Dialyse von Proteinlösungen

Durch Dialyse in Mikrokollodiumhülsen können Proteinlösungen mit geringen Volumina umgepuffert werden. Hierzu füllt man die Probe in zuvor dreimal mit Wasser gespülte Hülsen und dialysiert gegen die 300–500fache Menge des gewünschten Puffers.

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

2.12.2.2 Zentrifugationsgetriebene Ultrafiltration

Die Proteinlösungen werden mit Hilfe von Mikrokonzentriervorrichtungen in einer Megafuge 2.0 R mit Ausschwingrotor solange zentrifugiert ($1\,420 \times g$, 4 °C), bis die gewünschte Konzentrierung erreicht ist. Je nach Größe des zu konzentrierenden Proteins verwendet man Centriprep 30 oder Centriprep 10 (Ausschlußgrenze 30 bzw. 10 kDa).

2.12.2.3 Vakuumzentrifugation

Die zu konzentrierende Proteinlösung wird in einem geöffneten Reaktionsgefäß solange im Vakuumkonzentrator Centrivac zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht ist. Da dieses Verfahren sehr lange dauert, eignet es sich nur für Lösungen mit geringen Volumina. Außerdem ist durch den Anstieg der Salzkonzentration nachfolgend eine Dialyse in Betracht zu ziehen.

2.12.2.4 Proteinfällungen

Acetonfällung: Da diese Fällung eine Denaturierung der Proteine bewirkt, kann sie nur in solchen Fällen angewendet werden, bei denen in Folgeexperimenten kein funktionelles Protein mehr erforderlich ist (z. B. SDS-Polyacrylamidgel). Zur Fällung versetzt man die Proteinlösung mit dem 4fachen Volumen Aceton. Nach Inkubation bei -20 °C (30 min) wird der Ansatz zentrifugiert ($20\,000 \times g$, 10 min). Das pelletierte Protein wird schließlich in einer entsprechenden Menge Puffer oder Wasser aufgenommen.

Ammoniumsulfatfällung: Diese Fällung hat keine dauerhafte Denaturierung der Proteine zur Folge und eignet sich deshalb für Anwendungen, für die ein funktionelles Protein erforderlich ist. Man stellt zunächst eine in der Kälte gesättigte Ammoniumsulfat- $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ -Lösung her, indem man bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren soviel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Wasser gibt, bis ein Niederschlag auftritt (circa 67 % (w/v)). Diese Lösung gibt man im Verhältnis 2:1 zur Proteinlösung, schüttelt und inkubiert für 1 h bei 4 °C (Endkonzentration $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ circa 45 % (w/v)). Anschließend zentrifugiert man die ausgefallenen Proteine ab ($20\,000 \times g$, 10 min), nimmt sie in Puffer auf und dialysiert gegen diesen Puffer, um verbliebenes $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zu entfernen.

2.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

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

Trennpuffer: 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

Alle SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) werden mit dem Mini Protean II System modifiziert nach der Methode von Laemmli durchgeführt.¹¹⁵ Es werden stets diskontinuierliche Gele verwendet (Sammelgel: 4.5, Trenngel: 7.5 oder 12 % (v/v) Acrylamid).

Die Zusammensetzung der einzelnen Lösungen ist im folgenden Pipettierschema dargestellt (Tab. 2-2). Die Polymerisation der Lösungen erfolgt nach Zugabe von TEMED als Katalysator und APS als Radikalstarter. Daher sollten diese Komponenten zuletzt zugesetzt werden.

Tab. 2-2: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgele.

Lösungen	Sammelgel (4.5 %)	Trenngel (7.5 %)	Trenngel (12 %)
Acrylamid	0.36 ml	2.50 ml	4.00 ml
Sammelgelpuffer	0.60 ml	—	—
Trenngelpuffer	—	2.50 ml	2.50 ml
TEMED	4 μ l	5 μ l	5 μ l
APS	12 μ l	50 μ l	50 μ l
Wasser	2.40 ml	5.00 ml	3.50 ml

Vor dem Auftragen werden die Proben mit einem Drittel ihres Volumens $4 \times$ SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min in einem kochenden Wasserbad erwärmt.

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgt mittels verschiedener Benchmark Protein-Molekulargewichtsmarker. Die Trennung der Proteingemische wird in Elektrophoresepuffer über 60 min bei einer Stromstärke von 40 mA und einer Spannung von maximal 200 V durchgeführt (Angaben gelten für zwei Gele).

2.12.4 Gelfärbungen und Trocknen von Gelen

2.12.4.1 Färbung mit Coomassie Blau

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

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

Das zu färbende Polyacrylamidgel wird für 30 min in Coomassielösung inkubiert, wobei die Proteine angefärbt und gleichzeitig fixiert werden. Anschließend wird das Gel unter mehrfachem Wechsel solange in Entfärber geschüttelt, bis die Hintergrundfärbung vollständig verschwunden ist. Zur weiteren Aufbewahrung wird das Gel in Wasser überführt. Mit dieser Methode lassen sich circa 0.1 μ g Protein pro Bande nachweisen.

2.12.4.2 Färbung mit Silber

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

Fixierer II: 30 % (v/v) Ethanol, 0.5 M Natriumacetat
vor Gebrauch zusetzen: 0.5 % (v/v) Glutardialdehyd,
0.2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

Silberlösung: 0.1 % (w/v) AgNO_3
vor Gebrauch zusetzen: 0.01 % (v/v) Formaldehyd

Entwickler: 2.5 % (w/v) Na_2CO_3 / Essigsäure, pH 11.2
vor Gebrauch zusetzen: 0.01 % (v/v) Formaldehyd

Stopplösung: 10 % (v/v) Essigsäure

In Anlehnung an das Verfahren von Heukeshoven und Dernick¹¹⁶ werden die Gele zunächst 20 min in Fixierer I, anschließend 25 min in Fixierer II inkubiert. Es folgt ein gründliches Waschen in Wasser (3×10 min). Nach Schwenken in Silberlösung (25 min) und wiederholtem, kurzen Spülen mit Wasser wird das Gel durch Zugabe von Entwicklerlösung gefärbt.

Ist eine ausreichende Farbentwicklung erreicht, beendet man den Vorgang durch Zugabe von Stopplösung. Anschließend wird das Gel gründlich mit Wasser gespült. Da dieses Verfahren sehr sensitiv ist (bis 1 ng pro Bande), ist während der ganzen Prozedur darauf zu achten, daß das Gel nicht mit den Händen angefaßt wird.

2.12.4.3 Trocknen von Gelen

Das in Wasser äquilibrierte, zu trocknende Gel wird in gewässerter Cellophanfolie luftblasenfrei eingeschlagen. Die Trocknung erfolgt zwischen Filterpapier auf einem Gelrockner 583 unter langsamem Erwärmen auf 80 °C über 1.5 h.

2.12.5 Westernblot

2.12.5.1 Proteintransfer

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

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

Nach Äquilibration des ungefärbten Polyacrylamidgeles in *Semi-Dry*-Blotpuffer (10 min) erfolgt der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe einer Trans-Blot SD-Zelle im *Semi-Dry*-Verfahren (Vorgang wird auch als *Blotting* bezeichnet). Sind die zu transferierenden Proteine größer als circa 40 kDa wird für 25 min, ansonsten für 20 min eine Spannung von 10 V angelegt.

Zur Kontrolle können anschließend die transferierten Proteine mit Hilfe der reversiblen Ponceau S-Färbung sichtbar gemacht werden. Hierzu inkubiert man die Nitrocellulosemembran für 1 min mit der Färbelösung. Durch mehrfaches Waschen mit Wasser werden die Proteinbanden sichtbar.

2.12.5.2 Immunoblot

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

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

PBSB-Block: 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBSB

Stripping-Puffer: 62.5 mM Tris / HCl, pH 6.7, 2 % (w/v) SDS,
100 mM β -Mercaptoethanol

Die auf der Membran fixierten Proteine können durch spezifische Primärantikörper und HRP-konjugierte Sekundärantikörper mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden.

