

6 METHODEN

6.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zelllinien werden im Brutschrank bei 5 % CO₂, 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Sämtliche Arbeiten erfolgen unter einer sterilen Werkbank. Alle Materialien für die Zellkultur sind entweder steril verpackte Einmalartikel oder werden vor der Benutzung in einem Autoklaven bei 120 °C mit Wasserdampf sterilisiert.

6.1.1 Kultivierung leukämischer Zelllinien

Die leukämischen Zelllinien HL60, U937, Jurkat und K562 wachsen in Suspension und haben eine Zellteilungsrate zwischen 25 und 35 h. Die Kultivierung erfolgt in RPMI 1640-Medium (RPMI 1640-Basismedium, 5 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamax) in Zellkulturflaschen. Das Kulturmedium wird alle drei bis vier Tage so erneuert, dass eine Zelldichte von $1-2 \times 10^5$ Zellen / ml erreicht wird.

6.1.2 Solubilisierung von Zellen

Solubilisierungspuffer: 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % (v/v) NP-40 in 20 mM Tris / HCl pH 8,0

PIC: je 1 mg/ml Antipain; Pepstatin; Leupeptin; Chymostatin

Zur Solubilisierung der Zellmembranen von Suspensionszellen werden diese zentrifugiert (10 min, 37 °C, $200 \times g$), das Zellpellet mit Solubilisierungspuffer (1 ml für ca. 5×10^6 Zellen) resuspendiert und 1:200 (v/v) PIC zugesetzt. Anschließend werden die Proben 2 h bei 4 °C über Kopf geschüttelt und zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile zentrifugiert (20 min, 4 °C, $20\,800 \times g$). Das Pellet wird verworfen und der Überstand für die Untersuchungen eingesetzt.

6.1.3 Inhibition des TfR-Sheddings leukozytärer Zelllinien

Die Testung der inhibierenden Wirkung von Proteaseinhibitoren wurde an der leukozytären Zelllinie HL60 getestet, für die nachgewiesen werden konnte, dass der sTfR an der Hauptschnittstelle des TfR proteolytisch gespalten wird. HL60-Zellen im optimalen Wachstum werden zentrifugiert (10 min, $100 \times g$) und das Zellpellet vorsichtig in frischem Zellkulturmedium resuspendiert, so dass man eine Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ / ml erhält. Je 0,5 ml werden in 24-well-Zellkulturplatten pipettiert und mit 50 µM PefablocSC, FCI, MMP-Inhibitor-2 oder TAPI-2 versetzt und für 24 h im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 10 min bei $200 \times g$ zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und für 15 min bei $20\,800 \times g$ und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu ent-

fernen. Der Überstand wird im sTfR-ELISA (s. 6.2.11) getestet und die Kontrolle ohne Inhibitoren zu 100 % gesetzt.

6.1.4 Stimulierung des TfR-Sheddings verschiedener leukozytärer Zelllinien

Pervanadat-Lsg. (50 mM): 20 μ l 1 M Natriumorthovanadat und 10 μ l 3 % Wasserstoffperoxid werden gemischt und 170 μ l H₂O zugefügt, immer frisch ansetzen

HL60-, Jurkat- und U937-Zellen im optimalen Wachstum werden für 10 min bei 100 \times g sanft zentrifugiert und die Pellets vorsichtig in frischem Zellkulturmedium resuspendiert, so dass man eine Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ / ml erhält. Je 1 ml wird in 24-well-Zellkulturplatten pipettiert und auf eine Konzentration von 160 nM PMA oder 10 μ M Pervanadat eingestellt und für 5 h im CO₂-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 10 min bei 200 \times g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und für 15 min bei 20 800 \times g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wird im sTfR-ELISA (s. 6.2.11) getestet.

