

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Laborchemikalien von den Firmen Amersham (Braunschweig), Dako (Hamburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen.

2.1.2 Zellkulturmaterialien

Zur Zellanzucht wurden sterile Plastikkulturflaschen von Falcon (Becton-Dickinson, Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) sowie 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) verwendet.

2.1.3 Gewebe und Serumproben

Das Coloncarcinommaterial stammte aus der Abteilung Chirurgie des Behring-Krankenhauses (Leiter: Prof. Dr. Konradt) in Berlin und aus der I. Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin (UKBF) der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. Buhr).

Die Histologien wurden mit Schnitten aus dem Institut für Pathologie des UKBF (Direktor: Prof. Dr. Stein) angefertigt.

Untersuchungen mit Patientenseren wurden mit Serumproben aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des UKBF (Direktor: Prof. Dr. Tauber) durchgeführt.

2.1.4 Zelllinien

Die verwendeten Coloncarcinom-Zelllinien HT29, LS180 und SW620 waren in der Arbeitsgruppe schon vorhanden und wurden in Kulturen gehalten.

Die verwendeten Hybridom-Zelllinien wurden durch Fusion von Maus-Myelomzellen (NS-1) mit stimulierten Milzzellen etabliert.

2.1.5 Primärantikörper

Die Primärantikörper Aw 03.1.1 und Aw 05.1.14 wurden in der Arbeitsgruppe etabliert (unverdünnter Zellkulturüberstand).

Antikörper, die gegen humanes Carcinoembryonales Antigen (CEA) gerichtet sind, wurden von der Firma Dako (Dänemark) bezogen (Klon MaH II-7/Dako 7072).

2.1.6 Proteine

Die Collagene I, III, IV und V wurden von der Firma Sigma (München) bezogen.

Carcinoembryonales Antigen, gereinigt aus humanen Tumoren, wurde von der Firma CalBiochem (San Diego, USA) bezogen.

Fibronectin und Laminin wurden von Sigma (München) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten im Zellkulturbereich wurden an einer Sterilbank unter Laminar-Flow durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank von Heraeus (Hanau) bei 37°C und CO₂-Begasung (5%) kultiviert. Zentrifugiert wurde mit einer Digifuge GL von Heraeus.

Als Nährmedien wurden seromed[®] Fertigmedien der Firma Biochrom (Berlin) verwendet.

2.2.1.1 Puffer und Nährmedien

PBS

8,77g NaCl
0,2g KCl
1,15g Na₂HPO₄xH₂O
0,2g KH₂PO₄

ad 1000ml aqua bidest (pH 7,2).

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

500ml enthalten
3,7g/l NaHCO₃
4,5g/l D-Glucose

RPMI 1640

500ml enthalten
2,0g/l NaHCO₃

HT-Stammlösung 100-fach

136mg Hypoxanthin
39mg Thymidin

in 100ml aqua bidest. bei 75°C lösen,
lagern bei -20°C

Hybridomzellmedium

100ml (10%) Horse serum inaktiviert
3,5g Glucose
0,44g Glutamin
2ml Penicillin/Streptomycin 500-fach
ad 1000ml DMEM:RPMI (1:1)

Zelllinienmedium

100ml FKS (foetales Kälberserum) inaktiviert
0,44g Glutamin
2ml Penicillin/Streptomycin 500-fach
ad 1000ml RPMI

2.2.1.2 Passage der Zellen *in vitro*

In der Regel wurden die Zellklone im Dreitagesrhythmus ausgedünnt und mit frischem Medium versorgt. Außerdem erwies sich ein Auswechseln der Kulturflaschen nach ca. 5 Passagen als sinnvoll, um Kontaminationen durch Mikroorganismen zu vermeiden.

2.2.1.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst zu 100%-Konfluenz kultiviert. Der Inhalt einer 50 ml Kulturflasche wird in der Digifuge 3 min lang bei 900rpm pelletiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 1,5 ml fötalem Kälberserum mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. Es folgt die Überführung in ein 2ml Gefriervial mit Schraubverschluss der Firma Nunc. Um ein langsames Einfrieren zu ermöglichen, werden die Gefäße mit Zellstoff umhüllt, bevor sie zunächst bei -80°C eingefroren werden. Für eine Langzeitkonservierung ist es sicherer, die Zellen nach einem Tag in einem Stickstofftank bei -196°C aufzubewahren.

2.2.1.4 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen von Zellen wird auf 37°C angewärmtes Zellkulturmedium bereitgehalten. Die Gefriervials werden langsam handwarm aufgetaut und in warmem Medium aufgenommen. Um das Dimethylsulfoxid (DMSO) vollständig zu entfernen, ist es notwendig, die Zellen zweimal mit Medium zu waschen. Dabei werden die Zellen jedes Mal in der Digifuge 3min. lang bei 900rpm pelletiert und der Überstand abgesaugt.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellkulturflasche wird die Neubauer-Kammer verwendet. Um lebende und tote Zellen differenzieren zu können, werden sie mit Trypanblau behandelt. Der Farbstoff dringt durch die defekte Zellmembran toter Zellen ein und färbt so ihr Cytoplasma an.

Färbelösung

0,1% Trypanblau in 0,9% NaCl-Lösung

Durchführung:

Für die Zellzählung werden $20\mu\text{l}$ Zellkulturüberstand und $80\mu\text{l}$ Trypanblaulösung (1:4) gemischt, und davon $10\mu\text{l}$ in die Kammer gefüllt. Nach Aufgeben des Deckglases können die nicht gefärbten Zellen eines Großquadrates ausgezählt werden. Unter Berücksichtigung des

Verdünnungsfaktors (5) und des Kammerfaktors (10^4) wird die tatsächliche Zellzahl pro ml Kulturüberstand errechnet.

2.2.1.6 Limited-Dilution

Um die Monoklonalität eines antikörperproduzierenden Klons zu gewährleisten, bietet sich die von Coller und Coller (1983) beschriebene Methode der Limited-Dilution an.

Mittels Neubauer Zellkammer (siehe Methoden Kap. 2.2.1.5) wird die Zellzahl eines Klons bestimmt, und dann die Zellkultur mit Medium so weit ausgedünnt, dass sich statistisch nur noch eine Zelle pro Kultur befindet. Bei Aufzucht des Klons in einer 96er-Vertiefungsplatte kann das Wachstum aus einer einzigen Zelle mikroskopisch kontrolliert werden. Es empfiehlt sich, die Zellzahl bei der Aussaat dennoch etwas zu erhöhen, da nicht von einer hundertprozentigen Angehrate (Cloning Efficiency) ausgegangen werden kann.

2.2.2 Analytische Methodik

2.2.2.1 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Diese Proteinkonzentrationsbestimmung wurde von Smith et al (1985) beschrieben. Die dafür benötigten Lösungen A und B wurden von der Firma Pierce (Weiskirchen) bezogen.

Lösung A

1% Dinatriumsalz der Bicinchoninsäure
2% Natriumcarbonat-Monohydrat
0,16% Natriumtartrat
0,4% Natriumhydroxid
0,95% Natriumhydrogencarbonat
in 1000ml H₂O

Lösung B

4% Kupfersulfat-Pentahydrat
in 1000ml H₂O

Durchführung:

Die Proteinlösungen werden in einer Verdünnungsreihe zu je 20µl/Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Es ist darauf zu achten, dass die Konzentrationen im Messbereich des Photometers (etwa zwischen 50 und 500µg/ml) bleiben.

Parallel wird eine Standardkurve mit bovinem Serum-Albumin (BSA) in entsprechenden Verdünnungen erstellt.

Zur Proteinbestimmung werden Lösung A und Lösung B im Volumenverhältnis 1:50 zum Arbeitsreagenz vermischt. Jeweils 200µl Lösung werden zu jeder Proteinprobe gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 30min bei 37°C unter Schütteln kann der entstehende Farbkomplex bei 570nm in einem ELISA-Reader photometrisch quantifiziert werden.