Nach 30minütigem Schütteln der Membran in Blockierlösung wird mit PBSB gewaschen (3 \times) und der in PBSB-Block verdünnte Primärantikörper zugegeben (Antikörperverdünnungen, siehe Tab. 2-3). Die Inkubation erfolgt entweder für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Nach Waschen mit PBSB (3 \times 5 min) gibt man den Sekundärantikörper, verdünnt in PBSB-Block, für 1 h zu. Anschließend wird die Membran mit PBSB gewaschen (4 \times 10 min), kurz mit Wasser gespült, für 1 min in frisch zubereitetem Chemolumi-

neszenzreagens inkubiert, mit Filterpapier abgetrocknet und in Folie geschlagen in eine Filmkassette gelegt. Die nachfolgende Belichtung der Röntgenfilme kann zwischen 5 s und 30 min variieren.

Tab. 2-3: Antikörperverdünnungen für die Immunodetektion.

Antikörper	Verdünnung	Antikörper	Verdünnung
Anti-DT	1:1 000	RAG*	1:2 000
Anti-PE	1:4 000	GAR*	1:2 000
Anti-GFP	1:1 000	RAM*	1:2 000
Anti-Biotin	1:10 000	Strep-HRP	1:1 000
Mab DTA	1:1 000		
OKT 9	1:1 000		
Anti-Thio	1:1 000		

Falls dasselbe Protein erneut mit einer anderen Antikörperkombination nachgewiesen werden soll, so kann man die vorhandenen Antikörper durch Inkubation mit *Stripping*-Puffer von der Membran lösen (50 °C, 30 min). Nach mehrfachem Waschen mit PBSB kann die zweite Immunodetektion beginnen.

2.12.6 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Blockierlösung:	3 % (v/v) FCS, 10 % (w/v) BSA in PBS
PBST:	0.05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Citratpuffer:	40 mM Natriumcitrat / NaOH, pH 3.95
TMB-Lösung:	2 % (w/v) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Ethanol / DMSO (je ein Volumenteil)
Färbelösung:	vor Gebrauch ansetzen und filtrieren: 100 µl TMB-Lösung, 3 µl H ₂ O ₂ (30 %) in 10 ml Citratpuffer
Stopplösung:	2 M H ₂ SO ₄

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) beruht darauf, daß ein Ligand an ein Protein oder einen Antikörper bindet, der an einer Festphase verankert ist. Der Nachweis erfolgt mittels einer Antikörperreaktion ähnlich der Immunofärbung von Nitrocellulosemembranen. Zur Detektion wird die Umsetzung von TMB durch Meerrettichperoxidase genutzt. Die Farbentwicklung wird durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt, die Farbe schlägt nach gelb um und die Absorption wird bei 450 nm (Referenz 492 nm) mit Hilfe eines Mikroplattenphotometers SpectraMax 340 PC gemessen.

Als Festphase werden MaxiSorb Module eingesetzt. Das zu immobilisierende Protein wird in PBS verdünnt zugegeben. Anschließend wird mittels eines Nunc-Waschkamms mit PBST gewaschen (3 × waschen, 5 min inkubieren, 3 × waschen). Mit Zugabe der Blockierlösung werden noch freie Bindungsstellen an der verwendeten Festphase besetzt. Anschließend wird – wie auch nach jedem weiteren Inkubationsschritt – mit PBST gewaschen.

Die wichtigsten durchgeführten ELISAs sind schematisch in Abb. 2-4 dargestellt, die einzelnen Inkubationsschritte und Verdünnungen sind in Tab. 2-4 aufgeführt, wobei sich die Volumina und Mengen auf jeweils eine Vertiefung beziehen.

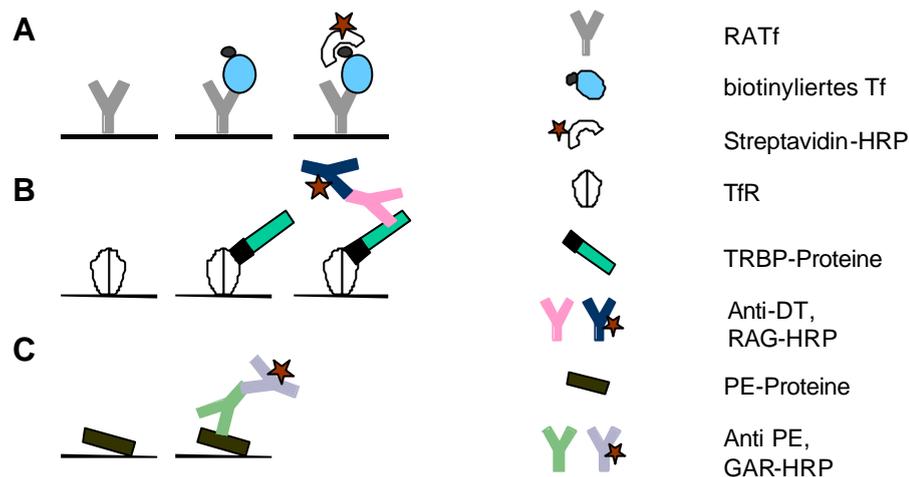


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der durchgeführten ELISAs – **A** Nachweis von biotinyliertem Tf, **B** Nachweis von TRBP-Proteinen und **C** Nachweis von PE-Proteinen.

Tab. 2-4: ELISA-Standardschema – **A** Nachweis von biotinyliertem Tf, **B** Nachweis von TRBP-Proteinen und **C** Nachweis von PE-Proteinen.

Inkubationsschritt	Zeit	Volumen	Substanz	Menge / Verdünnung
<i>Coating</i>	90 min	100 µl	A: RATf B: TfR C: PE	A: 1 µg B: 500 ng C: variabel
Blockierung	30 min	200 µl	Blockierlösung	
Ligand	120 min	100 µl	A: biotinyliertes Tf B: TRBP-Proteine C: —	A: variabel B: variabel C: —
1. Antikörper	30 min	100 µl	A: — B: Anti-DT C: Anti-PE	A: — B: 1:5 000 C: 1:5 000
2. Antikörper	30 min	100 µl	A: Streptavidin-HRP B: RAG-HRP C: GAR-HRP	A: 50 ng B: 1:4 000 C: 1:2 500
Färbung	bis blau	100 µl	Färbelösung	
Stoppen	3–20 min	50 µl	Stopplösung	

2.12.7 Biotinylierung

Die Biotinylierung wird aus Gründen der besseren Detektion durchgeführt, da der Anti-Biotin-Antikörper eine sehr hohe Sensitivität aufweist, die mit den verfügbaren toxinspezifischen Antikörpern nicht erzielt werden konnte.

Zur Biotinylierung wird Sulfo-NHS-LC-Biotin (Abb. 2-5) unmittelbar vor Gebrauch in Wasser gelöst und dem zu biotinylierenden Protein in 50fach molarem Überschuss zugesetzt. Nach der Inkubation (3 h) wird nicht umgesetztes Biotinylierungsreagens durch Dialyse entfernt.