6.1.5 Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Biotin

Zur Markierung von Zelloberflächenproteinen mit Biotin werden 50 ml Suspensionszellen ($\sim 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) zunächst mit 130 \times g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert und zweimal mit eiskaltem Dulbecco's-PBS⁺⁺ gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen bei 4 °C. In 5 ml eiskaltem Dulbecco's-PBS⁺⁺ werden 2,5 mg EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin gelöst, die Lösung sterilfiltriert und die gewaschenen Zellen in dieser Lösung für 30 min auf einem Kippschüttler inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal mit Dulbecco's-PBS⁺⁺, 0,1 % BSA und zweimal mit Dulbecco's-PBS⁺⁺ gewaschen und entweder sofort solubilisiert oder erneut bei 37 °C für 24 h im CO₂-Brutschrank kultiviert. Anschließend werden die Zellen für 10 min bei 200 \times g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert und für 15 min bei 20 800 \times g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Die Zellen werden solubilisiert (s. 6.1.2) und aus den Zellsolubilisaten und den Zellkulturüberständen TfR und sTfR immunpräzipitiert (s. 6.2.6.1).

6.2 Proteinbiochemische Methoden

6.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem BCA Protein Assay (Pierce, Rockford, USA) beruht darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung Cu²⁺-Ionen zu Cu¹⁺-Ionen reduzieren, die mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex bilden, der ein Absorptions-

maximum bei 562 nm besitzt. Auf einer 96-well-Mikroplatte werden jeweils 10 µl der proteinhaltigen Probe mit 200 µl BCA Reagenz versetzt, das entsprechend der Anleitung des Herstellers frisch angesetzt wurde, und für 30 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Absorption im Mikroplattenphotometer bei 562 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wird anhand einer Standardkurve mit BSA ermittelt.

6.2.2 Lyophilisierung von Proteinen

Lyophilisierungspuffer: 10 mM Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7,5

Die Lyophilisierung stellt eine schonende Methode dar, um Proteine unter Erhalt ihrer Aktivität zu konzentrieren und haltbar zu machen. Proteinlösungen werden gegen ein 100faches Volumen Lyophilisierungspuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert und anschließend bei -20 °C eingefroren. Die Deckel der gefrorenen Proben werden für den Druckausgleich mit einer Kanüle durchstoßen und in der CentriVac-Zentrifuge (Volumina kleiner als 1 ml) oder im Lyophilisator unter Hochvakuum eingedampft.

6.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgelpuffer: 0,4 % (w/v) SDS in 1,875 M Tris / HCl pH 6,8

Trenngelpuffer: 0,4 % (w/v) SDS in 1,25 M Tris / HCl pH 8,8

Elektrophoresepuffer: 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS in 20 mM Tris

SDS-Probenpuffer: 8 % (w/v) SDS; 40 % Glycerin; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau (4,35 × PP) in 250 mM Tris / HCl pH 6,8

reduzierend: + 8 % β-Mercaptoethanol (4 × PP)

Die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe erfolgt mittels der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) (Laemmli, 1970). Die Methode beruht auf der Wanderung geladener Moleküle zu dem jeweils entgegengesetzten Pol des angelegten Feldes. Das negativ geladene Detergens SDS lagert sich an Aminosäuren an, so dass die negative Ladung, die das Protein erhält, der molaren Masse des Proteins proportional ist. Weiterhin bricht SDS die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine auf, so dass diese vollständig denaturiert vorliegen. Kleine Proteine wandern folglich schneller durch die Gelporen als größere Proteine. Die Polyacrylamidgele werden entsprechend des Pipetierschemas in Tabelle 3 hergestellt. Die Proben werden mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min in einem Wasserbad erhitzt. Die Elektrophorese wird für ca. 75 min mit 20 mA je Polyacrylamidgel bei einem Maximum von 200 V im Elektrophoresepuffer durchgeführt (CBS-System).

