5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Vektoren

- pCR™2.1: Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten und deren Amplifikation in *E. coli* (Invitrogen, San Diego, USA)
- pCR™3.1: Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten und Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen unter Kontrolle des CMV-Promotors (Invitrogen, San Diego, USA)

5.1.2 Bakterienstämme

- *E.coli* InvF´α (Invitrogen, San Diego, USA)

  Genotyp: endA1, recA1, hsdR17(r^-k, m^+k), supE44, λ-, thi-1, gyrA, relA1,Φ80lacZΔM15 (lacZYA-argF), $deoR^+$, F´
- *E. coli* TOP10 F´ (Invitrogen, San Diego, USA)

  Genotyp: F´ {tet^R}, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ80 lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139 Δ(ara-leu)7679, galU, galK, λ-, rpsL, endA1, nupG

5.1.3 Zelllinien

- Nalm6 (Humane prä-B-Zelllinie); Dr. C. Fieger/ Dr. Dörken; Robert-Rössle-Klinik des MDC, Berlin-Buch
- K562 (Humane myeloische Leukämie-Zelllinie); ATCC, Rocksville, USA

5.1.4 Primärkulturen

- Humane Lymphozyten/ Granulozyten (Blutbank des DRK Berlin-Wannsee)

5.1.5 Antikörper

- DREG-55 (Monoklonaler Antikörper Anti-L-Selektin-Maus-IgG; E.C. Butcher, Stanford University, USA)

- DREG-200 (Monoklonaler Antikörper Anti-L-Selektin-Maus-IgG; Herkunft wie DREG-55)
- FACS-Antikörper Lam 1-116-PE (Anti-L-Selektin-Maus IgG2b; Ancell, Bayport MN, USA)

5.1.6 Kits

- ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequenzing Kit (Applies Biosystems, Weiterstadt)
- Eukaryontic TA Cloning® Kit (Invitrogen , San Diego, USA)
- Qiagen Plasmid Mini/Maxi Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- Qiagen RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden)
- Super Script preamplification system for first strand cDNA synthesis (GIBCO/Karlsruhe)
- TA Cloning Kit® (Invitrogen, San Diego, USA)

5.1.7 Enzyme

- Alkalische Phosphatase (CIP = Calf Intestine Phosphatase, Boehringer Mannheim)
- *Eco*R I Restriktionsendonuclease (Boehringer, Mannheim bzw. NEB)
- Pwo DNA Polymerase (Boehringer, Mannheim)
- T4 DNA-Ligase (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Taq DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim)

5.1.8 Nukleotide und Primer

Synthetische Oligonukleotide wurden von Metabion (München) und TIB Molbiol (Berlin) bezogen.

- ATP (Adenosin-5´-triphosphat; Boehringer, Mannheim)
- Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer, Mannheim)
- Primer für die PCR:

Primer	Größe	Sequenz
LAM IF	20 mer	5´- gAg gCC ATA Tgg gCT gCA gA -3´
LAM Stu R	26 mer	5´- CAC CAA ggC CTA TTT AAT ATg ggT CA -3´
44TM-f	20 mer	5´- ggA gAC CAA gAC ACA TTC CA -3´
44TM-r	20 mer	5´- CgA CTG TTG ACT gCA ATG CA -3´
M 13 rev	17 mer	5´- CAg gAA ACA gCT ATg AC -3´
M 13 (-20)	16 mer	5´- gTA AAA CgA Cgg CCA g -3´
L44-BC	32 mer	5´- TgC AgT CAA CAg TAg GAG ATT AAA AAA Agg CA -3´
L44-CB	32 mer	5´- TgC CTT TTT TTA ATC TCC TAC TgT TgA CTg CA -3´
L44-AB II	33 mer	5´- ggT gAT TAT AAC CCC Tgg CTg ATC ATC TTg gCA -3´
L44-BA II	33 mer	5´- CCA AgA TgA TCA gCC Agg ggT TAT AAT CACCCT -3´
T7 lang	22 mer	5´- *CgCg* – TAA TAC gAC TCA CTA TAG -3´
LAM R 480	17 mer	5´- gCA ggC gTC ATC gTT CC -3´
LAM R 832	17 mer	5´- gTg CTg ATA gAg gCT CA -3´
LAM F 1012	17 mer	5´- ATg ATT AAg gAg ggT gA -3´
LAM R 1439	18 mer	5´- CCA CAT gAA TCC TTT CCC -3´

5.1.9 Größengewichtsstandard für DNA

- 100 bp DNA-Leiter (GIBCO/BRL, Eggenstein);

  Fragmentgrößen (bp): 100 - 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 700 – 800 – 900 – 1000 – 1100 – 1200 – 1300 – 1400 – 1500 - 2027
- DNA-Massenstandard (GIBCO/BRL, Eggenstein);

  Fragmentgrößen (bp): 100 (10 ng) – 200 (20 ng) – 400 (40 ng) – 800 (80 ng) – 1200 (120 ng) – 2000 (200 ng) / 4 µl Markerlösung

5.1.10 Pufferlösungen

- PBS: 137mM NaCl; 2,7mM KCL; 1,4mM KH_2PO_4; 4,3mM Na_2PO_4x 7 H_2O; pH 7,4
- TAE: 40 mM Tris/Essigsäure, pH 8,3; 1mM EDTA
- TBS : 25 mM Tris-HCL, pH 7,4; 137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl

- TE : 10 mM Tris/HCL, pH 8,0; 1mM EDTA

5.1.11 Substanzen

Elektrophorese:

- Agarose, NA (Pharmacia, Freiburg)
- Agarose, ultra pure (GIBCO/BRL, Eggenstein)