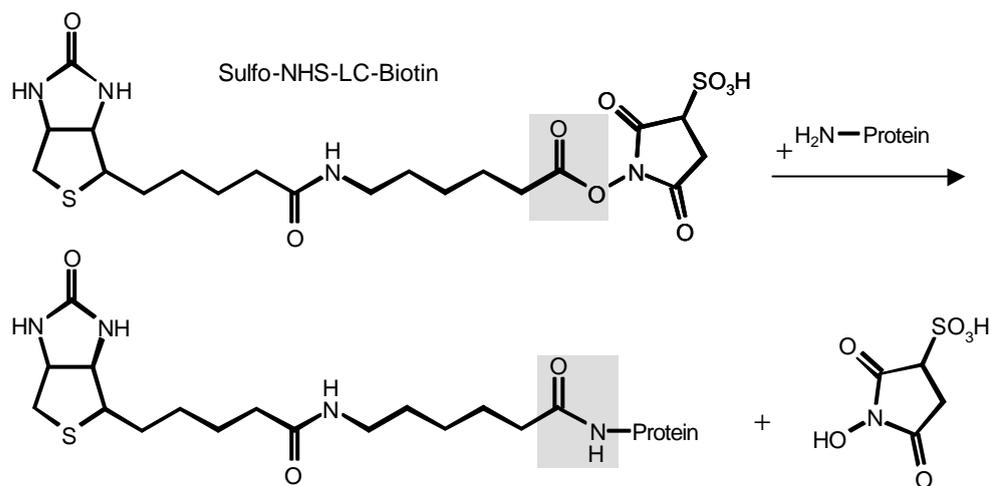


Abb. 2-5: Biotinylierungsreagens für Aminogruppen, Sulfo-NHS-LC-Biotin – Durch Reaktion der aktivierten Carbonsäure mit freien Aminogruppen von Proteinen kommt es unter Ausbildung einer Amidbindung und gleichzeitiger Abspaltung eines *N*-Hydroxysuccinimidderivates zur Biotinylierung.

2.13 Toxinspezifische Methoden

2.13.1 Toxizitätsassays

Zur Bestimmung der Cytotoxizität von verschiedenen Agenzien bedient man sich häufig des Einbaus von radioaktiv markierten Nukleotiden oder Aminosäuren^{64,117,118} oder auch nicht-radioaktiver Methoden, z. B. dem MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid).^{119,120} Da die Inhibition der Translation der primäre zelluläre Effekt von bakteriellen Proteintoxinen wie Diphtheriatoxin oder *Pseudomonas* Exotoxin ist, verwendet man bei diesen häufig die radioaktiv markierten Aminosäuren [¹⁴C]Leucin oder [³⁵S]Methionin, wobei die meßbare Radioaktivität ein indirektes Maß für die Stoffwechselaktivität ist.

Zur Bestimmung der Cytotoxizität von verschiedenen Substanzen sind aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit nichtradioaktive Methoden sehr vorteilhaft. Aus diesem Grund sind inzwischen – auch kommerziell – einige Tests dieser Art verfügbar, zum Beispiel der CyQuant-Zellproliferationskit. Bei diesem Test wird die Gesamt-DNA (abhängig von der

Zellzahl) nach Zellyse durch Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes gemessen. Während für diesen Assay die Stoffwechselaktivität der Zellen keine Voraussetzung darstellt, ist sie wichtig für den MTT-Test, bei dem die Zellen mit MTT versetzt werden, welches in lebende Zellen aufgenommen und unter Farbumschlag reduziert wird. Die sich bildenden Formazan-salze sind wasserunlöslich und müssen vor der photometrischen Quantifizierung in DMSO oder einer Salzsäure-Isopropanol-Mischung gelöst werden.^{122,123} Ein mit dem MTT-Test vergleichbarer Mechanismus ist für den Fluoresceindiacetatassay (FDA-Assay) entscheidend.^{122,124} Bei diesem Assay werden die Zellen mit farblosem Fluoresceindiacetat versetzt, welches nach Aufnahme in intakte, stoffwechselaktive Zellen von cytoplasmatischen Esterasen zu Fluorescein hydrolysiert wird. Dabei ist darauf zu achten, daß zuvor sämtliches FCS von den Zellen gewaschen wird (unspezifische Esteraseaktivität). MTT-Test und FDA-Assay sind in ihrer Sensitivität vergleichbar, wobei Fluoresceindiacetat bei – falls erforderlich – mehrfacher Messung weniger toxisch ist.¹²² Außerdem kann dem FDA-Assay eine FACS-Analyse folgen¹²⁵ und es entfällt das Lösen der Farbkristalle am Schluß, was ihn weniger aufwendig macht.

2.13.1.1 Allgemeines zur Durchführung

Für eine hohe Durchsatzrate werden die beschriebenen Assays in 96-Well-Platten durchgeführt; die gewünschte Zelldichte wird in einem Volumen von 200 µl Kulturmedium ausgesät. Zum Adhären werden die Zellen vor dem Assay mindestens 14 h im Brutschrank inkubiert.

Soll der Effekt von Toxinen quantifiziert werden, so werden 5 000 Zellen pro Vertiefung nach dem Adhären mit 180 µl Medium und 20 µl 10 × Toxinlösung versetzt und für 48 h im Brutschrank kultiviert, bevor der Assay durchgeführt wird.

Die Messung der Fluoreszenzsignale (Exzitation 485 nm, Emission 538 nm) erfolgt durch ein SpectraMax Gemini Fluoreszenzlesegerät für Mikroplatten, wobei zehnmal pro Vertiefung unter der Auto-Einstellung für den Photomultiplier (PMT) gemessen wird. Anhand verschiedener, mitgeführter Kontrollen (*C*: Zellen ohne Toxin; *B*: Ansatz ohne Zellen) berechnet man im Anschluß aus den Fluoreszenzsignalen der Proben (*Test*) nach folgender Formel den prozentualen Überlebensindex (*SI*):

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

2.13.1.2 CyQuant-Zellproliferationskit

Der Kit wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ werden Pufferreste durch Trockenklopfen auf Papiertücher vollständig entfernt und die Zellen bei –80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wird Lysepuffer zugesetzt, der gleichzeitig das Farbreagens enthält (200 µl pro Vertiefung). Nach Inkubation bei Raumtemperatur (20 min) erfolgt die Messung der Fluoreszenzsignale.

2.13.1.3 Fluoresceindiacetatassay

FDA-Stammlösung: 10 mg Fluoresceindiacetat in 1 ml DMSO

FDA-Lösung: FDA-Stammlösung 1:1 000 verdünnt in Dulbecco-PBS⁺⁺

Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Dulbecco-PBS⁺⁺ wird der überschüssige Puffer durch Trockenklopfen auf Papiertücher entfernt. Anschließend wird frisch zubereitete FDA-Lösung (200 µl pro Vertiefung) zugegeben. Es folgt eine 1stündige Inkubation im Brutschrank, bevor die Fluoreszenzsignale gemessen werden.

2.13.2 Anreicherung von Elongationsfaktor II aus Weizenkeimen

Puffer 1: 50 mM Tris / HCl, pH 8.0, 5 mM Magnesiumacetat, 50 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 5 mM β-Mercaptoethanol

Puffer 2: 50 mM Tris / HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerol

Die Aufarbeitung erfolgt in Anlehnung an Passador und Iglewski.¹²⁶ Soweit nicht anders angegeben wird bei 4 °C und mit vorgekühlten Puffern gearbeitet.

Nach 2stündigem Wässern läßt man Weizenkörner (100 g) im Dunkeln in einer feuchten Atmosphäre auskeimen (Raumtemperatur, circa 48 h). Anschließend werden die Keimlinge abgeknipst (3 g) und mit der 8fachen Menge Puffer 1 versetzt. Die durch einen Ultra-Turrax homogenisierte Suspension (5 Impulse à 10 s) wird unter Nachspülen von Puffer 1 durch unsterile Gaze filtriert. Nach Zentrifugation (21 000 × g, 15 min) wird der Überstand mit Essigsäure auf pH 7.5 eingestellt. Nachfolgend wird erneut zentrifugiert (21 000 × g, 15 min) und dem Überstand festes KCl in einer Endkonzentration von 0.1 M zugesetzt. Nach Ultrazentrifugation (200 000 × g, 1 h) wird der Überstand mit Ammoniumsulfat gefällt (siehe Abschnitt 2.12.2.4, Seite 38). Die ausgefallenen Proteine werden abzentrifugiert (17 000 × g, 30 min) und in 3 ml Puffer 2 aufgenommen. Nach mehrfacher Dialyse gegen das 200fache Volumen Puffer 2 werden die Niederschläge (20 000 × g, 20 min) verworfen, während der Überstand aliquotiert und zur Lagerung bei -80 °C eingefroren wird.