Tabelle 3: Pipettierschema für Sammel- und Trenngele

Lösungen	Sammelgel 4,5 %	Trenngel 7,5%	Trenngel 10 %	Trenngel 12%
30 % Acylamid+ 0,8 % Bisacrylamid	0,2 ml	1,25 ml	1,6 ml	2 ml
Sammelgelpuffer	0,35 ml	–	–	–
Trenngelpuffer	–	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
H ₂ O _{Elix}	0,8 ml	2,5 ml	2,15 ml	1,75 ml
TEMED	2 µl	3 µl	3 µl	3 µl
APS (10 %)	6 µl	30 µl	30 µl	30 µl

6.2.4 Nachweis von Proteinen in der SDS-PAGE mit Silberfärbung

Fixierer 1:	50 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure
Fixierer 2:	30 % (v/v) Ethanol; 0,5 M Natriumacetat; 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd und 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat (frisch ansetzen)
Silberlösung:	0,1 % (w/v) Silbernitrat und 0,01 % (v/v) Formaldehyd (frisch ansetzen)
Entwickler:	2,5 % (w/v) Natriumcarbonat / Essigsäure pH 11,2 und 0,01 % Formaldehyd (frisch ansetzen)
Stopplösung:	10 % (v/v) Essigsäure

Zur Silberfärbung von Proteinen nutzt man aus, dass Ag⁺-Ionen durch Glutamat-, Aspartat- und Cysteinreste der Proteine komplexiert werden können. Im alkalischen Milieu reduziert Formaldehyd die komplexierten Ag⁺-Ionen zu elementarem Silber, das im Gel sichtbar wird. Alle Inkubationsschritte werden mit 50 ml der verwendeten Lösungen unter leichtem Schwenken auf einem Vertikalschüttler durchgeführt. Das Acrylamidgel wird für 20 min in Fixierer 1 und anschließend für 30 min in Fixierer 2 inkubiert. Danach wird das Gel dreimal für 10 min mit Wasser gewaschen und für 40 min in der Silberlösung inkubiert. Das Gel wird 3 mal für jeweils 30 s mit Wasser gewaschen und im Entwickler inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist und die Entwicklung mit Stopplösung beendet wird.

6.2.5 Westernblot

6.2.5.1 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembranen

Blotpuffer:	192 mM Glycin; 10 % Ethanol in 25 mM Tris
Ponceau S-Färbelösung:	0,2 % (w/v) Ponceau S; 1 % (v/v) Essigsäure

In der SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennte Proteine können für weitere Untersuchungen zugänglich gemacht werden, indem diese durch Blotten auf Nitrozellulosemembranen übertragen werden. Hierfür wird das Polyacrylamidgel zunächst für

15 min in Blotpuffer äquiliert. Der Transfer der Proteine auf die Membranen erfolgt im Tankblotverfahren in einer Transblot-Apparatur für 45 min bei 50 V und maximal 1 000 mA. Die transferierten Proteine können durch reversible Färbung mit Ponceau S auf der Nitrozellulosemembran sichtbar gemacht werden, indem die Nitrozellulosemembran mit der Ponceau S-Färbelösung für 1 min inkubiert wird. Die Proteinbanden werden durch mehrfaches Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Elux}}$ sichtbar und durch Waschen mit PBS wieder vollständig entfärbt.

6.2.5.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Blockierlösung: 1 % (w/v) Magermilchpulver in PBS

Strip-Puffer: 2 % SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol;
62,5 mM Tris / HCl pH 6,7

Nach dem Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran können diese mit einem spezifischen Antikörper markiert werden, der wiederum mit einem peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann. Zunächst wird die Membran für 30 min mit 20 ml Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu blockieren. Dann wird 1 h mit dem in 10 ml PBSB_M gelösten Primärantikörper inkubiert, anschließend zweimal mit 30 ml PBSB für jeweils 5 min gewaschen und für 1 h mit dem in 10 ml PBSB_M gelösten Sekundärantikörper inkubiert. Unspezifisch gebundener Sekundärantikörper wird durch viermaliges Waschen mit PBSB für jeweils 10 min entfernt und die Membran mit 2 ml *Chemiluminescence Reagent Plus* (jeweils 1 ml Lösung A und B) versetzt. Nach 1 min wird die Membran mit Whatman-Filterpapier gründlich getrocknet, zwischen zwei klare Plastikfolien eingeschlagen und in eine Filmkassette gelegt. Die Belichtungszeit der Filme variiert zwischen 1 min und 18 h.