Bakterien- und Zellkultur:

- Ampicillin, Na^+-Salz (Sigma, München)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Serva, Heidelberg)
- Dynabeads M450 Schaf-Anti-Maus-IgG (Dynal, Hamburg)
- EDTA (in PBS) (Seromed, Biochrom KG, Berlin)
- Ficoll-Plaque Plus (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
- FKS (fötales Kälberserum; GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Geniticin® (G 418-Sulfat; GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Glutamax I (GIBCO/BRL; Eggenstein)
- Kanamycin-Sulfat (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- Nystatin (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- PBS Dulbecco (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) (Seromed, Biochrom KG, Berlin)
- Penicillin/Streptomycin-Lösung (Seromed, Biochrom KG, Berlin)
- RPMI 1640 Medium (mit L-Glutamin) (GIBCO/BRL, Eggenstein)
- X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-DGalaktosid ; Saxon Biochemicals GmbH, Hannover)

5.1.12 Verbrauchsmaterialien

Pipetten, Schraubdeckelröhrchen, Agarschalen, Zellkulturflaschen (Falcon/Beckton-Dickinson, Heidelberg; Nunc, Wiesbaden)

Centri-Sep spin columns (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Multiwellplatten, 96 Well, U-Bottom, 3077 (Falcon/ Becton-Dickinson, Heidelberg

Sterilfilter Minisart® (Porengröße 0,2 µm; Sartorius, Göttingen)

5.1.13 Geräte

Elektophorese:

Gelapparatur (Bio-Rad, München)

ABI prism 310 Genetic analyser (Applies Biosystems, Weiterstadt)

Bakterien- und Zellkultur:

Begasungsbrutschrank Heraeus „Heracell“ (Kendro, Langenselbold)

Elektroporator Genepulser II ,Pulscontroller Plus, Capicitance Extender Plus (Bio-Rad, München)

Lichtmikroskop Zeiss Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)

Magnetische Separierungsvorrichtung „MagneSphere®“ (Promega/Serva, Heidelberg)

Sterile Werkbank Heraeus „Herasafe“ (Kendro, Langenselbold)

Warmluftrundschüttler „Aerotron“ (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)

Zentrifugen:

Tischzentrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburg)

Tischzentrifuge 5402 (temperierbar; Eppendorf, Hamburg)

Zellzentrifuge Labofuge M (Heraeus-Christ, Hanau)

Sonstige Geräte:

FACS Epics XL (Beckmann-Coulter, Krefeld)

Multiplate Reader „MRX“ (Dynatech; GB)

Thermocycler TRIO-Thermoblock (Biometra; Göttingen)

UV-Photometer „Ultrospec 2000“ (Pharmacia, Freiburg)

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 mRNA-Isolierung aus Leukozyten

Zur Isolierung von mRNA wurde das „RNeasy Kit“ (Quiagen, Hilden) verwendet, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Nach Lysierung und Homogenisierung der Zellen wird die RNA an eine Silica-Matrix adsorbiert. Nach Zugabe eines Eluierpuffers kann sie wieder abgelöst und aufgefangen werden. Die RNA-Konzentration wurde im Photometer bestimmt.

5.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Analytischer Maßstab (50 – 100 µg DNA; „Mini-Präp“):

Die pelletierten Bakterien (Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 x g bzw. 5000 rpm in einer Tischzentrifuge) aus 1,5 ml einer dicht gewachsenen Flüssigkultur (Inkubation unter Schütteln bei 37° Celsius für mindestens 5 Stunden, maximal über Nacht) wurden in 50 µl TE-Puffer („Lösung I“) resuspendiert, mit 100 µl Lysepuffer („Lösung II“) versetzt und für 2 Minuten auf Eis der Zelllyse unterzogen. Durch Mischen mit 400 µl Neutralisierungspuffer („Lösung III“) und Inkubation für weitere 5 Minuten wurden Proteine denaturiert und genomische DNA präzipitiert, die durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 16500 x g (14000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge) sedimentiert wurden. Aus dem Überstand, der in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert wurde, konnte die Plasmid-DNA durch Zugabe von 400 µl Isopropranolol gefällt werden. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 16500 x g (14000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge) wurde das DNA-Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, für 5 Minuten unter Vakuum getrocknet und abschließend in 50 µl RNAse-TE suspendiert.

- Lösung I: TE-Puffer
- Lösung II: 0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS (Lysepuffer)
- Lösung III: 0,975 M NaAcetat, 50 mM NaCl pH 5,0
- RNAse-TE: 10 µg/ml RNase in TE-Puffer

Wenn hochreine DNA-Fraktionen benötigt wurden, wie zur Sequenzanalyse mit fluoreszenzmarkierten dNTPs oder für Fusionierungs-PCRs, wurde alternativ der „Qiagen

Plasmid Mini-Kit“ (Qiagen, Hilden) für Minipräparation von Plasmid-DNA (zwischen 20 µg und 50 µg) eingesetzt. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

Präparativer Maßstab (300-800 µg; „Maxi-Präp“):

Um größere Mengen von Plasmid-DNA zu erhalten, wurde der Qiagen Plasmid Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 220 ml Übernachtkultur gemäß den Angaben des Herstellers. In der Regel wurden pro Präparation 300-800 µg Plasmid-DNA isoliert. Menge und Reinheit der Plasmid-DNA wurden im Photometer bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt wie unter 5.2.4 beschrieben.