2.13.3 ADP-Ribosylierung von Elongationsfaktor II

EF II-Puffer: 20 mM Tris / HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT

Der Assay beruht auf der enzymatischen Aktivität von bestimmten Bakterientoxinen, die in Anwesenheit von NAD⁺ den Elongationsfaktor II (EF II) unter Freisetzung von Nicotinamid ADP-ribosylieren.¹²⁷

Pro Ansatz werden 10 µl angereicherter EF II (siehe oben) mit 5 µl 6-Biotin-17-NAD⁺ (Endkonzentration 50 µM) versetzt. Die zu testenden Proteinlösungen werden in Volumina von bis zu 2 µl zugesetzt. Anschließend wird EF II-Puffer bis auf ein Endvolumen von 25 µl zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Verwendung von biotinyliertem NAD⁺ (Abb.

2-6) ermöglicht anschließend durch Auftreten einer mit Anti-Biotin-Antikörper anfärbbaren Bande bei circa 100 kDa eine Detektion des modifizierten EF II im Immunoblot.¹²⁸

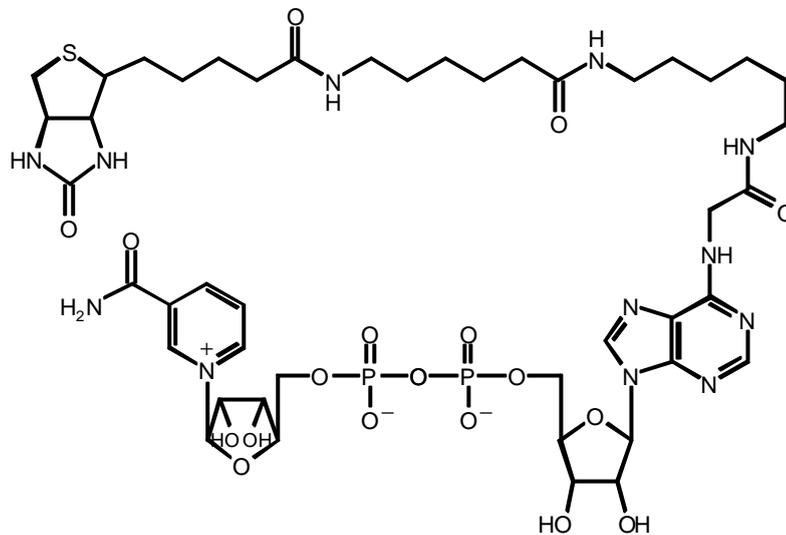


Abb. 2-6: 6-Biotin-17-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (biotinyliertes NAD⁺, 6-Biotin-17-NAD⁺).

2.13.4 Proteolytische Spaltung von Diphtheriatoxin

Die tryptische Spaltung von Diphtheriatoxin (DT) erfolgt nach einem Verfahren von Moskaug *et al.*¹²⁹ DT (100 µg) wird dazu mit Trypsin (1 µg) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert, bevor der Verdau durch Zugabe von Trypsininhibitor aus Sojabohnen gestoppt wird (2 µg, 37 °C, 10 min). Anschließend wird der Ansatz mit 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol versetzt und für 10 min in einem kochenden Wasserbad erwärmt. Bei diesem Schritt fällt die instabile B-Kette des Toxins aus und kann anschließend abgetrennt werden (20 000 × g, 10 min). Der Überstand wird gegen Wasser dialysiert.

2.13.5 Kopplung an Transfersequenzen

Für die Kopplungen wird entweder aktiviertes Penetratin 1 oder zur besseren Detektion dessen biotinylierte Form verwendet. Als weitere Transfersequenz dient die in Auftragsynthese hergestellte Transfersequenz nach Rojas *et al.* (MTS),¹ die zur Aktivierung an den Crosslinker SPDP gekoppelt wurde (Abb. 2-7). Somit sind beide Transfersequenzen für Disulfidkopplungen an cysteininhaltige Proteine geeignet (siehe Reaktionsschema Protein B, Abb. 2-7).

Zur Kopplung der A-Kette von Diphtheriatoxin wird aktiviertes Penetratin (nach Herstellerangaben rehydriert) in 2fach molarem Überschuß zugesetzt und für 2,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die aktivierte MTS wird zunächst in einer Mischung aus DMSO und PBS (je ein Volumenteil) gelöst und anschließend in 15fach molarem Überschuß zu der Toxinlösung gegeben. Die Inkubation erfolgt für 2 h bei 45 °C.

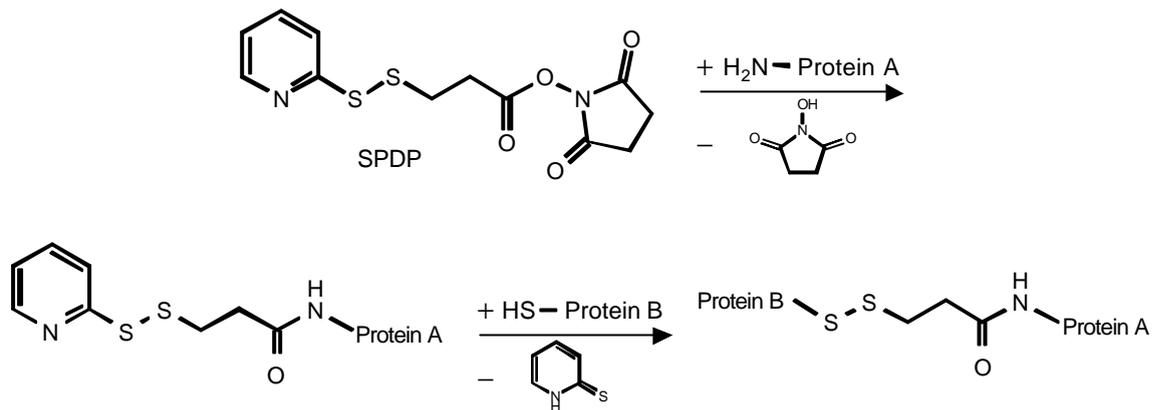


Abb. 2-7: Crosslinker SPDP und Reaktionsschema für die Kopplung – Die Kopplung beginnt mit einer Reaktion der Carbonsäurefunktion des Crosslinkers mit einer Aminogruppe von Protein A. Anschließend wird unter Abspaltung von Pyridin-2-thion eine neue Disulfidbindung zwischen Crosslinker und einem Cysteinrest des Proteins B gebildet.

2.13.6 Proteolytische Spaltung mit Furin

Furin-Puffer: 20 mM Tris / HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂,
1.2 mM MgCl₂

Diese Verdauexperimente dienen der funktionellen Charakterisierung der endosomal spaltbaren Sequenz und werden sowohl mit rekombinantem Furin als auch mit Membranfraktionen, die nach der Methode der differentiellen Zentrifugation gewonnen wurden (siehe Abschnitt 2.11.7.2, Seite 35), durchgeführt.

Das zu untersuchende Protein (0.5 µg) wird entweder mit rekombinantem Furin (0.1 mU) oder mit Membranfraktionen (variabel) versetzt und anschließend bei 37 °C inkubiert (15 min bis 4 h). Sollen Inhibitionsstudien durchgeführt werden, so wird zunächst mit Furinconvertaseinhibitor¹³⁰ vorinkubiert (Endkonzentration jeweils 100 µM, 10 min, 37°C), bevor das zu untersuchende Protein zugesetzt wird. Da der Inhibitor in Methanol gelöst vorliegt, wird zusätzlich ein Kontrollansatz mit reinem Lösungsmittel durchgeführt.

2.14 Chromatographische Methoden

2.14.1 Gelfiltration

Säulenmaterial: Superdex 75

Proteingemische lassen sich per Gelfiltration mit Hilfe von porösen Materialien in Abhängigkeit ihrer Größe (Molekülmasse) und Form auftrennen. Über den Porendurchmesser des Säulenmaterials wird der mögliche Trennbereich vorgegeben. Die größeren Proteine eluieren zuerst (inverser Molekularsiebeffekt), bei gleich großen eluieren langgestreckte Proteine vor globulären. Sämtliche Gelfiltrationen werden an einer ÄKTA Explorer-Chromatographieanlage durchgeführt.