2.2.2.2 Konzentrieren und Entsalzen von Proteinproben

Zur Konzentrierung werden die Proteinproben lyophilisiert, in der Vakuumzentrifuge eingengt oder durch Filtration angereichert.

In der Vakuum-Zentrifuge (Speed-Vac) der Firma Uniequip (Martinsried) können detergenzhaltige Proben in Eppendorf-Gefäßen oder Zentrifugengläsern eingengt werden, wobei das durch den starken Unterdruck verdampfende Lösungsmittel in einer Kühlfalle gesammelt wird. Die Zentrifuge verhindert Aufschäumen und Siedereizung.

Proteine, die in einem harnstoffhaltigen Puffer gelöst sind, können durch Ultrafiltration mit Centricon-Röhrchen der Firma Amicon (Beverly, MA, USA) angereichert werden. Die anisotrope Membran des Centricon-10-Röhrchens hält Proteine mit einem $M_r > 10k$ zurück, während das Lösungsmittel durch Zentrifugation (ca.1,5h bei max. 5000g) hindurchgelangt. Diese Methode ermöglicht auch ein Entsalzen der Proteinprobe. Das Salz kann durch mehrfaches Verdünnen mit H₂O durch die Membran gewaschen werden. Die Füllungskapazität eines Centricon-10-Röhrchens beträgt 2ml.

Größere Mengen Probe werden mit einem Centriprep-10-Filter der Firma Amicon (Beverly, MA, USA) in gleicher Weise konzentriert und entsalzt. Der Centriprep-10-Behälter nimmt bis zu 15ml Probe auf.

2.2.2.3 N-Terminale Sequenzbestimmung von Proteinen

Die N-terminale Sequenzierung zur Ermittlung der Aminosäuresequenz erfolgte nach Edman.

Dieser Vorgang wird automatisiert betrieben. Am Anfang steht die Ermittlung der Aminosäurezusammensetzung. Das zu untersuchende Peptid wird 24h in 6M HCl hydrolysiert und dann vermessen. Die Quantität der Aminosäuren kann über die Extinktion bestimmt werden, die Identifizierung erfolgt über Ionenaustauschchromatographie.

Beim eigentlichen Edman-Abbau wird nun vom aminoterminalen Ende eines frischen Peptidansatzes aus eine Aminosäure nach der anderen entfernt. Dazu wird das aminoternale Ende mit Phenylisothiocyanat gekoppelt und kann dann abgespalten werden. Das Abspaltungsprodukt ist eine zyklische PTH (Phenylthiohydantoin)-Aminosäure, die chromatographisch identifizierbar ist. Zusätzlich kann man die Aminosäurezusammensetzung des Peptids vor und nach der Abspaltung vergleichen, und so auf die abgetrennte Aminosäure schließen.

Maximal lassen sich so etwa 50 sequenzierte Aminosäuren eines Proteins bestimmen. Eine Ansequenzierung mit circa 10 Aminosäuren ist zur Klassifizierung des Proteins jedoch meist ausreichend, da von einer Teilsequenz aus durch Datenbankvergleich auf die Identität geschlossen werden kann. Der Datenbankvergleich wurde mit verschiedenen Hilfsprogrammen, die über den ExPasy-Server im Internet verfügbar sind, auf Basis der Swiss-Prot-Datenbank durchgeführt.

N-Terminale Sequenzbestimmungen von Proteinen und Peptiden wurden am Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin (Dr. Christoph Weise, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Hucho) durchgeführt.

2.2.2.4 Massenbestimmung von Peptiden mit der MALDI-TOF MS

Eine genaue Massenbestimmung von Peptiden kann mit der Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time-of-Flight Massenspektrometrie vorgenommen werden.

Durch Anregung eines kristallisierten Gemisches aus Analyt und Matrix durch einen Laserstrahl lösen sich Ionen heraus, die sich in Überschallgeschwindigkeit in ein Vakuum

hinein ausdehnen (Beavis, 1991). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden die Ionen gezwungen, die Röhre des Messinstruments zu durchfliegen. Je nach Größe des Peptidions ist seine kinetische Energie verschieden und führt zu bestimmten Fluggeschwindigkeiten. Die zeitlich versetzte Ankunft der Ionen kann durch empfindliche Messgeräte registriert werden und nach Eichung mit bekannten Peptiden einem bestimmten Molekulargewicht zugeordnet werden. Durch Verändern der Voltzahl des elektrischen Feldes können verschiedene Messbereiche eingestellt werden. Die Messungen erfolgten an einem Biflex-Massenspektrometer der Firma Bruker.

ACCA-Matrix

TA-Lösung:

0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in 2:1 H₂O/Acetonitril

20mg/ml Cyan Cinnamon Acid (CCA) in TA-Lösung

ATT-Matrix

6-Aza-2-thiothymin

Durchführung:

Zunächst wird das Probenlyophilisat in 2:1 Wasser/Acetonitril aufgenommen und mit 0,5% TFA angesäuert.

Das Target muss sorgfältig mit H₂O im Ultraschallbad und anschließend mit Acetonitril gereinigt werden, bevor Proben und Matrix auf die markierten Bereiche aufgetragen werden.

Die ersten zwei Auftragsfelder werden mit Standardlösungen belegt. Standardlösung und Matrix werden im Verhältnis 1:2 aufgetragen.

Als Standards werden Angiotensin (M+H⁺: 1047.2 D) und ACTH (M+H⁺: 2466.73 D) verwendet.

Jede Probe wird in 3 Verdünnungen aufgetragen. Das erste Feld wird mit 0,3µl Probe und 0,3µl Matrix belegt. Auf die weiteren Felder wird seriell 1:1 verdünnt.

2.2.3 Präparation von Coloncancerinomen

Beim Umgang mit nativem, potenziell humanpathogenem Material wurde unter besonderen Sicherheitsvorkehrungen gearbeitet. Dazu gehören Handschuhe, Mundschutz, Schutzkittel, gesonderte Abfallbehälter (und deren gesonderte Entsorgung), sowie die Autoklavierung benutzter Gefäße.

2.2.4 Aufarbeitung von Plasmamembranen

Die Isolierung der Coloncancerinommembranen erfolgt nach einer Modifikation der zur Leberaufarbeitung etablierten Methode von Harms und Reutter (1974).

2.2.4.1 Gewinnung von Plasmamembranen aus Patientenmaterial

Durchführung:

Alle erforderlichen Schritte zur Aufarbeitung erfolgen auf Eis bzw. werden bei 4°C durchgeführt. Die Coloncancerinomresektate werden vor ihrer Verarbeitung bei -80°C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wird das Material aufgetaut und zur Entfernung von NaCl mit isotonem Medium gewaschen. Das Coloncancerinomgewebe wird präparativ von umliegendem Fett und Bindegewebe befreit. Anschließend wird mittels der Embryonenquetsche weiteres Bindegewebe entfernt. Der entstandene Gewebebrei wird gewogen und anschließend im Verhältnis 1:10 mit hypotonem Medium verdünnt. Das Gemisch wird nun durch Gaze filtriert, wodurch erneut Extrazellulärsubstanz zurückbleibt, und im Dounce-Homogenisator mit 25 Hüben homogenisiert. Das Homogenisat wird im Verhältnis 1:100 mit hypotonem Medium verdünnt und 10min bei 1500rpm zentrifugiert. Das aus Zellkernen bestehende Pellet wird verworfen, der Überstand 20min bei 5000rpm zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand enthält die cytosolischen Bestandteile und kann somit ebenfalls verworfen werden.

Das Pellet wird in 10ml H₂O resuspendiert, zur weiteren Verwendung in Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -20°C eingeforen. Anschließend erfolgt eine Proteinbestimmung.