5.2.3 Reinigung von DNA durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation

Zur Abtrennung von Proteinen wurden DNA-haltige wässrige Lösungen mit einem Volumen Phenol (TE-gesättigt, pH 6,7) versetzt und fünf Minuten gut durchgemischt. Nach Zentrifugation für fünf Minuten in einer Tischzentrifuge bei 16500 x g (14000 rpm) wurde die wässrige Phase sorgfältig von der Interphase abgenommen, in der sich die denaturierten Proteine angereichert hatten. Nach Zugabe von 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) zur Entfernung von verbliebenen Phenolresten wurde die wässrige Phase einer Ethanolpräzipitation unterzogen. Hierzu wurde die DNA-haltige Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 Vol. absolutem Ethanol (bzw. 0,7 Vol. Isopropranol) versetzt, gut durchmischt und anschließend für 30 Minuten in der Tischzentrifuge bei 16500 x g (14000 rpm) zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 200 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen, an der Luft oder unter Vakuum getrocknet und abschließend in einer Konzentration von 0,5-1 µg/µl in TE-Puffer oder in ddH_2O aufgenommen.

5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Kleinere Mengen an DNA (zwischen 10-100 ng/µl) wurden in Agarosegelen mit einem parallel aufgetrennten Massenstandard (GIBCO/BRL, definierte DNA-Banden zwischen 10-120 ng) nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht abgeschätzt.

DNA in höheren Konzentrationsbereichen (>100 ng/µl) wurde im Photometer vermessen und auf ihre Reinheit überprüft. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von λ=260nm, Proteine bei λ=280nm. Der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der gewonnenen DNA-Lösung, die bei einem Wert von

≥1,8 – 2 frei von Kontaminationen ist. Für die Berechnung der DNA-Menge gelten folgende Werte: Eine OD=1 bei λ=260nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA bzw. einzelsträngiger DNA und 25-30 µg/ml Oligonukleotiden.

5.2.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Anfertigung von Agarosegelen wurde je nach Größe der zu trennenden DNA 1,0-2,5 % (w/v) Agarose (für präparative Gele „ultra pure“) in TAE-Puffer unter Kochen vollständig gelöst. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurde die Agaroselösung in den Träger einer horizontalen Gelkammer gegossen, in den zuvor ein Taschenkamm für den Auftrag der gewünschten Volumina eingesetzt wurde. Nach Aushärten des Gels wurde es mit dem Träger in eine Gelkammer eingesetzt, die mit TAE (siehe „5.1.10 Pufferlösungen“) als Laufpuffer gefüllt war. Die DNA-Proben wurden in die Geltaschen gefüllt und parallel zu einem Größenstandard im elektrischen Feld elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufgetragene DNA-Menge sollte 1 µg pro 0,5 cm Gelbreite nicht überschreiten. Die Elektrophorese, bei der die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Kathode wandern, wurde je nach Gelbreite und Konzentration der Gellösung für 1-3 h bei 80-100 V vorgenommen. Zur Detektion der DNA wurde das Agarosegel in TAE-Puffer mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die unter UV-Licht (λ=312 nm) fluoreszierenden DNA-Banden konnten auf einem UV-Leuchttisch betrachtet und photographisch dokumentiert werden.

5.2.6 Reinigung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) aus der Agarose extrahiert. Die Aufreinigung variierte in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Gels und wurde den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen.

Um den Erfolg nachgeschalteter enzymatischer Reaktionen wie z.B. die Ligation nicht zu mindern, wurden DNA-Lösungen (z.B. nach Extraktion aus Agarosegelen oder aus PCR-Ansätzen) weiteren Aufreinigungsschritten unterzogen. Über „QIAQuick-Säulchen“ (Qiagen, Hilden) wurden die DNA-Fraktionen von Salzen und Nukleotiden befreit, wobei nach

Herstellerangaben vorgegangen wurde. Alternativ erfolgte eine Reinigung über Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation wie unter 5.2.3 beschrieben.

5.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren der kommerziellen TA Cloning Kits wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Alternativ wurde folgender allgemeiner Ligationsansatz verwendet:

Sowohl der Vektor als auch das zu klonierende DNA-Fragment mussten in hochreiner Form vorliegen und wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl zusammengegeben. Es wurden 20–50 ng Vektor-DNA und ein ca. 5-10 fach molarer DNA-Fragmentüberschuss verwendet. Der Ligationsansatz wurde anschließend mit 7,5 Units T4 Ligase (Pharmacia) versetzt und für 16 h bei 12 °C inkubiert. Durch vom Hersteller empfohlene Zugabe der 5fach konzentrierten Pufferlösung, so dass eine Endkonzentration von 1 mM ATP und 10 mM Mg^{2+} vorlag, wurden optimale Pufferbedingungen erreicht.

5.2.8 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli

Die Transformation erfolgte durch Hitzeschock. Ähnlich der Methode der Elektroporation nimmt die Permeabilität der Bakterienmembran kurzfristig zu. Hierbei kann das Plasmid in das Bakterium gelangen. Zu 100 µl entsprechend kompetenter Zellen wurden 7,5 µl eines Ligationsansatzes oder 50 ng Plasmid-DNA gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für genau 90 Sekunden einem auf exakt 42° C vorgeheiztem Wasserbad ausgesetzt, nochmals kurz auf Eis gestellt und anschließend mit 1 ml eines auf 37 °C angewärmten LB-Mediums versetzt. Es folgte die Inkubation für 1 h bei 37 °C unter sanftem Schütteln, danach wurden je 100 µl, 300 µl und das Restvolumen des Transformationsansatzes auf vorgewärmte LB-Agarplatten plattiert, die ein Antibiotikum entsprechend der Resistenz des transformierten Vektors enthielten, bei den eingesetzten Vektoren Ampicillin oder Kanamycin.