Die aufzutragende Probe wird zunächst – falls erforderlich – auf ein Volumen von höchstens 500 µl eingengt. In allen Fällen wird mit 1.5 Säulenvolumen PBS bei einer Flußrate von 0.5 ml/min eluiert.

2.14.2 Anionenaustauschchromatographie

Säulenmaterial: Mono Q

Proteine sind – abhängig vom jeweiligen pH-Wert und von ihrem isoelektrischen Punkt – unterschiedlich geladen. Unter einem Anionenaustausch versteht man, daß negativ geladene Proteine an eine positiv geladene Säulenmatrix binden, von der sie anschließend durch hohe Salzkonzentrationen eluiert werden. Anwendung findet eine Chromatographieanlage vom Typ ÄKTA Explorer.

Die zuvor gegen Startpuffer dialysierten Proben können in einem beliebigen Volumen auf die mit Startpuffer äquilibrierte Säule aufgebracht werden. Um nichtbindende Proteine von der Säule zu entfernen, wäscht man zunächst mit Startpuffer (2 CV), bevor man durch definiertes Zupumpen von Hochsalzpuffer den Gradienten startet und mit der Elution beginnt. Tab. 2-5 gibt einen Überblick über die per Anionenaustausch durchgeführten Reinigungen.

Tab. 2-5: Parameter für verschiedene Mono Q-Chromatographien.

Protein	Startpuffer	Hochsalzpuffer	Gradient ^{a)}	
His-Patch-Proteine	PBS	PBS + 2 M NaCl	0– 50 %	10 CV
			50–100 %	5 CV
Adapterproteine	20 mM Tris / HCl, pH 8.0	20 mM Tris / HCl, pH 8.0 + 1 M NaCl	0– 50 %	20 CV
			50–100 %	2 CV
eGFP-Proteine	20 mM Tris / HCl, pH 8.0	20 mM Tris / HCl, pH 8.0 + 1 M NaCl	0– 50 %	25 CV
			50–100 %	2 CV

^a Säulenvolumen (CV)

2.14.3 Hydrophobe Chromatographie

Säulenmaterial: HIC Resource-Phenyl

Diese Art der Chromatographie beruht darauf, daß apolare Bereiche von Proteinen über hydrophobe Wechselwirkungen mit der ebenfalls apolaren Säulenmatrix interagieren. Man bezeichnet die Methode auch als HIC (hydrophobe Interaktionschromatographie). Anwendung findet eine Chromatographieanlage vom Typ ÄKTA Explorer.

Da die hydrophoben Interaktionen durch hohe Salzkonzentrationen verstärkt werden, wird das zu trennende Proteingemisch zunächst gegen einen Hochsalzpuffer dialysiert und mit diesem auf die Säule aufgetragen. Die anschließende Elution erfolgt durch definiertes Zupumpen eines Puffers mit niedriger Salzkonzentration.

2.14.4 Affinitätschromatographie

2.14.4.1 Blaugel-Affinitätschromatographie

Startpuffer: 20 mM Tris / HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl

Waschpuffer: 20 mM Tris / HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl,
0.2 % (w/v) Brij 58

Elutionspuffer: 20 mM Tris / HCl, pH 7.5, 1 M NaCl

Es werden HiTrap Blue-Säulen verwendet, bei denen der Farbstoff Cibacron Blue (Abb. 2-8) an Sepharose gebunden ist. Der Farbstoff hat gewisse strukturelle Ähnlichkeiten mit NAD^+ und kann deshalb für eine Affinitätschromatographie von NAD^+ -bindenden Molekülen eingesetzt werden.¹³¹

Nach Äquilibrierung mit Startpuffer wird die Probe aufgetragen und gewaschen (4 CV Waschpuffer, 4 CV Startpuffer). Das NAD^+ -bindende Protein wird mit 4 CV Elutionspuffer eluiert. Durch das manuelle Auftragen der einzelnen Lösungen mit Hilfe einer Spritze wird der nötige Druck für die Chromatographie erzielt.

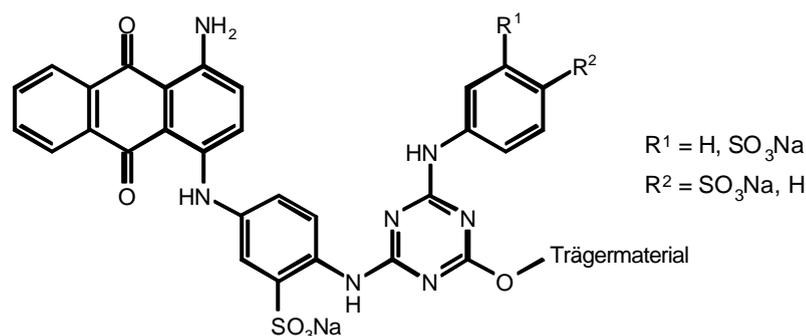


Abb. 2-8: Cibacron Blue – Ligand in Blaugelmatrizes.

2.14.4.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Rekombinant exprimierte Proteine werden oft mit bestimmten Strukturen versehen (*Tags*, $6 \times$ Histidin, His-Patch), die eine Reinigung über ihre Komplexbildung mit Metallionen erleichtern. Dabei wird entweder unter nativen Bedingungen (Elution durch Konkurrenz mit Imidazol) oder – falls der *Tag* schlecht zugänglich ist – unter denaturierenden Bedingungen (Elution durch pH-Wertänderung) gearbeitet. Als Affinitätsmaterialien zur Herstellung schwerkraftbetriebener Säulen stehen Ni-NTA-Agarose oder Chelatsepharose Fast Flow zur Verfügung.

Native Bedingungen

Lysepuffer: 50 mM Tris / HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 2 mM Imidazol

Waschpuffer: 25 mM Tris / HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 2 mM Imidazol

Elutionspuffer: 25 mM Tris / HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 20–100 mM Imidazol

Die Reinigung erfolgt in Anlehnung an das Verfahren von Lu *et al.*¹³² Die Probe wird auf die mit Lysepuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und mit 5 CV Waschpuffer gespült. Die Elution erfolgt durch schrittweises Erhöhen der Imidazolkonzentration. Abschließend wird mit Waschpuffer nachgespült.

Denaturierende Bedingungen

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

Die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) folgt den Angaben von Qiagen, dem Hersteller von Ni-NTA. Die Probe wird auf die mit Startpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und mit 4 CV Waschpuffer von Verunreinigungen befreit. Nach 1 CV Elutionspuffer 1 wird mit 4 CV Elutionspuffer 2 eluiert. Zur Regeneration werden die Nickelionen (Ni²⁺) mit EDTA-Lösung (50 mM, 1 CV) von der Matrix gelöst. Nach Spülen mit Wasser kann das Material schließlich wieder mit Nickelionen beladen (100 mM NiSO₄, 2 CV) und erneut verwendet werden.

2.14.4.3 Antikörper-Affinitätschromatographie

Reinigung von Anti-PE-Antikörper mittels Protein A-Sepharose

Beladungspuffer:	1.5 M Glycin, pH 8.9, 3 M NaCl
Elutionspuffer:	0.1 M Glycin, pH 3.0

Gequollene Protein A-Sepharose CL-4B (2 ml) wird in eine Säule gefüllt und mit Hilfe einer GradiFrac-Chromatographieanlage mit Beladungspuffer äquilibriert. Mit einer Flußrate von 0.1 ml/min wird die Antikörperlösung (500 µl Anti-PE-Antikörper in 500 µl Beladungspuffer) injiziert und mit 7 CV Beladungspuffer gewaschen. Die Elution (10 CV Elutionspuffer) erfolgt mit einer Flußrate von 0.5 ml/min. Die eluierten IgG-Fractionen werden schließlich gegen Kopplungspuffer (siehe unten) dialysiert.