2.2.4.2 Gewinnung von Plasmamembranen aus Carcinom-Zelllinien

Durchführung:

Die adhären wachsenden Zellen werden mit sterilem PBS unter Zuhilfenahme eines Zellschabers abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen, wobei die Zellen jeweils durch Zentrifugation pelletiert werden. Das Zellpellet wird in isotonem Medium im Verhältnis 1:10 aufgenommen. Als Proteinase-Inhibitor wird 1% PMSF (100mmol/l in 2-Propanol) hinzugefügt. Die Suspension wird mit 25 Hüben im Dounce-Homogenisator behandelt. Anschließend wird die Suspension mit hypotonem Medium im Verhältnis 1:100 verdünnt durch eine Kanüle (Durchmesser 0,33mm) gepresst.

Es wurde bei 400g (1000rpm) für 10min zentrifugiert und danach das zellkernhaltige Pellet verworfen. Durch erneute Zentrifugation bei 7000g (12000rpm) für 20min befindet sich die Cytosolfraktion im Überstand und wird verworfen.

Das Pellet wird in hypotonem Medium im Verhältnis 1:10 bis 1:20 unter Zugabe von 1% PMSF resuspendiert.

Durch weitere optionale Zentrifugation bei 7000g für 20min können Cytosolreste und periphere Membranproteine entfernt werden.

2.2.4.3 Delipidierung

Die Entfernung von Plasmamembranlipiden erfolgt nach der Methode von Svennerholm und Fredmann (1979) und besteht in der Fällung mittels Methanol, Chloroform und Wasser. Dabei befinden sich die Lipide und niedermolekulare Substanzen in der Chloroform/Methanolphase, und die Proteine werden ausgefällt.

Durchführung:

Im Verhältnis 3/4/8 wird zu 300µl Solubilisat (optimale Proteinkonzentration 5-10mg/ml), 800µl Methanol und 400µl Chloroform gegeben. Anschließend wird 10min bei 4°C und 6000rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird nochmals

delipidiert, indem es mit 300µl Wasser, 800µl Methanol und 400µl Chloroform resuspendiert wird. Anschließend wird das Pellet in 1ml Ethanol aufgenommen.

2.2.4.4 Desialylierung

Durchführung:

Als Reaktionsgefäß für die Sialidase-Reaktion dient ein Eppendorf-Cup. Die Rohmembranpräparation wird mit 5-fach-konzentriertem Sialidasepuffer (0,5M Natriumacetat, pH 5) versetzt (1/4 des Probenvolumens). Mit Essigsäure wird der pH auf einen Wert kleiner 5,5 eingestellt. Die Sialidase (aus *Vibrio cholerae*) der Firma Boehringer (Mannheim) soll in einer Konzentration von 0,5U/ml eingesetzt werden und wird entsprechend hinzupipettiert.

Zum Luftabschluss wird 1µl Toluol auf die Oberfläche pipettiert.

Zur vollständigen Ausschöpfung der Enzymaktivität ist eine Inkubation über 3 Tage bei 37°C notwendig.

2.2.4.5 Solubilisierung von Membranproteinen

Die Solubilisationen wurden mit verschiedenen Puffern durchgeführt:

RIPA-Puffer

50mM	Tris
150mM	NaCl
1%	DOC
0,1%	SDS
1%	Triton X-100

Für die Harnstoffsolubilisierungen wurde der Lysis-Buffer aus der Anleitung Two-Dimensional-Electrophoresis-of-Proteins-Using-Immobilized-pH-Gradients der TU München (Angelika Görg et al, 1997) verwendet.

“Lysis Buffer” (Puffer mit 8M Harnstoff)

5g 5M Harnstoff, 10 min. lang mit Amberlite MB-1 (Ionenaustauscher) gerührt
200mg CHAPS
100mg DTT
10mg Pefabloc
ad 10ml aq. bidest

Der Puffer sollte immer frisch hergestellt werden. Möglich ist dennoch eine Aliquotierung in 1ml Eppendorf-Cups und sofortigem Einfrieren bei -78°C . Einmal aufgetauten Puffer nicht wieder einfrieren!

Puffer B

10ml 1M Tris x HCl pH 7,8
8,8g NaCl
0,2g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
0,1g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
ad 1000ml H_2O
1ml Nonidet P-40
10ml PMSF Lösung (100mM = 0,17g/10ml DMSO)

Durchführung:

Alle Arbeiten sind auf Eis durchzuführen, um die Proteaseaktivität so gering wie möglich zu halten.

RIPA:

Puffer und Proteinhomogenat werden zu gleichen Teilen gemischt. Das Proteinhomogenat wird vorher pelletiert und der wässrige Überstand verworfen. Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (1ml) wird nochmals gründlich homogenisiert. Danach wird der Ansatz mit jeweils 1% PMSF und PIM (Protease-Inhibitor-Mix) versetzt, um der Zerstörung der Proteine durch zelleigene Proteasen vorzubeugen, und über Nacht bei 4°C am Drehspeiß geschüttelt. Das entstandene Solubilisat wird dann 15min bei 12000rpm zentrifugiert. Im Überstand befindet sich dann idealerweise das gesuchte Protein in Lösung.

HARNSTOFF:

Proteingemisch und Puffer werden 1:2 gemischt und anschließend im Ultraschallbad 15min auf Eis solubilisiert und danach zentrifugiert.

2.2.4.6 Gewinnung von Solubilisaten aus Colocarzinom-Gesamtgewebe

Sollen neben der Plasmamembran auch Anteile der extrazellulären Matrix solubilisiert werden, so muss eine Gesamtgewebspräparation aus dem nativen Tumor vorgenommen werden. Dazu wird das Resektat unter flüssigem Stickstoff zermörsert und lyophilisiert. Das Homogenat kann wie oben beschrieben in Harnstoffpuffer solubilisiert werden.

2.2.5 Immunchemische Methoden**2.2.5.1 ELISA**

Der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung. Ist eine solche Reaktion erfolgt, kann der entstandene Immunkomplex durch einen zweiten Antikörper, der spezifisch gegen den Fc-Teil des Nachweisantikörpers (hier: MAK) gerichtet ist, sichtbar gemacht werden. Die Farbreaktion wird mit einem an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzym durch Zugabe eines Substrates ausgelöst. Verschiedene Verstärkungsmechanismen sind möglich. Alle ELISAs wurden auf 96-Well-Mikrotiterplatten von Falcon[®] (Becton-Dickinson, New Jersey, USA) oder Nunc (Wiesbaden) durchgeführt. Zur photometrischen Bestimmung der Extinktion diente ein ELISA-Reader der Firma SLT (Austria).

2.2.5.1.1 ELISA-Detektion mit Peroxidase**Acetatpuffer**

Na-Acetat
pH 4,5

ABTS-Stammlösung

(Azino-bis-3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
20mg/ml ABTS in Na-Acetatpuffer
pH 4,2

Entwicklungslösung

9,5ml Na-Acetatpuffer
0,5ml ABTS-Stammlösung
12µl H₂O₂

Durchführung:

Nach Beschichtung der Mikrotiterplatte wird die Platte dreimal mit Waschlösung gewaschen. Es folgt die Absättigung der unbesetzten Bindungsstellen der Platte mit Blockierungspuffer. Hierzu wird die Platte mit 200µl/Well über 90 min. bei RT inkubiert, danach wird dreimal gewaschen.

Als 2. Antikörper wird ein an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Kaninchen-Anti-Maus-IgG der Firma Dako (Dänemark) in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS verwendet. Davon wird in jedes Well 100µl pipettiert und 90min. bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgt dreimaliges Waschen.

Für die Farbreaktion werden 100µl der peroxidhaltigen Entwicklungslösung in jeden Napf pipettiert. Die Extinktion wird bei 405nm gemessen.