Die Primärantikörper (OKT9, H68.4, Anti-Cathepsin G, GABiotin) wurden in einer Verdünnung von 1:3 000 bis 1:5 000 und die Sekundärantikörper (RAM*, SAR* und RAG*) in einer Verdünnung von 1:4 000 eingesetzt.

6.2.6 Immunpräzipitation

Kopplungspuffer:	1 % (v/v) NP-40; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % (w/v) BSA in 10 mM Tris / HCl pH 8,0
Waschpuffer A:	500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 % NP-40 in 50 mM Tris / HCl pH 8,0
Waschpuffer B:	500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % NP-40; 0,1 % SDS in 50 mM Tris / HCl pH 8,0
Waschpuffer C:	500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1 % NP-40; 0,5 % SDS in 50 mM Tris / HCl pH 8,0

Alle Inkubationen erfolgen bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler. Nach jedem Inkubations- und Waschschrift wird die Protein A-Sepharose bei 1000 × g für 1 min abzentrifugiert.

6.2.6.1 Immunpräzipitation von TfR und sTfR aus Zelllysaten und Zellkulturüberständen von HL60- und U937-Zellen

Zellkulturüberstand von HL60- (200 ml) und U937-Zellen (1000 ml) wird unter kräftigem Rühren bei 4 °C mit Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 40 % (w/v) gebracht und 30 min weitergerührt. Anschließend wird die Lösung zentrifugiert (17 000 × g, 30 min, 4 °C), das Pellet mit 10 ml (HL60-Zellen) bzw. 50 ml (U937-Zellen) PBS resuspendiert und über Nacht gegen 500 ml (HL60-Zellen) bzw. 2 500 ml (U937-Zellen) PBS dialysiert. Die Dialysate werden wie oben zentrifugiert und die Überstände zur Immunpräzipitation eingesetzt.

Für die Immunpräzipitation des humanen TfR wird 10 mg Protein A-Sepharose in 250 µl Kopplungspuffer aufgenommen und zunächst mit 20 µl RAM (\triangleq 70 µg) für 2 h inkubiert, da der OKT9-Antikörper schlecht an Protein A-Sepharose bindet. Die vorbeschichtete Protein A-Sepharose wird zweimal mit Kopplungspuffer gewaschen und für 2 h mit 10 µl OKT9 (\triangleq 12,5 µg) inkubiert. Die Protein A-Sepharose wird zweimal mit Kopplungspuffer gewaschen und über Nacht entweder mit 1 µg TfR in 500 µl Kopplungspuffer, mit den Zelllysaten aus 6.1.2, oder den dialysierten Zellkulturüberständen inkubiert. Anschließend wird die Protein A-Sepharose einmal mit Waschpuffer A, dreimal mit Waschpuffer B, einmal mit Waschpuffer C und einmal mit PBS gewaschen. Die gebundenen Immunkomplexe werden mit 20 µl 1 × Probenpuffer (reduzierend) für 5 min gekocht, mittels SDS-PAGE aufgetrennt (s. 6.2.3) und durch Blotten auf eine Nitrozellulosemembran überführt (s. 6.2.5).

6.2.6.2 Immundepletion von Neutrophiler Elastase aus A80-aktiven Fraktionen

10 mg Protein A/G-Sepharose wird in 250 µl Kopplungspuffer aufgenommen und für 2 h mit 20 µl Anti-Neutrophile-Elastase-Antikörper AHN-10 (\triangleq 10 µg) inkubiert. Die Protein A/G-Sepharose wird zweimal mit Kopplungspuffer gewaschen und über Nacht mit einer A80-aktiven Fraktion aus der Anionenaustauschchromatographie inkubiert. Anschließend

wird die Protein A-Sepharose durch Zentrifugieren pelletiert und der Überstand im *ProteaseSpot*-Assay getestet.