Der Erfolg der Ligation wurde im Vektor pCR 2.1 durch Blau/Weiß-Selektion überprüft. Der Vektor besitzt im Bereich der Insertionsstelle das Gen *lac*Z, das für β-Galaktosidase kodiert. In Anwesenheit von X-Gal entsteht durch dieses Enzym ein blauer Farbstoff. Durch Ligation eines Inserts wird der Leserahmen für β-Galaktosidase zerstört. Dadurch erscheinen transfizierte Kolonien farblos.

LB-Agarplatten: 1,5% (w/v) Agar in LB-Medium

LB-Medium: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 4 g NaCl, 1 ml 1 N NaOH, ad 1 l ddH_2O

5.2.9 Kompetente Zellen für die Transformation

Die im TA Cloning Kit verwendeten Bakterienstämme (siehe 5.2.1) waren bereits kompetent und konnten ohne weitere Vorbereitung für eine Transformation verwendet werden.

5.2.10 Gefrierkulturen von E. coli

Stationär gewachsene Bakteriensuspensionen wurden mit 20% (v/v) f.c. sterilem Glycerin versetzt, gut durchmischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zum Ausstreichen von Bakterien aus einer Gefrierkultur wurden von der gefrorenen Stammlösung mit einer serilen Impföse Zellen von der Oberfläche abgenommen und auf eine LB-Agarplatte überführt.

5.2.11 PCR-Amplifikation ("Polymerase-Chain-Reaction")

Die Methode der PCR erlaubt es, bestimmte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Mit Hilfe von gegenläufigen Oligonukleotiden („Primer") kann die DNA-Sequenz zwischen beiden Primern (DNA-Matrize, „Template") amplifiziert werden. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Teilschritten, die nacheinander durchlaufen werden: (1) Templatedenaturierung, (2) Primeranlagerung an die Einzelstrangmatrize („Annealing"), (3) DNA-Synthese durch hitzestabile Polymerase. Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung dieser Teilschritte (ca. 15-30 mal), wodurch die Matrize exponentiell amplifiziert wird.

Modifizierende PCR:

In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne Genteilabschnitte mit Hilfe überhängender Primer gezielt modifiziert. Für Parallelansätze wurden alle nicht variablen Komponenten außer der Polymerase, also dNTPs, Puffer, ddH_2O, gegebenenfalls auch „Primer" und die zu amplifizierende DNA-Matrize („Template") zu einem vielfachen Ansatz zusammengegeben, um Schwankungen in der Zusammensetzung der Reaktionsansätze zu minimieren. Aus diesem „Master-Mix" wird das entsprechende Volumen zu den variablen Komponenten gegeben, gut durchmischt und mit thermostabiler PWO-Polymerase versetzt.

Im folgenden ist das Pipettierschema für eine modifizierende PCR angegeben:

Template (1-10 pM)	x µl
Forward primer (20 µM)	1,5 µl
Reverse primer (20 µM)	1,5 µl
dNTPs (je 2 mM)	10 µl
PWO-DNA-Polymerase (2,5 U)	x µl
ddH2O	Ad 100 µl

SOE-PCR:

Durch die abgewandelte PCR-Methode SOE („Splicing by overlap extension“) wurden modifizierte Genabschnitte der Zelladhäsionsmoleküle L-Selektin und CD44 zu einem neuen, chimären Gen kombiniert (zum Prinzip der SOE siehe Abschnitt 3.3 und Abbildung 8).

Thermostabile Polymerase:

Für alle Standard-PCRs, modifizierenden PCRs und SOE-Reaktionen wurde die PWO-Polymerase verwendet. Diese *proofreading*-Polymerase besitzt eine 3´→5´-Exonucleaseaktivität und erreicht deshalb eine mehr als zehnfach geringere Fehlerrate. Um Fehler in der Basensequenz auszuschließen, wurden alle PCR/SOE-Produkte nach Einbringen in einen Vektor sequenziert .

Reaktionsbedingungen:

Die Reaktionsbedingungen der einzelnen PCRs/SOEs (Zyklenanzahl, Reaktionstemperaturen und Dauer der jeweiligen Teilschritte) sind in den Abbildungen der jeweiligen Abschnitte im Ergebnisteil aufgeführt.

Kolonie-PCR:

Zur Schnellanalyse auf das Vorhandensein der L-Selektin/CD44-Chimäre in korrekter Orientierung innerhalb des eukaryontischen Expressionsvektors pCR 3.1 (3´ des CMV-Promotors) wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Der Nachweis erfolgte durch

Gelelektrophorese von 10 µl PCR-Probe auf Agarosegel. Nachfolgend findet sich das Pipettierschema für die Kolonie-PCR:

- Kolonie-PCR Mix:

2,5µl	10x Taq Puffer
0,5µl	dNTPs (je 10mM)
1,25µl	Primer 1 (10µM)
1,25µl	interner Primer T7 (10µM)
1 U	Taq-Polymerase
14µl	dd H_2O

- Sequenzierabfolge einer Kolonie-PCR:

1.	5 min 94° C	(initiales Aufschmelzen)
2.	94° C - 55° C - 72° C	(je 10 sec; 35 Zyklen; Vervielfältigungsphase)
3.	2 min 72° C	

Die einzelnen PCR-Zwischenprodukte der jeweiligen Reaktionen wurden in Vektoren des TA Cloning-Systems eingebracht und deren korrekte Basenabfolge durch Sequenzierung verifiziert (siehe 5.2.15).