2.2.5.1.2 ELISA-Detektion mit Alkalischer Phosphatase

Waschlösung

0,9% NaCl
0,1% Polyoxyethylenesorbitan-Monolaurate (Tween 20®)
in H₂O

Blockierungspuffer

1% Bovines Serum-Albumin (BSA)
in PBS
zur Konservierung: Natriumazid (NaN₃)

Substratpuffer für alkalische Phosphatase

97ml Diethanolamin
0,2g NaN₃
0,1g MgCl₂ x 6 H₂O ad 1000ml H₂O, pH 9,8

Durchführung:

Nach Beschichtung der Mikrotiterplatte wird die Platte dreimal mit Waschlösung gewaschen. Es folgt die Absättigung der unbesetzten Bindungsstellen der Platte mit Blockierungspuffer. Hierzu wird die Platte mit 200µl/Vertiefung über 90min bei RT inkubiert, danach dreimaliges Waschen.

Als 2. Antikörper wurde ein biotinylierter Ziege-Anti-Maus-IgG der Firma Amersham in einer Verdünnung von 1:2500 in PBS verwendet. Davon wurden in jedes Well 100µl pipettiert und 90min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Auch hier anschließend dreimaliges Waschen. Mehrfach biotinylierte IgG bieten den Vorteil, dass mehr Enzym pro Bindungsstelle anhaften kann und so das Signal verstärkt wird. Dafür wird in einem weiteren Schritt an alkalische Phosphatase-gekoppeltes Streptavidin hinzugegeben. Das Präparat der Firma Jackson ImmunoResearch (Dianova, Hamburg) wird in einer Verdünnung von 1:10000 in PBS verwendet, 100µl/Well. Die Inkubationszeit beträgt 1h bei RT auf dem Schüttler. Es folgt dreimaliges Waschen.

Als Substrat wird para-Nitrophenylphosphat (Sigma 104[®]) der Firma Sigma (St. Louis) in einer Konzentration von 1mg/ml in Substratpuffer gelöst und davon 200µl in jedes Well pipettiert. Nach 20min Inkubationszeit auf dem Schüttler ist eine gelbe Farbreaktion zu beobachten. Die Extinktion wird mit dem Photometer bei 405nm bestimmt.

2.2.5.1.3 Differentieller ELISA auf Rohmembranproteinen

Diese Methode dient dazu, die Reaktion der Antikörper der Hybridomzellklone auf Coloncancer- bzw. Colonnormalgewebe zu differenzieren. Dabei werden zunächst die Gewebeaufbereitungen in 1% SDS aufgenommen und auf eine Endkonzentration von 20µg/ml mit Wasser verdünnt. Hiervon werden dann 50µl/Well (immer alternierend Carcinom-/Normalgewebe) über Nacht bei 37°C aufgetrocknet und unspezifische Bindungen im Anschluss mit PBS/1%BSA blockiert (30min RT).

Beschichtungspuffer1,59g Na_2CO_3 2,93g NaHCO_3

ad 1000ml aqua bidest., pH 9,6

Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer werden die Wells mit jeweils 50 μ l Zellkulturüberstand als erstem Antikörper überschichtet und 1h bei RT geschüttelt.

2.2.5.1.4 ELISA mit serieller Verdünnung

Zur Bestimmung idealer Antigen/Antikörperbindung lässt sich der ELISA modifizieren.

1D: Das Antigen wird in immer gleicher Konzentration verwendet, der Antikörper seriell verdünnt.

2D: Das Antigen wird in den Spalten (8 Konzentrationen) der Mikrotiterplatte seriell verdünnt, der Antikörper in den Zeilen (12 Konzentrationen).

2.2.5.2 Bestimmung des Immunglobulin-Typs

Die Antikörper-Subklasse wird mit dem Mouse-Monoclonal-Antibody-Isotyping-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bestimmt. Dabei ist der Typing-Stick mit Ziegen-Antikörpern beschichtet, die spezifisch gegen die Immunglobulin-Subklassen gerichtet sind. Der Teststreifen enthält ebenfalls eine Positivkontrolle. Ein Peroxidasegekoppelter anti-Maus-Ig-Antikörper detektiert die an den Teststreifen gebundenen Immunglobuline. Das Isotyping-Kit ermöglicht die Unterteilung der Antikörper in die Subklassen IgA, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} und IgM. Außerdem können die leichten Ketten kappa und lambda identifiziert werden.

2.2.5.3 Antikörperkonzentrationsbestimmung mit Wandantikörpern

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration eines Zellkulturüberstandes erfolgte mit dem Anti-Maus-Ig-Hybridoma-Screening-Reagens der Firma Boehringer (Mannheim).

Es handelt sich hierbei um einen Feste-Phase-gebundenen Wandantikörper, der mit allen Immunglobulinklassen und -subklassen der Maus reagiert. Mit einem geeigneten

Detektionssystem können die monoklonalen Antikörper aus dem Hybridoma-Überstand nachgewiesen werden und ihr Titer anhand eines Standards bestimmt werden.

Wandantikörper-Lösung

Das Originalpräparat enthält 1,5mg IgG-Protein und 3mg Saccharose. Dies wird in 0,5ml H₂O oder PBS gelöst, zu je 5µl in Eppendorf-Cups aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Beschichtungspuffer

0,2mol/l Natriumcarbonat in H₂O
pH 9,4-9,7

Waschlösung

0,9% NaCl
0,1% Polyoxyethylenesorbitan-Monolaurate (Tween 20[®])
in H₂O

Blockierungspuffer

1% Bovines Serum-Albumin (BSA)
in PBS
eine Spatelspitze NaN₃ zur Konservierung

Durchführung:

Zunächst wird die Wandantikörper-Lösung im Verhältnis 1:1000 mit Beschichtungspuffer verdünnt. Hieraus werden jeweils 50µl in jedes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zur ausreichenden Beschichtung muss 1h bei RT auf dem Schüttler inkubiert werden. Es wird dreimal gewaschen. Mit 200µl Blockierungspuffer pro Well wird die Platte nun 30min. bei RT abgesättigt. Es folgen erneut 3 Waschgänge.

Nun wird in jedes Well 100µl Zellkulturüberstand pipettiert, wobei für die Bestimmungen folgende Anordnung gewählt wurde:

Die Überstände wurden spaltenweise von links nach rechts seriell im Verhältnis 1:5 durchverdünnt.

Die erste Reihe enthielt einen Maus-IgG-Standard mit einer Konzentration von 10µg/ml, jede weitere Reihe einen Zellkulturüberstand.

Die 6. und die 12. Spalte wurden zur Leerwertkontrolle freigelassen.

Die Detektion erfolgt analog einem ELISA mit Alkalischer Phosphatase (siehe dort).

Die Extinktion der erhaltenen Signale wurde im Photometer bestimmt. Nach graphischer Auswertung konnte über die Bestimmung der halbmaximalen Extinktion und dem Vergleich mit dem Standard die Antikörper-Konzentration im Überstand ermittelt werden.

2.2.5.4 Immunblot

Im Immunblot werden Proteine, die durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulose geblottet wurden, mit immunologischen Methoden detektiert. Dies kann entweder mit Nitroblue/Indolylphosphat oder mit Luminol erfolgen.

Die Chemilumineszenzmethode mit Luminol basiert auf der Oxidation eines cyclischen Diacylhydrazids (Luminol) durch einen Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper. In Gegenwart von Wasserstoffperoxid wird Luminol oxidativ angeregt und emittiert beim Übertritt in den Grundzustand Licht, das einen aufgelegten Röntgenfilm schwärzt.