6.2.7 Membranpräparation aus HL60- und U937-Zellen

Homogenisierungspuffer: 1:10 (v/v) Dulbecco's-PBS⁺⁺ in H₂O_{Elix}

Solubilisierungspuffer: 1 % (v/v) Triton X-100 in PBS

Aus homogenisierten Zellen lassen sich durch differentielle Zentrifugation Membranfraktionen gewinnen, die verschiedenen Zellkompartimenten angehören. HL60- und U937-Zellen werden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet ($\sim 1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) und zentrifugiert ($130 \times g$, 15 min). Alle folgenden Schritte werden bei 4 °C durchgeführt. Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet mit 10 ml Dulbecco's-PBS⁺⁺ gewaschen. Das Zellpellet wird im gleichen Volumen Homogenisierungspuffer resuspendiert und für 10 min inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension in einem Teflon-Glas-Homogenisator ungefähr 3 min homogenisiert. Die homogenisierten Zellen werden zentrifugiert ($500 \times g$, 15 min) und der Überstand dekantiert. Dieser wird erneut zentrifugiert ($2\,600 \times g$, 15 min), der Überstand dekantiert und in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert ($100\,000 \times g$, 30 min). Das mikrosomale Membranpellet wird entweder in Solubilisierungspuffer aufgenommen oder in PBS resuspendiert.

6.2.8 TfR-Verdauassay

Zum Nachweis TfR-spaltender Proteasen wurde ein Assay entwickelt, in dem vollständiger TfR zu TfR-Fragmenten verdaut wird. Hierzu wird gereinigter plazentaler TfR (Fuchs *et al.*, 2001) (1 µg je Ansatz) mit potentiell proteaseenthaltenden Fraktionen für 18 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und entstandene TfR-Fragmente mit OKT9 oder H68.4 detektiert. Zur Kontrolle wird TfR ohne Zellfraktionen bei 37 °C inkubiert und als Standard wird eine nichtinkubierte TfR-Fraktion aufgetragen, in der neben komplettem TfR zusätzlich sTfR enthalten ist.

6.2.9 *ProteaseSpot*-Assay

Der *ProteaseSpot*-Assay ist ein kommerziell erhältlicher Proteaseassay, der von der Firma Jerini Biotools (Berlin) entwickelt wurde. In diesem *ProteaseSpot*-Assay werden C-terminal an eine Zellulosemembran gebundene Peptide ausgewählter Sequenz, die N-terminal mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, proteolytisch gespalten und der freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff im Überstand quantifiziert. Ein einzelner Peptidzellulose-*Spot* wird in eine Vertiefung einer 96-well-Mikroplatte gegeben und 10 min mit 200 µl Methanol inkubiert, dann 3 mal mit 200 µl PBS für jeweils 10 min gewaschen und jeder Peptid-

zellulose-Spot mit 200 µl der zu testenden Lösung für 20 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird jeweils 50 µl Überstand in eine neue Vertiefung pipettiert und die Fluoreszenz bei 325 nm Excitation und 420 nm Emission in einem Fluoreszenzphotometer gemessen.

6.2.10 sTfR-Freisetzungssassay

In PBS resuspendierte mikrosomale HL60-Zellmembranen werden zentrifugiert (16 000 × g, 15 min, 4 °C) und die pelletierten Membranen in eiskaltem PBS durch Auf- und Abpipettieren gründlich resuspendiert. Die resuspendierten Membranen (Proteinkonzentration ~ 6 mg/ml) werden in 50 µl Portionen aliquotiert und für 18 h bei 4 °C oder 37 °C inkubiert, anschließend werden die Membranen durch Zentrifugation (20 800 × g, 20 min, 4 °C) pelletiert, der Überstand mittels SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit OKT9 im Westernblot detektiert. Die sTfR-Freisetzung wird durch Detektion der Chemolumineszenz mit Hilfe eines Lumiimagers quantifiziert.

Die pH-abhängige sTfR-Freisetzung wird durch Resuspendieren der mikrosomalen HL60-Zellmembranen in 50 mM Bis-Tris / HCl-Puffer, 150 mM NaCl (pH 6,0 bis 7,5) oder 50 mM Tris / HCl-Puffer, 150 mM NaCl (pH 8,0 bis 9,5) und anschließender Inkubation bei 37 °C untersucht.