5.2.12 Reverse Transkription (RT-PCR)

Das Enzym Reverse Transkriptase synthetisiert aus einer RNA-Vorlage einen komplementären DNA-Strang. Zur cDNA-Synthese wurde das SuperScript™ Preamplification System (GIBCO/Karlsruhe) verwendet, es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die hier verwendete RNase H^- Reverse Transkriptase besitzt keine RNAse-Aktivität, die Ausbeute an sythetisierter cDNA in voller Länge steigt. Erst im letzten Schritt wird zur Entfernung der RNA RNAse H zugegeben.

5.2.13 Klonierung von PCR-Produkten/SOE-Produkten

Die einzelnen durch modifizierte bzw. konventionelle PCR sowie SOE gewonnenen Fragmente wurden mit Hilfe des TA Cloning Kit® (Invitrogen, San Diego, USA) zwischenkloniert. In die entsprechenden Vektoren pCR 2.1 und pCR 3.1 können PCR-Produkte ohne weitere Vorbehandlung eingebracht werden. Die Verfügbarkeit der Amplifikate in einem Vektor erleichtert dessen Sequenzierung und ermöglicht die dauerhafte Archivierung eines durch Sequenzierung verifizierten Fragmentes.

Die Ligation zwischen Vektor-DNA und Amplifikat-DNA erfolgt über eine Desoxy-Thymidin-Desoxy-Adenosin-Basenpaarung. Desoxy-Adenosin wird von der hitzestabilen Taq-Polymerase spezifisch an 3´- Enden der amplifizierten DNA eingebaut. Das für die Ligation erforderliche 3´- überhängende Desoxy-Thymidin wird von den Vektoren des TA Cloning Kits gestellt. Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers. Bei mit der PWO-Polymerase amplifizierten Fragmenten werden durch Exonukleaseaktivität die Adeninüberhänge am 3´-Ende entfernt („blunt end“). Deshalb wurde im Anschluss an die PCR-Reaktion 3´- Adenin mittels Taq-Polymerase an die PCR-Fragmente addiert. 1 U Taq-Polymerase wurde dem PCR-Ansatz zugemischt und für 10 min bei 72° C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend aufgereinigt oder umgehend in den TA-Vektor gebracht. Hierfür wurden 10 ng Vektor mit dem PCR-Fragment im molaren Verhältnis 1:1 mit Ligasepuffer und T4 DNA Ligase über Nacht bei 14° C inkubiert. 2 µl des Ligationsansatzes wurden für die Transformationreaktion mit InvF´α bzw. TOP10 F´ zusammengebracht, wobei nach Herstellerangaben vorgeganden wurde.

5.2.14 Proteinnachweis mittels Western-Blot

Um die Expression des chimären L-Selektin/tmCD44-Proteins in den Zelllinien Nalm6 und K562 zu untersuchen, wurden zunächst Lysate von diesen Zellen angefertigt, die dann im Western-Blot eingesetzt wurden.

Die Zellen wurden zunächst in PBS gewaschen, um Proteine aus dem Medium abzutrennen, dann für 5 min bei 1000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und pelletiert. 10^6 Zellen wurden in 50 µl Solubilisierungspuffer (20mM Tris pH 8,0 , 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40) resuspendiert und bei RT für 1 h mit einem Überkopfrotierer

gedreht. Die unlösliche Fraktion aus chromosomaler DNA und assoziierten Proteinen wurde durch Zentrifugation bei 14000 rpm (Eppendorf-Tischzentrifuge) abgetrennt.

Die Auftrennung des Proteingemisches nach der Methode von Lämmli (1970) erfolgte, indem durch Zugabe von SDS Proteine, proportional zu ihrer Anzahl an Aminosäuren, mit negativen Ladungen besetzt werden. Hierdurch wurden sie im elektrischen Feld ihrer Größe nach getrennt (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; SDS-PAGE). Trenngele aus 10% Acrylamid, Trennpuffer (4x: 1,5 M Tris; pH 8,8), 0,1% SDS und 0,05% APS/0,1% TEMED zur Induktion der Polymerisation wurden in eine Gelapparatur (CBS, Del Mar, CA, USA) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde Isopropanol wieder entfernt und ein 4,5% Sammelgel (Sammelgelpuffer 4x: 0,5 M Tris; pH 6,8) sowie ein Trennkamm hinzugefügt. In die entstandenen Geltaschen wurden in 1x SDS-Sammelpuffer aufgenommene Proben eingebracht, und die Elektrophorese mit 13 A (Ampère) begonnen. Nach Passage der Proben durch das Sammelgel wurde die Stromstärke auf 15 A erhöht.

- 1x SDS-Sammelpuffer: 2% SDS, 80 mM Tris pH 6,8; 10% Glycerin, 0,005% Bromphenolblau, β-Mercaptoethanol
- Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS
- Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe): 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid

Für die immunologische Detektion von Proteinen wurden diese, nach erfolgter SDS-PAGE, elektrophoretisch (Mini Trans-Blot, Biorad, München) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen („Western-Blot“). Zum Transfer wurde ein elektrisches Feld (U=250 V) für 1 h (Geldicke: 0,75 mm) angelegt. Effizienz des Blottens wurde mittels reversibler Ponceau S-Färbung geprüft. Unspezifische Bindungsstellen auf den Membranen wurden durch Inkubation mit Blockerlösung (Rotiblock in TBS-T) für mindestens 1h abgesättigt, anschließend wurde als Primärantikörper DREG-200 (1 µg/ml; Verdünnungen in TBS-T + 5% Ziegenserum) hinzugefügt. Nach Inkubation über Nacht folgte dreimalig ein Waschschritt mit TBS-T (TBS + 0,2% Tween), um ungebundene Antikörper zu entfernen. Sodann wurde mit dem Sekundärantikörper (Ziege-Anti-Maus-IgG) inkubiert (45 min). Dieser ist an Meerretisch-Peroxidase gekoppelt. Nach einem Waschschritt (siehe oben) wurde der

gebundene Antikörper über das „Enhanced Chemoluminiscence (ECL) kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) detektiert. Durch die emittierten Lichtsignale wurden Biomax X-Ray Filme (Kodak, Cedex, Frankreich) belichtet und hierüber die Proteinbanden sichtbar gemacht.

- Blottpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin
- Ponceau S Färbelösung: 0,2% Ponceau S, 3% Essigsäure

5.2.15 Sequenzierung von DNA durch fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nukleotide (Kettenabbruchverfahren nach Saenger)

DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM™ Big Dye Terminator Kit der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt). In der verwendeten Methode erfolgte die Sequenzreaktion mit unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten ddNTPs in einem PCR-Ansatz, wobei nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Didesoxynukleotide können analog normalen Nucleotiden in einen wachsenden DNA-Strang durch die DNA-Polymerase eingebaut werden, führen jedoch zum Strangabbruch durch eine fehlende Hydroxylgruppe in 3´-Position („Termination“). Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange durch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide terminierte DNA-Stränge, die nach elektrophoretischer Auftrennung und Auswertung des Fluoreszenzmusters die Nukleotidabfolge der DNA-Sequenz zeigen.

Die Sequenzierproben bestanden aus 1 µg DNA, 4 µl „Terminator-Mix“ und 1 pM Sequenzierprimer in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Folgende Sequenzierbedingungen wurden verwendet: 96 °C für 1 min; 25 Zyklen mit (96 °C für 10 sec, 50 °C für 5 sec, 60 °C für 4 min). Nicht eingebaute NTPs wurden über Centri-Sep Säulchen („spin columns“; Edge Biosystems/Mobitec, Göttingen) abgetrennt. Die Proben wurden mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Weiterstadt) untersucht.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Isolierung von Leukozyten aus humanem Blut

Zur Isolierung von humanen Leukozyten wurden „Buffy-coats“ aus der Blutbank des „Deutschen roten Kreuzes“ (DRK) in Berlin-Wannsee verwendet. „Buffy-coats“ entstehen bei der Zentrifugation von ca. 500 ml Vollblut des Spenders. Hierdurch erfolgt eine Auftrennung

in drei Phasen: Die untere, vorwiegend bestehend aus sedimentierten Erythrozyten, und die obere, bestehend aus Serum, werden abgenommen. Übrig bleibt eine Blutfraktion (ca. 50 ml), in der die Leukozyten um ein Zehnfaches im Vergeich zum Vollblut angereichert ist. Diese Fraktion wurde zur Isolierung von Lymphoyten bzw. Granulozyten eingesetzt.

Der Inhalt eines „Buffy-coats“ wurde in sterile 50 ml-Röhrchen gefüllt und 10 min bei RT und 724 x g (2000 rpm in der LabofugeM, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das blutzellreiche Pellet mit PBS (ohne Ca^{2+}) auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Blutfraktion anschließend mit 1/3 Volumen Ficoll (Dichte = 1,077) unterschichtet. Bei der nachfolgenden Zentrifugation bei RT für 30 Minuten bei 408 x g (1500 rpm, LabofugeM, Heraeus) reicherten sich die Blutzellen entsprechend ihrer Dichte innerhalb des Ficolldichtegradienten an. Lymphozyten und Monozyten bildeten die Interphase zwischen Ficoll und der darüberstehenden wässrigen Phase. Granulozyten und Erythrozyten durchdringen die Ficollfraktion und sammelten sich im Pellet an. Die verschiedenen Zellfraktionen wurden mit sterilen Pasteurpipetten entnommen und in 50ml-Röhrchen überführt.

Die Lymphozyten wurden in reichlich PBS (ohne Ca^{2+}) gewaschen. Dazu wurden den erhaltenen Zellfraktion 20-30 ml PBS zur Verdünnung des Ficolls zugesetzt, und der Ansatz bei 408 x g (1500 rpm, LabofugeM, Heraeus) zentrifugiert. Es schloß sich ein Waschschritt im gleichen Volumen PBS und niedriger Drehzahl, 65 x g (600 rpm, LabofugeM, Heraeus), an, um Zelltrümmer und Thrombozyten zu entfernen. Die Zellen wurden abschließend in einer Dichte von 1-5 x 10^5/ml in RPMI 1640-Medium in Kultur genommen. Die noch enthaltenen Monozyten dieser Fraktion erlangen nach 1-2 Tagen Makrophageneigenschaften und haften dann am Boden der Zellkulturschale. Sie konnten durch Überführen des Kulturmediums in eine neue Zellkulturflasche abgetrennt werden.

Die Granulozyten-Erythrozyten-Fraktion wurde mit Aqua bidest. behandelt (50 ml ddH_2O auf 2 ml Sediment). Unter schwachem Schütteln kommt es zur hypotonen Zelllyse der Erythrozyten. Nach 10 sec wurden zur Aufhebung der Hypotonizität 2,6 ml 20 x PBS (pro 50ml ddH_2O) hinzugefügt und 15 sec intensiv vermischt. Nach Zentrifugation mit 2000 rpm für 5 min bei RT wurde der Überstand abgesaugt, jeweils ein analoger Waschschritt mit RPMI 1640 und PBS schloss sich an. Danach wurde das Erythrozytenlyse noch einmalig

wiederholt. Die Granulozyten wurden schließlich in RPMI 1640-Medium aufgenommen und kultiviert.