Blockierungspuffer

wahlweise:

1% Bovines Serum-Albumin (BSA)

in PBS

oder

5% (w/v) Milchpulver

0,1% TWEEN 20[®]

in PBS

eine Spatelspitze NaN₃ zur Konservierung

Waschlösung

0,3 % TWEEN 20[®]

in PBS

Substratpuffer alkalische Phosphatase

97ml Diethanolamin

0,2g NaN_3

0,1g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

ad 1000ml H_2O , pH: 9,8

Substrat

Nitroblautetrazolium (NBT) 1:700

BC-Indolyl-Phosphat (BCIP) 1:100

Mengen für 10ml Entwickleransatz:

100 μl BCIP

12,5 μl NBT

in alkalischer Phosphatase-Puffer

Reagentien für Luminoldetektion

Kodak XR-5 Film

Enhancend-Chemiluminescence (ECL) Western-Blotting-Detection-System RPN2106
(Amersham Life Science, Braunschweig)

Entwicklungsmaschine AGFA für Entwicklung und Fixierung des Films

Durchführung mit Nitroblue:

Die Nitrozellulosemembran wird zunächst 90min bei RT mit 30ml Blockierungspuffer inkubiert und danach dreimal gewaschen. Mit dem Primärantikörper werden 90min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Wird bei 37°C geschüttelt, verkürzt sich die Inkubationszeit um die Hälfte der Zeit. Nach anschließendem dreimaligen Waschen wird mit dem Sekundärantikörper, in diesem Fall ein biotinylierter Ziege-Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dianova, Hamburg) in der Verdünnung 1:2500, 1h bei RT inkubiert. Alkalische Phosphatase-gekoppeltes Streptavidin (siehe 2.2.4.1.2) wird nach dem nächsten Waschgang für 1h aufgegeben, bevor dann entwickelt werden kann. Die Substratlösung wird solange auf dem Western-Blot belassen, bis sich deutliche Banden zeigen. Die Reaktion wird mit aqua bidest. abgestoppt.

Durchführung mit Luminol:

Hier wird wie oben beschrieben ein Kaninchen-Anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase-Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:2000 verwandt. Nach der Inkubation sollten alle

Arbeiten in einer Dunkelkammer und bei Rotlicht durchgeführt werden. Die Blotmembran wird möglichst feucht in eine Klarsichtfolie und dann in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Nun wird die Membran 1min mit dem ECL-Reagenz inkubiert und, bevor der Röntgenfilm aufgelegt wird, mit Filterpapier getrocknet. Die Belichtungszeiten sind frei wählbar, sinnvoll sind mehrere Varianten von 5sec bis zu 2min. Anschließend kann der Film entwickelt werden.

2.2.5.5 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation erlaubt die Extraktion eines Antigens aus einer Proteingesamtfraktion. Dazu werden an Sepharose Proteine gekoppelt, die ihrerseits die Fähigkeit zur Absorption des F_c-Teils von Antikörpern haben. Mausantikörper werden so von ProteinG (IgG-Subklasse 1) bzw. ProteinA (IgG-Subklassen 2a/2b und 3) erkannt. Der gebundene Antikörper wird nach Komplexbildung mit dem Antigen präzipitiert. Für die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper sind serumfreie Zellkulturüberstände notwendig, da fremde Immunglobuline konkurrierend ebenfalls an Protein G/A gebunden werden.

Prewash

10mM	Tris x HCl, pH 7,2
1 M	NaCl
0,1%	Triton X-100

RIPA-Puffer

50mM	Tris x HCl
150mM	NaCl
1%	DOC
0,1%	SDS
1%	Triton X-100

Durchführung:

Die Durchführung der folgenden Schritte sollte bei 4°C erfolgen. 5-10mg/ml Kulturüberstand Sepharose-G 4 Fast Flow bzw. Sepharose-A Cl 4B werden mit PBS gewaschen. Falls die

Sepharose noch nicht gelöst ist, sollte sie 15min bei RT quellen. Danach ist die Sepharose bei 12 000 rpm kurz zu zentrifugieren bevor der Überstand (PBS) abpipettiert werden kann. Das ProteinG-Sepharose-Pellet wird nun mit Zellkulturüberstand inkubiert und mindestens 30min am Drehspieß geschüttelt. Nach der Inkubation wird wieder durch Zentrifugation pelletiert und das Pellet dreimal mit PBS gewaschen. Danach wird die Antigensolubilisation (siehe 2.2.3.5) aufgegeben und 1h inkubiert. Der erhaltene Immunkomplex aus ProteinG-Sepharose, Antikörper und Antigen wird pelletiert und das Präzipitat mit dreimal RIPA-Lösung (Solubilisationspuffer), zweimal Prewashlösung und einmal PBS gewaschen. Eine Modifizierung der Waschgänge kann erforderlich werden, falls sich zuviel Antigen vom Immunkomplex löst. Das Immunpräzipitat wird anschließend mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und vor der gelelektrophoretischen Auftrennung noch 3min gekocht, um die Sepharose vom Immunkomplex abzutrennen. Durch SDS-PAGE (7,5%) werden die präzipitierten Proteine dann aufgetrennt.

2.2.6 Elektrophoretische Methoden

2.2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung von Makromolekülen wird nach der Methode von Laemmli et al (1970) durchgeführt.

Ein Gelnetz aus polymerisiertem Acrylsäureamid und dem quervernetzenden N,N'-Methylenbisacrylsäureamid dient hierbei der Auftrennung. Zur Initiation der Polymerisation werden als Radikalbildner Ammoniumperoxodisulfat bzw. Ammoniumpersulfat und N,N,N',N'-Tetraethylendiamin (TEMED) verwendet. Durch unterschiedliche Konzentration der Acrylamide lässt sich die Porengröße des Gels und damit das Laufverhalten der Proteine variieren. Proteine, deren Massen sich um ungefähr 2% unterscheiden (z.B. 40 und 41kD große Moleküle mit einer Differenz von etwa zehn Aminosäureresten) lassen sich so noch trennen. Ein großporiges Sammelgel über der eigentlichen Trennmatrix hilft bei der Konzentrierung des Proteingemisches zu einer

Laufmittelfront, bevor die Proteine dann durch ein engeres Netz in verschiedene Molekulargewichtsbereiche aufgetrennt werden.

ABA-Stammlösung

30% Acrylamid-Bisacrylamidlösung, Verhältnis 29:1

Sammelgelpuffer

6g Tris

48ml HCl (1M) pH 6,8

ad 100ml aq.bidest.

Trenngelpuffer

45,4g Tris

60ml HCl (1M) pH 8,8

ad 200ml aq.bidest.

TEMED

Originalpräparat von BioRad (California, USA)

APS-Lösung 10% (w/v)

1g Ammoniumpersulfat

ad 10ml aq.bidest.

Laufpuffer 10-fach

30g Tris x HCl

144g Glycin

10g SDS

ad 1000ml aq.bidest., pH 8,8

Die Lösung wird 1:10 verdünnt eingesetzt.

Probenpuffer 5-fach, reduzierend (5*PP)

300mmol/l Tris x HCl

25% (v/v) Dithiothreitol (DTT)

0,015% (w/v) Bromphenolblau

50% (v/v) Glycerin

15% (w/v) SDS

Probenpuffer 5-fach, nicht reduzierend

dito, jedoch ohne DTT

Die Proben lassen sich in unterschiedlicher Weise aufbereiten:

- a. SDS-PAGE unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen:

Die Probe wird mit reduzierendem 5*PP im Verhältnis 5:1 gemischt und 3min bei 95°C aufgeköcht.

- b. SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen:

Die Probe wird nicht erhitzt.

- c. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden und denaturierenden Bedingungen:

Die Probe wird mit nicht-reduzierendem 5*PP aufgeköcht.

- d. SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen:

Die Probe wird mit nicht-reduzierendem 5*PP versetzt und nicht aufgeköcht.