Darstellung von Anti-PE-Sepharose

Kopplungspuffer:	100 mM NaHCO ₃ , pH 8.3, 500 mM NaCl
TBS _{0.5} :	100 mM Tris / HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl
ABS _{0.5} :	100 mM Natriumacetat / HCl, pH 4.0, 500 mM NaCl
Blockierlösung:	1 M 2-Aminoethanol

In 1 mM HCl vorgequollene cyanbromaktivierte Sepharose 4B (60 mg, 15 min) wird viermal mit Kopplungspuffer gewaschen, bevor mit der zugesetzten IgG-Lösung (siehe oben) 2 h über Kopf geschüttelt wird. Die Antikörperlösung wird abgenommen und die Matrix viermal mit Kopplungspuffer gewaschen. Dann wird Blockierlösung (5 ml) zugegeben und erneut 2 h über Kopf geschüttelt. Anschließend wird abwechselnd dreimal nacheinander mit ABS_{0.5} und TBS_{0.5} und abschließend mit PBS gewaschen.

Affinitätschromatographie mittels Anti-PE-Sepharose

Waschpuffer:	0.05 % (v/v) Tween 20 in PBS
Elutionspuffer:	10 mM Natriumcitrat / HCl, pH 5.0, pH 4.0 und pH 3.0, 150 mM NaCl

Die dargestellte Anti-PE-Sepharose (siehe oben) wird in eine Säule gefüllt und mit PBS mittels einer GradiFrac-Chromatographieanlage äquilibriert. Die Probe wird mit 0.5 ml/min auf die Säule geladen. Nach zweimal 5 CV Waschpuffer wird jeweils einmal mit 5 CV Elutionspuffer, pH 5.0 und pH 4.0 gewaschen, bevor die Elution bei pH 3.0 erfolgt und gegen PBS dialysiert wird.

2.15 Molekularbiologische Methoden

2.15.1 Agarosegelelektrophorese

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

Alle Gele werden mit dem Mini Sub Cell GT-System angefertigt. Je nach Größe der zu analysierenden DNA wird zunächst Agarose (1–2 % (w/v)) durch Erwärmen in TAE gelöst. Nach Zusatz von EtBr-Lösung (1 µl/40 ml zur anschließenden Detektion) wird das Gel gegossen. Den Proben wird vor dem Auftragen ein Fünftel ihres Volumens 6 × Probenpuffer zugesetzt.

Zur Größenbestimmung wird neben den Proben stets ein DNA-Molekulargewichtsmarker (100 bp oder 1 kb) aufgetragen. Zur genauen Abschätzung der DNA-Menge wird zusätzlich eine DNA-Mass-Ladder aufgetragen, zur groben Abschätzung wird der Molekulargewichtsmarker herangezogen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Gemische erfolgt bei einer Spannung von 80 V über circa 45 min in TAE.

2.15.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Gemische wird die gewünschte Fragmentbande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gelstück erfolgt mit dem Qiaquick Gelextraktionskit, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wird. Zur Elution werden 20–25 µl Qiagen-Elutionspuffer eingesetzt.

2.15.3 Restriktionsverdau

DNA-Spaltungen mittels Restriktionsendonukleasen werden weitgehend nach Herstellerangaben durchgeführt. In den Ansätzen (20 µl) werden die mitgelieferten Puffer und stets BSA (Endkonzentration 100 µg/ml) verwendet, wobei pro µg DNA pro Schnittstelle 1 U

Enzym zugesetzt wird. Die Inkubation erfolgt bei den empfohlenen Temperaturen über 1–16 h.

Im Falle einer anschließenden Klonierung wird die geschnittene DNA entweder über eine Gelextraktion gereinigt oder die Restriktionsenzyme werden – falls möglich – nach Herstellerangaben hitzeinaktiviert.

2.15.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligasepuffer (10 ×): 330 mM Tris / Essigsäure, pH 7.8, 660 mM Kaliumacetat,
 100 mM Magnesiumacetat, 5 mM DTT

Zur Ligation werden linearisierter Vektor (20–50 ng) und DNA-Fragment (Insert, 3–10fach molarer Überschuß gegenüber dem Vektor) auf Eis gemischt. Nach Zusatz von ATP (Endkonzentration 2.5 mM), Ligasepuffer (1 µl) und T4-DNA-Ligase (1 µl bzw. 2 U) wird Wasser (Milli Q) auf ein Endvolumen von 10 µl zugegeben. Die Ligation erfolgt durch Inkubation bei 16 °C (4–16 h).

Der Erfolg einer Ligation wird nach Transformation entweder durch Minipräparation von Plasmid-DNA und Restriktionsanalyse oder durch Kolonie-PCR überprüft.

2.15.5 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

2.15.5.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

TSS: 85 % (v/v) LB-Medium, 10 % (w/v) PEG 8000,
 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl₂

Diese Methode findet bei allen Bakterienstämmen mit Ausnahme von *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21(DE3) Verwendung.

LB-Medium (500 ml) wird mit einer Übernachtskultur angeimpft (Flüssigkultur mit einem Volumen von 4 ml, Inkubation unter Schütteln bei 37 °C für 12–16 h) und bis zu einer OD₅₇₈ = 0.4¹ geschüttelt (37 °C, 170 Umdrehungen/min). Das Pellet (3 300 × g, 10 min, 4 °C) wird in TSS (10 ml) aufgenommen und mit Glycerol (2 ml) versetzt. Die Zellsuspension wird in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

2.15.5.2 Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan

TFB I: 30 mM Kaliumacetat / Essigsäure, pH 5.8, 50 mM MnCl₂,
 100 mM KCl, 15 % (v/v) Glycerol

TFB II: 10 mM MOPS / NaOH, pH 7.0, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl,
 15 % (v/v) Glycerol

¹ Grundsätzlich wird die optische Dichte (OD) einer Flüssigkultur als Maß für die Bakteriedichte herangezogen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die optische Dichte je nach vorliegendem Protokoll bei unterschiedlichen Wellenlängen (550–600 nm) gemessen.

Die Methode nach Hanahan¹³³ findet für *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21(DE3) Verwendung, für die übrigen Bakterienstämme wird eine einfachere Methode (siehe oben) eingesetzt.

LB-Medium (100 ml) wird mit einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer $OD_{550} = 0.3$ geschüttelt (37 °C, 170 Umdrehungen/min). Das Bakterienpellet ($3\,300 \times g$, 10 min, 4 °C) wird in TFB I (30 ml) resuspendiert und 2 h auf Eis inkubiert. Die Suspension wird abzentrifugiert ($850 \times g$, 5 min, 4 °C) und das Pellet wird vorsichtig in TFB II (4 ml) resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgt bei –80 °C.

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

Kompetente Bakterienzellen (75 µl) werden entweder mit gereinigter Plasmid-DNA (circa 20 ng) oder mit Ligationsansatz (10 µl) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (90 s, 42 °C) wird erneut auf Eis inkubiert (5 min). Nach Zugabe von LB-Medium (600 µl) wird unter Schütteln inkubiert (1 h, 200 Umdrehungen/min, 37 °C), bevor der Ansatz auf LB-Agarplatten ausgestrichen wird. Bei Transformationen von gereinigter Plasmid-DNA werden dabei 100 µl der Bakteriensuspension aufgetragen. Bei Ligationsansätzen wird dem Ansatz zunächst nach Zentrifugation ($1\,000 \times g$, 5 min) 600 µl Überstand abgenommen und verworfen. Nach Resuspension des Pellets wird somit der gesamte Transformationsansatz aufgetragen.

Zur Selektion enthalten die Agarplatten prinzipiell das Antibiotikum, dessen Resistenzgen im Plasmid integriert ist. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektoren – außer in Anwesenheit von pREP 4, für den zusätzlich Kanamycin benötigt wurde (25 µg/ml) – wurde somit Ampicillin zugesetzt (50 µg/ml).