- RPMI 1640-Medium: RPMI 1640 mit 10% (v/v) FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM Glutamax

5.3.2 Zellkultur von humanen Leukozyten und Lymphomzelllinien

Humane Lymphozyten wurden in RPMI 1640-Medium in einer Dichte 0,5-1 x 10^6/ml von in Kultur gehalten. Die humanen Lymphomzelllinien Nalm6 und K562 wurden unter den gleichen Zellkulturbedingungen gehalten. Die Zellzahl verdoppelte sich alle 2-3 Tage und das Kulturmedium wurde komplett erneuert. Da es sich um nicht vollständig ausdifferenzierte Vorläuferzellen handelt, muß mit einer Differenzierung der Zellen während eines längeren Kulturzeitraumes gerechnet werden. Deshalb wurden die Zellen nicht über einen zu langen Zeitraum in Zellkultur gehalten. Zusätzlich wurden in regelmäßigen Abständen Gefrierkulturen angelegt, wie unter 5.3.3 beschrieben.

5.3.3 Anlegen von Gefrierkulturen

Zur dauerhaften Archivierung gewonnener Zellklone wurden Gefrierkulturen angelegt. Hierzu wurden Zellen einer dicht bzw. konfluent bewachsenen 750ml Zellkulturflasche (Zellkulturvolumen 50-70ml), gegebenenfalls nach Trypsinisierung, durch Zentrifugation für 5 Minuten bei RT und 261 x g (1200 rpm, LabofugeM, Heraeus) sedimentiert und in 1,5 ml FKS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 500 µl-Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 500 µl Einfriermedium dazugegeben, die Lösung gut durchmischt und die Zellen langsam über Nacht in einer Styroporkiste auf -80 °C abgekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff, in den die Kryoröhrchen nach 1-2 Tagen überführt wurden.

- Einfriermedium: 70 % RPMI 1640, 20 % FKS, 10 % DMSO

5.3.4 Transfektion der humanen Lymphom-Zelllinien Nalm6 und K562

Nalm6-Zellen bzw. K562-Zellen wurden mit dem L-Selektin/tmCD44-Konstrukt im Vektor pCR 3.1 durch die Methode der Elektroporation transfiziert. Zu transfizierende Zellen wurden mittels einer Küvette in die Pulskammer des Elektroporationsgerätes eingesetzt und einem elektrischen Puls ausgesetzt. Der elektrische Puls wird definiert durch die Feldstärke und die

Zeitkonstante τ. Die Feldstärke wird bestimmt durch die angelegte Spannung U und die Schichtdicke d der eingesetzten Küvette. Bei bestimmter vorgewählter Kapazität ergibt sich aus den übrigen Variablen für jeden Elektroporationsansatz eine bestimmte Pulsdauer, die Zeit, für die der Ansatz dem elektrischen Feld ausgesetzt wird. Durch den elektrischen Puls kommt es zu einer Reorganisation der Zellmembran, wodurch der Vektor ins Zellinnere gelangen kann. Die Zellen sollten sich zur Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Dafür wurden Zellen an zwei aufeinander folgenden Tagen auf eine Zellzahl von 0,5 x 10^5/ml verdünnt, wobei das Medium jeweils nur zu ⅔ erneuert wurde. Dies führt zu einem so genannten „konditionierten Medium“. Es enthält von den Zellen sezernierte Wachstumsfaktoren und optimiert dadurch das Zellwachstum.

Die optimale Feldstärke für Säugetierzellen liegt typischerweise zwischen 0,5-1 kV/cm. Daraus ergaben sich für 0,4 cm-Küvetten (Genpulser II, Biorad, München) folgende Geräteeinstellungen: C= 250-950 µF und U= 200-300 V. Dabei sind die optimalen Transfektionsbedingungen für jeden Zelltyp verschieden und müssen experimentell ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden Probetransfektionen mit dem Vektor pEGFP-C1 vorgenommen. In diesem Vektor wird GFP („Green Fluorescent Protein“) codiert. Eingebracht in die Wirtszellen, exprimieren diese bereits nach zwei Tagen ein grün fluoreszierendes Protein, das unter dem Fluoreszenzmikroskop bei seinem Absorptionsmaximum von 488 nm sichtbar gemacht werden kann. So gelang es ohne langwierige Selektionsphase den Erfolg einer Transfektion zu überprüfen. Die Transfektionsbedingungen wurden bei C=250 µF; 500 µF; 950 µF und jeweils U=200 V oder 300 V ausgetestet. Zwei Tage nach der Transfektion wurden aus jedem Ansatz 0,5 ml entnommen und die Zellen kurz pelletiert (2 Minuten bei 1000 rpm in der Eppendorf-Tischzentrifuge). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Je zwei Tropfen dieser Lösung wurden auf einen Objektträger gegeben und mit Deckgläschen abgedeckt, die zuvor an den Ecken mit kleinen Knetkügelchen versehen wurden. Die Zellen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm und im Phasenkontrast betrachtet. Unter Abwägung der verbliebenen Zellzahl und der Intensität der Fluoreszenz wurden die besten Bedingungen für die Transfektion ausgewählt.

Verwendete Transfektionsbedingungen zur Transfektion mit Elektroporation:

- Nalm6-Zellen: C = 950 µF; U = 280 V; 20 µg DNA; RT
- K562 –Zellen: C = 950 µF; U = 280 V; 20 µg DNA; 4° C

Für die Transfektion durch Elektroporation wurden 0,6 ml einer Zellsuspension von 2 x 10^7/ml Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zuvor in PBS (ohne Ca^{2+}) gewaschen und in Zellkulturmedium ohne FKS aufgenommen. Dem Medium wurde 10 mM Dextrose und 0,1 mM DTT zugesetzt. Zu dem Ansatz wurden 20 µg frisch präzipitierte DNA Plasmid-DNA (aufgenommen in 20 µl ddH_2O) gegeben. Die Suspension wurde in Elektroporationsküvetten mit einer Schichtdicke von 0,4 cm überführt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden dem elektrischen Impuls bei o.g. Geräteeinstellungen ausgesetzt. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension weitere 10 min bei RT belassen und anschließend in 30 ml vorgewärmten Zellkulturmedium in Kultur genommen. Das Medium wurde am nächsten Tag gewechselt. Die Zentrifugation erfolgte bei RT und 408 x g (600 rpm, LabofugeM, Heraeus), um Zelltrümmer abzutrennen. Die Selektion erfolgte wie unter 5.3.5 beschrieben.