Reagens	7,5%	6%
Acrylamid-		
Bisacrylamid	2,5ml	2ml
Trenngelpuffer	2ml	2.5ml
SDS 1%	1ml	1ml
aqua bidest.	4,3ml	4,3ml
APS	100µl	100µl
TEMED	10µl	10µl

Reagens	4% (immer)
Acrylamid-	
Bisacrylamid	1ml
Sammelgelpuffer	2,5ml
SDS 1%	1ml
aqua bidest.	5,4.ml
APS	100µl
TEMED	10µl

Tabelle 2: Komponenten zur Herstellung von SDS-PAGE-Trenn- und Sammelgelen.

Durchführung:

Das Trenngel wird gemäß der obenstehenden Tabelle hergestellt. Bei analytischen Läufen reicht ein bloßes Mischen, bei präparativen Läufen empfiehlt sich ein Anionenaustausch der Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung (z.B. mit Amberlite MB-1) zur Reduktion des Acrylsäuregehalts (Acrylsäurereste binden sonst an Aminosäuren und verändern so das Molekulargewicht von Proteinen). Nach dem Mischen wird der Ansatz unter dem Abzug 10min entgast. Das Gemisch wird dann zwischen zwei Glasplatten (6x4cm) bis 1,8cm unter den Rand eingegossen (System von BioRad) und mit Isopropanol dünn beschichtet, um bei der Polymerisierung einen gleichmässigen Abschluss zu erreichen. Nach etwa 1h ist die Polymerisierung abgeschlossen und das frische Sammelgel kann, nach Abgießen des Isopropanols, aufgegeben werden. Hierbei wird ein Probenkamm zwischen die Glasplatten eingesetzt, der Taschen für die spätere Probenaufgabe ausspart. Nach der Polymerisierung des Sammelgels können die Proben aufgetragen werden; die Probenaschen haben ein Fassungsvermögen von ca. 25µl.

Molekulargewichtsbestimmung:

Als Referenz zur Bestimmung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proben werden Standardproteingemische aufgetragen. Es wurden zwei verschiedene Prestained Marker der Firma Sigma (München) verwendet.

Prestained-Marker	High-Marker
180kD bzw. 205kD	205kD
116kD bzw. 112kD	112kD
84kD bzw. 87kD	97kD
58kD	68kD
48,5kD	45kD
36,5kD	
26,6kD	

Nach dem Probenauftrag werden die Gele in die Elektrophoresekammer (BioRad) eingebaut und mit Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese ist dann beendet, wenn die Laufmittelfront (Bromphenolblau) den unteren Rand des Trenngels erreicht hat. Bei einer konstanten Spannung von 100V dauert der Lauf 1,5h, bei höher angelegten Spannungen (max. 200V) dementsprechend kürzer, allerdings muss mit einer schlechteren Trennqualität gerechnet werden.

2.2.6.2 Gelfixierung und -färbung

2.2.6.2.1 Coomassie-Blue-Färbung

Die Anfärbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blue zur Proteindetektion ist eine schnelle und einfache Methode mit einer limitierenden Nachweisgrenze von ca. 0,1µg (ca. 2pmol).

Färbelösung

400ml Methanol
100ml Essigsäure
1g Coomassie Brilliant Blue G-250
ad 1000ml aq. bidest

Entfärbelösung

50ml Methanol oder Ethanol
75ml Essigsäure
ad 1000ml aq. bidest

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wird das Sammelgel vom Trenngel abgelöst. Das Trenngel wird in ca. 50ml Färbelösung gegeben und bei RT geschwenkt. Eine Inkubationsdauer von 30min ist hierbei ausreichend. Danach wird unter ständigem Wechsel der Lösung solange entfärbt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar sind. Der Entfärbeprozess kann durch Schütteln bei 37°C etwas beschleunigt werden.

2.2.6.2.2 Silberfärbung

Eine noch sensitivere Methode zum unspezifischen Proteinnachweis ist die Silberfärbung. Selbst Proteinmengen von 20ng können noch erkannt werden. Die Methode basiert auf den Ausführungen von Heukeshoven und Dernick (1985).

Fixierlösung

50% Ethanol
12% Essigsäure
25µl 37% Formaldehydlösung
in H₂O

Waschlösung

50% Ethanol
in H₂O

Lösung A

10mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O
in 50ml H₂O

Lösung B

100mg AgNO₃
37µl 37% Formaldehydlösung
in 50ml H₂O

Lösung C

3g Na₂CO₃
0,25mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O (ein Krümel)
25µl 37% Formaldehydlösung
in 50ml H₂O

Durchführung:

Das Trenngel wird nach der Elektrophorese mindestens 20min in der Fixierlösung bei RT langsam geschüttelt. Danach wird dreimal 5-10min gewaschen. Dann wird 1min mit Lösung A (Inkubationslösung) inkubiert und gleich anschließend mit H₂O dreimal 20sec gespült. Der Färbeprozess mit Lösung B (Silbernitrat) im Anschluss sollte 20min nicht übersteigen.

Nach einem weiteren Spülvorgang von zweimal 20sec kann das Gel mit Lösung C entwickelt werden. Hierbei ist nach Sicht zu arbeiten. Das Entwicklerbad muss beim Auftauchen der ersten Banden sofort entfernt und die Reaktion mit reichlich H₂O abgestoppt werden.

Das Gel kann dann in Fixierlösung und 2-5% Glycerin gelagert und/oder zwischen zwei Folien (Einmachhaut, Alba) und Whatman-Filterpapier 1h auf dem Geltrockner getrocknet werden.

2.2.6.3 Western-Blot

Beim Western-Blotting werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran überführt. Bei nachfolgender Immundetektion finden insbesondere Nitrocellulosemembrane Anwendung. Die Blots werden in Anlehnung an Towbin und Scott im Tank-Blot-Verfahren durchgeführt. 5min vor Abschluss der SDS-PAGE wird die Nitrocellulosemembran (Schleicher und Schüll, Düsseldorf) in Blotpuffer äquilibriert.

Das Blot-Sandwich wird in folgender Weise zusammengesetzt:

- a. Anodengitter (weiß/rot)
- b. Gitterschwamm
- c. Whatman- Filterpapier
- d. Eine Nitrozellulosemembran
- e. SDS-Gel
- f. Whatman-Filterpapier
- g. Gitterschwamm
- h. Kathodengitter (schwarz)

Der Transfer findet bei 4°C und bei konstanter Stromstärke von 250mA 1h statt.

Blot-Puffer

42,75g	Glycin
15,15g	Tris
10%	Ethanol
ad 5l aqua bidest.	

2.2.6.4 Präparativer Western-Blot mit PVDF-Membran

Die Vorschrift für den präparativen Elektrobplot auf PVDF-Membran stammt von Matsudaira (1987).

Die Besonderheit dieser Methode besteht darin, dass die fixierten Proteine für eine Sequenzanalyse direkt von der Membran extrahiert werden können.

CAPS-Puffer

22,13g 3-(cyclohexylamino)-1-Propano-Sulfonsäure in
990ml aqua bidest.

Titration mit 2M NaOH auf pH 11, dann auffüllen auf 1l mit aqua bidest.

Lagerung bei RT

Blot-Puffer (10mM CAPS, 10% Methanol, pH11)

100ml CAPS-Puffer

100ml Methanol

ad 1000ml aqua bidest.

Durchführung:

Zwei PVDF-Membranen werden einige Sekunden in Methanol gelegt, danach in Blot-Puffer.

Das Gel wird nach der Elektrophorese für 5min ebenfalls in Blot-Puffer eingelegt.

Das Blot-Sandwich wird in folgender Weise zusammengesetzt:

- a. Anodengitter (weiß/rot)
- b. Gitterschwamm
- c. Whatman- Filterpapier
- d. Zwei PVDF-Membranen
- e. SDS-Gel
- f. Whatman-Filterpapier
- g. Gitterschwamm
- h. Kathodengitter (schwarz)

Bei RT erfolgt der Transfer bei konstant 90V über 30min.

Die Membranen sollten nach dem Blotvorgang 5min mit aqua bidest. abgespült werden und können dann gefärbt werden (Ponceaufärbung).