2.15.7 Gefrierkulturen von *E. coli*

Zur Herstellung einer Gefrierkultur wird eine frische Übernachtskultur (750 µl, kultiviert in 2YT-Medium) im Verhältnis 3:1 mit Glycerol (250 µl) versetzt und bei –20 °C eingefroren.

Zur Reaktivierung werden mit einer sterilen Pipettenspitze Zellen von der Oberfläche der eingefrorenen Kultur abgekratzt und zum Animpfen einer geringen Menge LB-Medium (4–10 ml) verwendet.

2.15.8 Minipräparation von Plasmid-DNA

Puffer P 1: 50 mM Tris / HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

Puffer P 2: 200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

Puffer P 3: 3 M Kaliumacetat, pH 5.5

Die Plasmidpräparation durch alkalische Lyse¹³⁴ erfolgt in Anlehnung an das Qiagen Plasmid Mini Kit-Protokoll. Die Ausbeute ist dabei in Abhängigkeit vom Plasmid und dessen Kopienanzahl variabel (circa 2–5 µg). Die Puffer P 1 bis P 3 (Qiagen) werden nach Her-

stellerangaben verwendet, anschließend erfolgt anstelle der Reinigung über Anionenaustauschersäulen eine Isopropanolfällung.

1.5–3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur werden pelletiert ($2\,000 \times g$, 5 min) und nacheinander mit jeweils 300 μl der Puffer P 1 bis P 3 versetzt. Nach Zusatz von Puffer 1 wird resuspendiert, nach Zugabe von Puffer P 2 (Zellyse) und Puffer P 3 (Neutralisation) wird nur leicht geschüttelt. Nach Inkubation (auf Eis, 20 min) werden die Zelltrümmer abzentrifugiert ($20\,000 \times g$, 20 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$). Die DNA im Überstand (800 μl) wird durch Zusatz von Isopropanol gefällt (560 μl , 30 min, $-20\text{ }^\circ\text{C}$) und abzentrifugiert (10 min, $20\,000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$), bevor das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen ($20\,000 \times g$, 5 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$), bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ getrocknet und in Wasser resuspendiert wird (20 μl , Milli Q).

2.15.9 Natriumacetatfällung von Plasmid-DNA

Zur DNA-Fällung wird die betreffende Lösung mit einem Zehntel ihres Volumens Natriumacetatlösung (3 M, pH 5.2) und einem 2.5fachen Volumen Ethanol ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) versetzt und gemischt. Ausgefällene DNA wird pelletiert (20 min, $20\,000 \times g$, $4\text{ }^\circ\text{C}$), mit 70%igem Ethanol ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) gewaschen ($20\,000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$), getrocknet und in der gewünschten Menge Wasser (Milli Q) oder Puffer resuspendiert. Das Verfahren dient entweder der Konzentrierung oder einem Lösungsmittelwechsel.

2.15.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung folgt der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.*,¹³⁵ wobei zur Detektion fluoreszenzmarkierte dNTPs eingesetzt werden.

In einem Reaktionsgefäß (0.5 ml) werden Plasmid-DNA (circa 1 μg , 2–5 μl Plasmid-Minipräparation), Sequenzierprimer (10 pmol), Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (4 μl) und gegebenenfalls Wasser (Milli Q) in einem Endvolumen von 10 μl gemischt und anschließend in einem *Thermocycler* Trio-Thermoblock folgendem Temperaturcyclus ausgesetzt: $96\text{ }^\circ\text{C}$, 1 min; [$96\text{ }^\circ\text{C}$, 10 s; $50\text{ }^\circ\text{C}$, 5 s; $60\text{ }^\circ\text{C}$, 4 min] $\times 25$; $60\text{ }^\circ\text{C}$, 2 min; $16\text{ }^\circ\text{C}$. Zur Reinigung des Ansatzes wird eine Centriflex Gelfiltrationssäule vorzentrifugiert ($700 \times g$, 1 min), bevor der Ansatz aufgetragen und zentrifugiert wird ($700 \times g$, 2 min). Der Durchlauf wird per Centrivac auf etwa 1–3 μl eingeeengt (circa 15 min), mit Template Suppression Reagens (20 μl) versetzt, 3 min auf $96\text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und der Sequenzierung durch einen ABI Prism 310 unterzogen.

2.15.11 Vorbereitung von Oligonukleotiden zur Klonierung

2.15.11.1 5'-Phosphorylierung

Die Oligonukleotide werden an ihrem 5'-Ende phosphoryliert, indem jeweils in einem Endvolumen von 10 μl das Oligonukleotid (350 pmol) mit ATP (1 mM Endkonzentration), PNK-Puffer (1 μl , entspricht Ligasepuffer (10 \times), siehe Abschnitt 2.15.4, Seite 52), T4-Poly-

nukleotidkinase (5 U) und Wasser (Milli Q) gemischt wird. Nach der Inkubation (37 °C, 2 h) wird die T4-Polynukleotidkinase hitzeinaktiviert (15 min, 72 °C).

2.15.11.2 Hybridisieren

Die einzeln phosphorylierten Oligonukleotide werden zur Vorbereitung auf die Klonierung hybridisiert, indem sie zusammen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Alternativ findet eine zeitaufwendigere Abkühlprozedur Anwendung, bei der das Gemisch der beiden Oligonukleotide in einem *Thermocycler* folgendem Programm ausgesetzt wird: 90 °C, 5 min; 75 °C, 1 min; Abkühlung auf 39 °C, 0.01 °C/s; 20 °C, 5 min; 4 °C.

2.15.12 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird in dieser Arbeit entweder dazu genutzt, verschiedene cDNAs so zu modifizieren, daß ein späteres Einklonieren über Restriktionsschnittstellen möglich ist, oder – wie im Falle der Kolonie-PCR – in solchen Fällen, in denen eine sehr große Anzahl Klone hinsichtlich eines korrekten Inserteinbaus getestet werden soll und eine Kontrolle der Ligation durch Restriktionsverdau problematisch ist.

2.15.12.1 PCR-Amplifikation zur Klonierung

Pwo-Puffer (10 ×): 100 mM Tris / HCl, pH 8.85 (20 °C), 250 mM KCl,
 50 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄

PCR-Mix: 5 µl dNTPs (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
 5 µl Pwo-Puffer (10 ×),
 0.25 µl Pwo-DNA-Polymerase,
 ad 45 µl Wasser (Milli Q)

Im Falle einer anschließenden Klonierung wird stets Pwo-DNA-Polymerase verwendet, die im Gegensatz zu der sonst üblichen Taq-DNA-Polymerase einen 10fach zuverlässigeren Nukleotideinbau gewährleistet (*Proofreading*).

Es werden zwei Standard-PCRs unterschieden:

- a) die Amplifikation größerer DNA-Abschnitte, die nach Restriktionsverdau über ein Gel gereinigt werden;
- b) die Amplifikation kleinerer DNA-Abschnitte zur Herstellung größerer Mengen Ausgangssubstanz. Da die nach Restriktionsverdau resultierenden DNA-Stücke für eine Gelextraktion zu klein sind, werden die Restriktionsenzyme nur hitzeinaktiviert.

Für beide Standard-PCRs werden die DNA-Matrize (Template, 25–50 ng) und die komplementären Oligonukleotide (Primer, je 2 µl 10 µM) mit dem PCR-Mix (45 µl) versetzt und den folgenden Temperaturcyclen unterzogen, wobei die *Annealing*-Temperatur abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden angepaßt wird:

- a) 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 58–65 °C, 1 min 30 s; 72 °C, 2 min] × 25;
72 °C, 5 min; 16 °C

- b) 96 °C, 3 min; [96 °C, 1 min; 55–68 °C, 30 s; 72 °C, 1 min] × 25;
72 °C, 5 min; 16 °C.

Im Falle einer Amplifikation von PE-Konstrukten wird Formamid in einer Endkonzentration von 5 % (v/v) zugesetzt (statt Wasser im PCR-Mix).