Zur Untersuchung der Membranverankerung der TfR-Sheddingprotease werden pelletierte HL60-Zellmembranen in PBS oder in hypertonischem Puffer (8,33 mM Na₂HPO₄; 1,67 mM KH₂PO₄, pH 7,4; 1 M NaCl), hypotonischem Puffer (8,33 mM Na₂HPO₄; 1,67 mM KH₂PO₄; pH 7,4; 0,015 M NaCl), bei pH 3,3 (50 mM Citrat; 150 mM NaCl) oder pH 9,5 (50 mM Tris / HCl-Puffer; 150 mM NaCl) für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Inkubation der Membranen in Gegenwart von phosphatidylinositolspezifischer Phospholipase C (PI-PLC) (2,5 U/ml) erfolgt für 30 min bei 37 °C mit einer entsprechenden Kontrolle ohne Zusatz von PI-PLC. Anschließend werden die Membranen zentrifugiert (16 000 × g, 15 min, 4 °C), in 500 µl eiskaltem PBS resuspendiert und wie zuvor erneut zentrifugiert. Die pelletierten, gewaschenen Membranen werden in 50 µl PBS gründlich resuspendiert und für 18 h bei 37 °C inkubiert und die sTfR-Freisetzung wie oben beschrieben quantifiziert. Die Messwerte werden gegen die Kontrollen normiert.

Die Bestimmung der Inhibitorsensitivität der sTfR-Freisetzung wird durch Zugabe der Inhibitoren (Konzentrationen an den jeweiligen Abbildungen) zu den in PBS oder Dulbecco's-PBS⁺⁺ resuspendierten mikrosomalen HL60-Zellmembranen und anschließender Inkubation bei 37 °C untersucht. Die Daten werden gegen Kontrollen ohne Inhibitor bei 4 °C und 37 °C normiert.

6.2.11 sTfR-ELISA

Blockierungslösung:	3 % Rinderserumalbumin; 10 % fetales Kälberserum in PBS; vor Gebrauch sterilfiltrieren
Citratpuffer:	40 mM Natriumcitrat / KOH pH 3,95
Färbelösung:	10 ml Citratpuffer; 100 µl TMB-Lösung; 3 µl 30 %iges Wasserstoffperoxid; vor Gebrauch frisch ansetzen und filtrieren
PBST:	0,05 % Tween-20 in PBS
Stopplösung:	2 M Schwefelsäure
TMB-Lösung:	200 mg Tetramethylbenzidin in 10 ml Ethanol / Dimethylsulfoxid 1:1 (v/v); vor Gebrauch sterilfiltrieren

Der ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) stellt eine sensitive und schnelle Methode dar, um ein Protein in einer Lösung zu quantifizieren. Hierzu wird ein Antikörper gegen das zu quantifizierende Protein oder ein entsprechender Bindungspartner an eine feste Phase gebunden („*coating*“) und das gesuchte Protein („*Ligand*“) aus der Testlösung in einem zweiten Schritt an diesen Antikörper gebunden. Das gebundene Protein wird in einem dritten Schritt mit einem weiteren Antikörper markiert und der Immunkomplex mit einem sekundären Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase verknüpft ist, in einer Farbreaktion nachgewiesen.

Zum Nachweis des sTfR wird dieser mittels OKT9-Antikörpern aus Zellkulturüberständen heraus an die Oberfläche von 96-*well*-Mikroplatten gebunden und mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen den gesamten TfR gerichtet ist, markiert. Der polyklonale Kaninchenantikörper wird schließlich mit einem Schwein-anti-Kaninchenantikörper nachgewiesen. Der sTfR-ELISA wird entsprechend Tabelle 4 durchgeführt. Verdünnungen der Antikörper werden in Dulbecco's-PBS⁺⁺ / 0,05 % Tween-20 gemacht. Nach jedem Inkubationsschritt außer nach dem Färbeschritt wird mit Hilfe eines Waschkammes dreimal mit etwa 200 µl PBST gewaschen, 5 min inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Das erhaltene Farbsignal wird mit einem Mikroplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 492 nm) gemessen. Die Quantifizierung erfolgt anhand von gereinigtem plazentalen TfR. Alle Bestimmungen werden in der Regel in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 4: Durchführungsschema für sTfR-ELISA