2.2.6.5 Färbung der Blotmembran mit Ponceau-Rot

Um Proteine auf einer Blotmembran sichtbar zu machen, wird mit Ponceau-Rot gefärbt. Für einen präparativen PVDF-Blot sollte darauf geachtet werden, dass frische Ponceau-Lösung verwendet wird.

Ponceau-Rot Lösung

0,2% Ponceau S-Solution (Boehringer, Mannheim)

in 3% Essigsäure

Durchführung:

Die Blotmembran wird auf einem Färbetablett gleichmäßig für ca. 30sec mit Ponceau-Rot Lösung benetzt. Die Lösung wird abgegossen und die Blotmembran mehrfach mit reichlich 10% Essigsäure gewaschen. Es bleiben die angefärbten Proteinbanden zurück.

Soll die Membran für einen Immunblot weiterverwendet werden, kann das Ponceau-Rot mit 0,3% Tween in PBS vollständig entfernt werden. Nicht vorgefärbte Markerbanden (z.B. High-Marker) sollten vorher mit einem Bleistift markiert werden.

2.2.7 Chromatographische Methoden

2.2.7.1 High-Performance-Liquid- Chromatography über MonoQ

Für die Auftrennung eines Proteingemisches mit Hilfe der High-Performance-Liquid-Chromatography finden zwei MonoQ-Säulen der Firma Pharmacia Verwendung. Diese fungieren als Anionenaustauscher und binden Proteine mit negativen Ladungen mit unterschiedlicher Stärke. Bei Anlegen eines Salzgradienten werden Proteine mit geringer negativer Ladung zuerst eluiert. Die freigesetzten Proteine werden durch einen Detektor erkannt und können hinterher den gesammelten Einzelfractionen zugeordnet werden.

Die Puffer müssen frisch hergestellt werden und dürfen nie über 37°C erhitzt werden. Vor Gebrauch werden sie über einen Milipore®-Filter mit der Porengröße 0,45µm filtriert und anschließend im Ultraschallbad entgast.

Puffer A (8M Harnstoff)

250ml 9,6M Harnstoff

3ml 1M Tris x HCl pH 7,8

pH 7,2 mit HCl einstellen

ad 300ml H₂O**Puffer B (8M Harnstoff)**

250ml 9,6M Harnstoff

2ml 1M Tris x HCl pH 7,8

17,53g NaCl

pH 7,2 mit HCl einstellen

ad 300ml H₂O

Auf die genauen Bedienungsschritte der HPLC-Anlage wird hier nicht weiter eingegangen. Die Flussrate beträgt je nach Druckverhältnissen zwischen 0,5ml/min und 1ml/min. Die Probenauftragsschleife kann je nach Probenvolumen variiert werden. Die Steilheit des Salzgradienten kann situationsbedingt verändert werden.

2.2.7.2 HPLC über MonoS

Die MonoS-Chromatographie (Pharmacia Biotech, Freiburg) ist eine Kationenaustauschchromatographie. Während im Anionenaustausch (MonoQ) das Chlorid des Salzgradienten (NaCl) als effektiver Eluent dient, ist es hier das Natrium. Proteine mit geringer positiver Ladung werden zuerst von der Säule gewaschen. Die Puffer und die Probenauftragsbedingungen entsprechen denen bei der HPLC über MonoQ.

2.2.7.3 RP18-HPLC von Peptiden (Micro-HPLC)

Die RP18-HPLC (Shimadzu Deutschland, Duisburg) ermöglicht das Auftrennen von Peptiden in einzelne Fraktionen. Bei der Reversed-Phase-Chromatographie werden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Säule und den aufgegebenen Peptiden zunutze gemacht. Polare Peptide binden am schlechtesten und erscheinen im Durchlauf. Nach Anlegen eines Gradienten aus Acetonitril, einem unpolaren Lösungsmittel, werden die Peptide entsprechend ihren unpolaren Bindungskräften von der Säule gelöst und können mit Hilfe eines chromatographischen Detektors fraktioniert werden.

2.2.7.4 Immunaffinitätschromatographie

Die Immunaffinitätschromatographie (IAC) bietet den Vorteil, dass große Mengen Antigen aus einer Gesamtfraktion isoliert werden können. Darüberhinaus wird der an Protein G immobilisierte Antikörper, der der Extraktion des Antigens dient, über seinen F_c-Teil kovalent an die Chromatographiesäule gekoppelt, so dass sie mehrfach benutzbar ist.

Prewash

10mM	Tris x HCl, pH 7,2
1 M	NaCl
0,1%	Triton X-100

RIPA-Puffer

50mM	Tris x HCl
150mM	NaCl
1%	DOC
0,1%	SDS
1%	Triton X-100

Kopplungsreagenz

50mM	Dimethylpimelimidat (PIERCE, Rockford, IL; USA)
in 0,2M	Triethanolamin pH8,2
pH-Wert ggf. mit NaOH nachkorrigieren	

Durchführung:

Zuerst wird 1ml Sepharose mit PBS gewaschen und danach kurz abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Alternativ können HiTrap[®]-Fertigsäulen (Pharmacia Biotech, Freiburg) verwendet werden. Das Sepharosepellet wird nun 1h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C mit mindestens 10mg Antikörper pro ml Sepharose inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschgang mit PBS mit vor- und nachheriger Zentrifugation wird mit 0,2M Triethanolamin, pH 8,2, gewaschen, um ein ideales Milieu für die Kopplungsreaktion zu erhalten. Das frisch angesetzte Kopplungsreagenz wird zur Sepharose gegeben und 45min bei RT geschüttelt. Danach wird die Sepharose abzentrifugiert, der Überstand entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 50mM Ethanolamin, pH 8,2, gestoppt. Die Sepharose wird kurz aufgewirbelt und 10-20min stehengelassen, bevor nochmals mit PBS gewaschen wird. Um nicht gekoppelte Antikörper von der Säule zu lösen wird jetzt zweimal mit Diethylamin pH 11,5 gewaschen (pH-Schock). Um das pH-Milieu wieder zu neutralisieren wird dreimal mit PBS gewaschen.

Das nun aufzugebende Antigensolubilisat sollte möglichst langsam über die Säule laufen, es bietet sich an, die Solubilisation mit einem Pumpsystem mehrere Stunden über die Chromatographiesäule zu pumpen. Nach der Inkubation wird die Säule mit Prewash und PBS gewaschen. Um das gebundene Antigen von der Säule zu lösen wird durch pH-Schock mit Diethylamin pH 11,5 eluiert. Das Eluat wird in 500µl Fraktionen gesammelt.

Die Immunaффinitätssäule kann unter PBS mit 0,02% NaN₃ bei 4°C gelagert werden.

2.2.8 Enzymatische Verdauungen

2.2.8.1 Desialylierung mit Neuraminidase

N-Acetylneuraminsäuren (Sialinsäuren) befinden sich als Schutzschicht auf vielen Glykoproteinen und können antigene Epitope auf der Tumorzelloberfläche maskieren und so für Antikörper unkenntlich machen. Daher empfiehlt sich die Desialylierung.

Reagenzien

Neuraminidase aus *A. ureaf* (Boehringer, Mannheim)

0,1mol/l Natriumacetat, pH 5,5

Optimale katal. Konz.: 1U/ml

Sialidasepuffer 5fach

Durchführung:

2µg Protein gelöst in 2µl PBS werden in 19µl H₂O und 6µl 5fach konzentriertem Sialidasepuffer aufgenommen und auf pH 5-5.5 eingestellt. Es folgt die Zugabe von 3µl Neuraminidase (1U/ml) und eine Inkubation im Intervallschüttler bei 37°C.

2.2.8.2 PNGase-F-Verdau von Glycoproteinen

Peptid-N⁴-(N-acetyl-glucosaminy-)-asparagin-amidase F (PNGaseF) ist ein Enzym, das N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide von Glycoproteinen abspalten kann.