2.15.12.2 Kolonie-PCR

Lyselösung:	0.5 % (v/v) Triton X-100
Taq-Puffer (5 ×):	250 mM Tris / HCl, pH 8.5 (37 °C), 250 mM NaCl, 12.5 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT
PCR-Mix:	2.5 µl dNTPs (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µl Taq-Puffer (5 ×), je 2 µl Primer (jeweils 10 µM), 0.25 µl Taq-DNA-Polymerase, 11.75 µl Wasser (Milli Q)

Zunächst werden mit Hilfe einer Pipettenspitze einzelne Klone von einer LB-Agarplatte gepickt. Ein Teil der Kultur wird für eine eventuell folgende Minipräparation auf eine neue LB-Agarplatte ausgestrichen, anschließend wird die Spitze in ein Reaktionsgefäß mit 5 µl vorgelegtem Lyselösung überführt. Nach der Bakterienlyse (5 min) werden 20 µl PCR-Mix zugegeben und folgender Temperaturzyklus angewendet: 96 °C, 5 min; [96 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 2 min] × 35; 72 °C, 5 min, 16 °C.

2.15.13 Reinigung von PCR-Produkten

Sollen die PCR-Produkte zur späteren Klonierung einem Restriktionsverdau unterzogen werden, so muß der Ansatz zunächst von DNA-Polymerase und Oligonukleotiden befreit werden. Dies geschieht entweder mit Hilfe einer Gelextraktion (siehe Abschnitt 2.15.2, Seite 51) oder mit dem GeneClean II Kit. Bei der Anwendung dieses Kits wird nach Herstellerangaben vorgegangen, zur Elution werden 20–30 µl Tris-Puffer (10 mM, pH 8.0) verwendet.

2.16 Methoden zur bakteriellen Proteinexpression

2.16.1 Anzucht von Bakterien zur Expression

RM-Medium:	2 % (w/v) Difco Trypton-Pepton (20 g in 890 ml Wasser) nach Autoklavieren Zusatz von 100 ml M9-Salzen (10 ×), MgCl ₂ (1 mM) und 0.2 % (w/v) Glucose
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 nach Autoklavieren Zusatz von Thiaminchlorid / HCl (1 mM)

Die Anzucht von Bakterien zur Expression erfolgt unter Antibiotikazusatz entweder in LB-, 2YT-, RM- oder in CircleGrow-Medium (nach Herstellerangaben angesetzt). Aus einer Gefrierkultur oder mit einem von einer Agarplatte gepickten Klon wird zunächst eine

Flüssigkultur (5–10 ml) angeimpft. Diese wird über Nacht bei 37 °C geschüttelt, am Morgen 1:20 mit Medium verdünnt und unter Schütteln bei 37 °C solange inkubiert, bis eine $OD_{550} = 0.6\text{--}0.8$ erreicht ist.

Nach Abnahme einer Probe (1 ml, für die Gel- und Westernblotkontrolle) wird IPTG (Endkonzentration 1 mM) oder im Falle des Vektors pBadMycHis C Arabinose (Endkonzentration 0.002 % (w/v)) zugegeben und 2–4 h weitergeschüttelt. Die Proteinexpression wird durch Abzentrifugieren ($3\,300 \times g$, 15 min) und Einfrieren des Pellets beendet.

2.16.2 Optimierung der Proteinexpression

Die rekombinante Proteinexpression ist sehr variabel in Abhängigkeit vom verwendeten Vektor und / oder Bakterienstamm. Eine Optimierung kann insofern entweder durch eine Änderung der Kulturbedingungen (Medium, Temperatur, Induktionsstart und -dauer) oder durch einen Austausch von Vektor oder Bakterienstamm erfolgen. Diese vielfältigen Möglichkeiten zeigen, daß die Bedingungen für jede Expression individuell angepaßt werden müssen.

2.16.3 Bakterienaufschluß

2.16.3.1 Analytischer Aufschluß

Sollen nur kleine Bakterienmengen aufgeschlossen werden und sind mit den Aufschlüssen keine weiteren Experimente außer einem Gel oder Westernblot geplant, so resuspendiert man die Zellen in $2 \times$ SDS-Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.12.3, Seite 38, $100 \mu\text{l}$ / Pellet von 1 ml Kultur). Durch kurze Ultraschallbehandlung (einmaliges Beschallen, Stufe 3–4, 30–40 %) und Aufkochen (5 min, 96 °C) der Probe werden die Bakterien lysiert.

2.16.3.2 Periplasmaaufschluß

Periplasmapuffer: 10 mM MOPS / NaOH, pH 7.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA
vor Gebrauch zusetzen: 1 mg/ml Polymyxin B-Sulfat

Diese Art des Bakterienaufschlusses findet nur bei der Expression von Konstrukten in pRBIPDI / *E. coli* JM 83 Anwendung. Zur Induktion wird bei diesem System neben IPTG (1 mM) auch *N*-Acetylcystein (5 mM, Stabilisierung der Disulfidbrücken) zugesetzt.

Nach Zentrifugation ($3\,300 \times g$, 15 min) wird das Bakterienpellet in Periplasmapuffer (2 ml/g Pellet) resuspendiert, 2 h auf Eis gerührt und ultrazentrifugiert ($35\,000 \times g$, 30 min, 4°C). Der Überstand enthält die Periplasmafraktion.

2.16.3.3 Enzymatischer Bakterienaufschluß

Lysozymlösung: 100 mg/ml (w/v) Lysozym in Wasser

Das bei –20 °C gelagerte Bakterienpellet wird in vorgekühltem Tris-Puffer (20 mM, pH 8.0) oder einem anderen – der anschließenden Reinigung angepaßten – Puffer resuspendiert (5 ml/g Pellet) und mit Lysozymlösung versetzt (Endkonzentration 2.5 $\mu\text{g/ml}$). Nach Inku-

bation bei 30 °C werden die Zelltrümmer abzentrifugiert (20 000 × g, 20 min, 4 °C), der Überstand kann anschließend weiteren Experimenten zugeführt werden.

2.16.3.4 Aufschluß durch Ultraschallbehandlung

Diese Methode wird oft in Kombination mit dem enzymatischen Aufschluß (siehe oben) angewendet. Das bei –20 °C gelagerte Bakterienpellet wird wie beschrieben resuspendiert, gegebenenfalls mit Lysozym inkubiert und anschließend auf Eis einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Mit einem Ultraschallstab Sonoplus HD 2200 wird die Zellsuspension in 3 Cyclen jeweils zehnmal beschallt (Stufe 3–4, 30–40 %), wobei eine Überhitzung und somit Denaturierung der Proteine ausgeschlossen werden sollte.

2.16.3.5 Aufschluß unter denaturierenden Bedingungen

Startpuffer: 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris / HCl, pH 8.0, 8 M Harnstoff

Dieser Aufschluß findet bei anschließender Metallchelatchromatographie unter denaturierenden Bedingungen Anwendung (siehe Abschnitt 2.14.4.2, Seite 49). Das eingefrorene Bakterienpellet wird in Startpuffer resuspendiert (5 ml/g Pellet) und über Kopf geschüttelt (1 h, Raumtemperatur). Anschließend werden die Zellreste abzentrifugiert (20 000 × g) und der Überstand kann der Reinigung zugeführt werden.

2.16.4 Enterokinasespaltung von Fusionsproteinen

EK-Puffer: 10 mM Tris / HCl, pH 7.5, 75 mM NaCl

Bei rekombinanten Fusionsproteinen bedient man sich häufig einer Enterokinasespaltsequenz, um später den *Tag* oder den Fusionsanteil entfernen zu können. Die hier beschriebene Spaltung folgt den Angaben von Lu *et al.*¹³² und findet für solche Proteine Verwendung, die mittels der Vektoren pThioHis A und B exprimiert werden.

Circa 0.5–1 µg Protein werden mit 10 mU Enterokinase EK-Max versetzt und für 14 h bei Temperaturen von 4–37 °C inkubiert. Das herzustellende Protein kann anschließend mittels chromatographischer Methoden vom Fusionsanteil abgetrennt werden.