Inkubation	Zeit / min	Volumen / μ l	Substanz	Verdünnung
Coating	120	100	OKT9	1:500
Blockieren	30	175	Blockierungslösung	
Ligand	150	100	Zellkulturüberstand	
1. Antikörper	60	100	pAB063	1:1000
2. Antikörper	60	100	SAR*	1:3000
Färbelösung	nach Sicht	100	TMB-Färbelösung	
Stopplösung	< 1 h	+ 50	Stopplösung	

6.3 Chromatographische Methoden

6.3.1 Anionenaustauschchromatographie

Säulenmaterial: Mono Q HR 5 / 5

Puffer A: 0,1 % Triton X-100 (v/v) in PBS

Puffer B: 0,1 % Triton X-100 (v/v); 1 M NaCl in PBS

Bei diesem Verfahren wird ausgenutzt, dass Proteine aufgrund ihrer Nettoladung an eine geladene Säulenmatrix binden. Je nach Stärke der Wechselwirkungen, die von pH und Ionenstärke des Puffers und dem isoelektrischen Punkt des Proteins abhängen, können die Proteine mit einem ansteigenden Salz- oder pH-Gradienten eluiert werden. Das in dieser Arbeit verwendete Mono Q-Säulenmaterial besteht aus einer hydrophilen Polyetherharzmatrix mit einem quartären Ammoniumliganden ($-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). Die solubilisierte mikrosomale Membranfraktion (s. 6.2.7) wird zunächst sterilfiltriert (0,22 μm Filter) und auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule mittels einer ÄKTA-Chromatographieanlage aufgebracht. Nicht-gebundene Proteine werden als Durchlauf fraktioniert. Anschließend wird die Säule mit Puffer A gewaschen bis die Absorption bei 280 nm konstant bleibt und anschließend die Elution durch Anlegen eines linearen Salzgradienten (Puffer A gegen Puffer B, 0–100 % innerhalb von 12 ml) gestartet. Eluate werden in 0,6 ml Fraktionen gesammelt, in Mikrokollodiumhülsen gegen Puffer A dialysiert und zur Analyse entweder im TfR-Verdauassay (s. 6.2.8) oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Silberfärbung analysiert (s. 6.2.4).

6.3.2 Hydrophobe-Interaktionschromatographie

Säulenmaterial:	Resource ISO
Puffer A:	0,1 % Triton X-100 (v/v); 2 M KCl in PBS
Puffer B:	0,1 % Triton X-100 (v/v) in PBS

Die Hydrophobe-Interaktionschromatographie beruht auf dem Phänomen, dass Proteine unter hohen Ionenstärken hydrophobe Bereiche auf ihren Oberflächen aufweisen, die an hydrophobe Säulenmaterialien, den so genannten HIC-Adsorbentien, binden können. Durch Herabsetzen der Salzkonzentration werden die gebundenen Proteine der Stärke ihrer hydrophoben Eigenschaft entsprechend eluiert. Als Säulenmaterial wurde Resource ISO eingesetzt, das aus einer Divinylbenzol vernetzten Polystyrolmatrix mit einem Isopropylgruppen (-CH(CH₃)₂) besteht. Aktive Fraktionen aus der Anionenaustauschchromatographie (s. 6.3.1) werden mit festem KCl auf eine Konzentration von 2 M KCl gebracht und auf die mit Puffer A äquilibrierte Säule mittels einer ÄKTA-Chromatographieanlage aufgebracht. Nichtgebundene Proteine werden als Durchlauf fraktioniert. Anschließend wird die Säule mit Puffer A gewaschen bis die Absorption bei 280 nm konstant bleibt und anschließend die Elution durch Anlegen eines linear fallenden Salzgradienten (Puffer A gegen Puffer B, 0–100 % innerhalb von 14 ml) gestartet. Eluate werden in 0,6 ml Fraktionen gesammelt, in Mikrokollodiumhülsen gegen Puffer B dialysiert und zur Analyse entweder im TfR-Verdauassay (s. 6.2.8) oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Silberfärbung analysiert (s. 6.2.4).