Reagenzien

PNGaseF rekombinant von Boehringer, Mannheim (100U/ml)

10% SDS

PNGase Puffer + 100mM EDTA + 1% Mega 10

Protease-Inhibitor-Mix

Durchführung:

1µg Protein gelöst in 1µl PBS werden mit 0,125µl 10% SDS versetzt und die Lösung auf pH 7.5 kontrolliert. Es ist entscheidend, dass das Protein für den Verdau vollständig gelöst ist. Aus diesem Grund schließt sich eine 20min Ultraschallbehandlung an, es folgt ein Kochen bei 96°C über 3 Minuten und erneut 20min im Ultraschallbad. Danach werden 2,5µl Puffer und 0,5-5µl Enzym sowie 1µl Protease-Inhibitor-Mix hinzugegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.8.3 Trypsin-Verdau

Der Trypsinverdau von gelöstem Protein wird mit bovinem Trypsin der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt

Protease-Puffer

0,5%	NH ₄ HCO ₃
5mmol/l	Ca ⁺⁺

Das lyophilisierte Trypsin wird in einer Konzentration von 3mg/ml in 0,01% TFA gelöst. 2µl Proteinlösung (ca. 5mg/ml) werden mit 2µl Trypsinlösung und 40µl Proteasepuffer über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8.4 Chymotrypsin-Verdau

Der Chymotrypsinverdau von gelöstem Protein wird mit bovinem Chymotrypsin der Firma Boehringer (Mannheim) durchgeführt.

Protease-Puffer

0,5%	NH ₄ HCO ₃
5mM	Ca ⁺⁺

Das lyophilisierte Chymotrypsin wird in einer Konzentration von 3mg/ml in 0,01% TFA gelöst. 2µl Proteinlösung (ca. 5mg/ml) werden mit 2µl Chymotrypsinlösung und 40µl Proteasepuffer über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8.5 Pronase-Verdau

Der Pronaseverdau von gelöstem Protein wird mit Pronase aus *Streptomyces griseus* (Boehringer Mannheim) durchgeführt.

Pronase-Puffer

0,1mol/l	Tris x HCl (pH 8,0)
1mmol/l	CaCl ₂

Das lyophilisierte Enzym wird in einer Konzentration von 10mg/ml in Pronase-Puffer gelöst. 2µl Proteinlösung (ca. 5mg/ml) werden mit 0,6µl Pronaselösung und 40µl Pronasepuffer über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.8.6 In-Gel-Verdau von Proteinen mit Trypsin

Der In-Gel-Verdau von Proteinen erfolgt nach einem Protokoll der Protein and Peptide Group des European Microbiological Laboratory (EMBL), Heidelberg, 1997.

Reduktionspuffer

10mM Dithiotreitol (DTT)

in 0,1M NH_4CO_3

Alkylierungspuffer

55mM Iodacetamid

in 0,1M NH_4CO_3

Verdauungspuffer

50mM NH_4CO_3

5mM CaCl_2

12,5ng/ μl Trypsin

Ausschneiden der Proteinbanden aus dem Polyacrylamidgel:

Die folgenden Arbeiten werden mit Handschuhen und Pinzette durchgeführt:

Das Gel wird mit Wasser gespült und die mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbten Banden mit einem sauberen Skalpell möglichst eng ausgeschnitten und in etwa 1x1mm große Stücke zerlegt. Die ausgeschnittenen Gelstücke werden in ein 1,5ml Eppendorf-Cup überführt.

Reduktion und Alkylierung:

Die Gelstücke werden für 5min mit H_2O gewaschen, die Flüssigkeit wird nach Zentrifugation wieder entfernt. Mit einem Homogenisator werden die Gelstücke zu einem gleichförmigen Brei zermörsert. Das Homogenisat wird mit dem dreifachen Volumen an Acetonitril solange inkubiert, bis es vollständig zusammengeschrumpft ist und eine weißliche Masse bildet. Nach Zentrifugation wird das Acetonitril vollständig entfernt und die Gelmasse mit einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Proteine werden nun erneut reduziert, weil es nach SDS-PAGE und Färbung durch den Sauerstoffgehalt der Luft wieder zu Oxidationsreaktionen gekommen sein kann.

Mit einer Menge an Reduktionspuffer, die die Gelpartikel gerade bedeckt, wird die getrocknete Masse rehydratisiert und bei 56°C für 30min inkubiert. Nach Zentrifugation und Entfernung der überschüssigen Flüssigkeit wird die Gelmasse erneut mit Acetonitril dehydratisiert. Nach Entfernung des Acetonitrils durch Zentrifugation wird das Gel mit der dreifachen Volumenmenge an Alkylierungspuffer für 20min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die überschüssige Iodacetamidlösung wird abpipettiert und die Gelpartikel 15min lang mit 0,1M NH_4CO_3 gewaschen. Die Flüssigkeit wird nach Zentrifugation vollständig entfernt und die Gelmasse wieder mit Acetonitril dehydratisiert. Danach werden die Gelpartikel erneut mit der Vakuumzentrifuge getrocknet.

In-Gel-Verdau mit Trypsin:

Die Gelpartikel werden mit Verdauungspuffer während 30-45min rehydratisiert. Nach 15-20min sollten die Proben überprüft werden und mehr Puffer hinzugegeben werden, falls alle Flüssigkeit vom Gel resorbiert wurde. Der verbleibende Überstand wird abpipettiert und die Gelmasse mit 5-25 μl Verdauungspuffer ohne Trypsin überdeckt, um die Proben feucht zu halten. Die Proben werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Extraktion der Peptide:

Die Proben werden mit 10-15 μl 25mM NH_4CO_3 -Lösung versetzt und bei 37°C für 15min auf dem Schüttler inkubiert. Der Überstand wird nach Zentrifugation entnommen und aufbewahrt. Die Gelpartikel werden nun mit der ein- bis zweifachen Volumenmenge an Acetonitril für 15min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Darauf werden die Gelpartikel abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und aufbewahrt.

Zum Pellet werden 40-50 μl 5% Ameisensäure oder 5% Trifluoressigsäure gegeben und zusammen bei 37°C für 15min mit dem Vortex vermischt. Nach Zentrifugation und Entfernung der Ameisensäure wird die Gelmasse mit der ein- bis zweifachen Volumenmenge an Acetonitril für 15min bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Gelpartikel werden erneut abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und aufbewahrt.

Das gesammelte Eluat kann vereinigt und in der Vakuumzentrifuge eingeeengt werden.

2.2.9 Histologien

Um Aufschluss über die Lokalisation der Antigene im humanen Gewebe zu bekommen, werden Paraffin- und Gefrierschnitte von Colonicarcinombiopsaten immunhistochemisch behandelt.

2.2.9.1 Färbung mit APAAP-System

Die Gewebeschnitte werden 30min mit dem Primärantikörper inkubiert. Zwischen jedem der folgenden Schritte wird gut mit TBS gespült. Es folgt die 30minütige Inkubation mit dem Anti-Mouse-IgG-Brückenantikörper zur Verbindung des Primärantikörpers mit dem eigentlichen APAAP-Komplex. Dieser besteht aus einem monoklonalen Maus-anti-Alkalische-Phosphatase-Antikörper, der an den F_{ab}-Teilen intestinale Alkalische Phosphatase vom Kalb trägt. Zur Verstärkung des Färbeargebnisses wird nochmals mit Brückenantikörper sowie APAAP-Komplex inkubiert. Mit hexazotierter Astraneufuchsin-Entwicklungslösung zur Darstellung der Alkalischen Phosphatase wird der Schnitt 30min auf dem Schüttler gefärbt und danach mit Mayers saurem Hämalaun gegengefärbt. Der fertige Schnitt wird zur Konservierung mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.