5.3.5 Selektion transfizierter Zellen durch Antibiotika

Der Vektor pCR 3.1, mit dem die humanen Lymphomzelllinien Nalm6 und K562 transfiziert wurden, vermittelt in Eukaryonten eine Resistenz gegen Geniticin (G418). Nach der Elektroporation wurden die Zellen für zwei Tage ohne Selektionsdruck kultiviert. Danach wurde dem Medium 0,5 mg/ml Geniticin (GIBCO/BRL, Eggenstein) zugesetzt. Für weitere fünf Tage wurde jeden Tag ein Mediumswechsel vorgenommen, wobei das Kulturvolumen der jeweiligen Zellzahl angepasst wurde. Diese kann in den ersten zwei Wochen stark schwanken. Im Folgenden wurde das Medium alle zwei Tage gewechselt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zelldichte 1-5 x 10^5/ml nicht überschreitet. Das Antibiotikum Geniticin gehört zur Klasse der Aminoglykoside. Es bindet an die 30 S-Untereinheit der Ribosomen und verursachen Fehlsteuerungen („Missreading“) der Proteinbiosynthese, wobei es zur Bildung funktionsuntüchtiger „Nonsense-Proteine“ kommt. Hieraus resultiert eine konzentrationsabhängige Zelltoxizität insbesondere in der logarithmischen Wachstumsphase einer Zellpopulation. Eine zu hohe Zelldichte wirkt sich negativ auf die Teilungsrate aus. In der zweiten Woche machte sich der Selektionsdruck bemerkbar und nach drei bis vier

Wochen war die Selektion abgeschlossen. Kontrollzellen ohne das Resistenzgen teilten sich nicht mehr, mussten aber nicht unbedingt vollständig absterben. Für die weitere Zellkultur wurde die Geniticinkonzentration auf 0,25 mg/ml Medium reduziert.

5.3.6 Anreicherung transfizierter Zellen durch Magnetpartikel

Um aus der transfizierten Zellpopulation diejenigen Zellklone zu gewinnen, die die L-Selektin/tmCD44-Chimäre in hoher Dichte exprimieren, wurden Anreicherungen mit spezifischen Antikörpern gegen die Extrazellulärdomäne von L-Selektin (DREG-200, DREG-55) und mit über Sekundärantikörper gekoppelten Magnetpartikeln („Beads“) vorgenommen.

25 µl Beads (entspricht ca. 10^7 Partikel) wurden zweimal mit 0,5 ml PBS gewaschen und anschließend in 50 µl PBS mit 1% BSA aufgenommen. Zum Coaten der Beads wurden jeweils 2,5 µg monoklonale Antikörper (DREG-200 und DREG-55) zugesetzt. Es folgte eine Mischung für 30 Minuten mit dem Überkopfrotierer bei RT. Sodann schloss sich ein Wachschritt mit PBS an.

Zur Vorbereitung der Zellen wurden ca. 10^7 Zellen zweimalig in RPMI-Medium gewaschen und in 1 ml RPMI aufgenommen. Nach Zugabe der gecoateten Beads wurde nochmalig 30 Minuten im Überkopfrotierer gemischt. Die Anreicherung hochexprimierender Zellen an der Wand des Reaktionsgefäßes wurde durch das Einhängen der Ansätze in eine Magnetvorrichtung erreicht. Der Überstand wurde abpipettiert, abschließend folgte nochmals ein Waschschritt mit 1 ml Medium wie eben beschrieben. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca. 1 x 10^5 Zellen/ml in Kultur genommen. Innerhalb von Tagen verlieren die Zellen die Magnetpartikel, diese verdünnen sich aus dem Medium im Laufe mehrerer Medienwechsel heraus.

5.3.7 FACS-Analysen (Fluorescence-activated cell scan)

FACS-Messungen ermöglichen die qualitative und quantitative Detektion von Zelloberflächenproteinen innerhalb einer Zellpopulation. Positive Zellen werden mit spezifischen Fluoreszenz-Antikörpern markiert, in einer Flusskammer werden sie an einem Laser vorbeigeführt. Durch den Laser wird die Fluoreszenz angeregt und kann photometrisch ausgewertet werden. Zusätzlich können durch Analyse der Ablenkung des Laserlichts Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zellen gezogen werden. Dies ermöglicht die Untersuchung und Charakterisierung heterogener Zellpopulationen.

Ca. 10^6 Zellen wurden einmalig mit 2 ml PBS gewaschen (Zentrifugation für 3 min bei 1500 rpm; 408 x g; LabofugeM, Heraeus), in 50 µl BSA-PBS (0,1% BSA („bovine serum albumin“) in PBS) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden jeweils 2µl FACS-Antikörper Lam 1-116-PE hinzu gegeben und nochmals für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschritte mit PBS (Procedere wie oben). Schließlich wurden die präparierten Zellen in 500 µl PBS für den FACS-Scan aufgenommen und bei Bedarf mit 0,9% NaCl oder PBS verdünnt.

5.3.8 Qualitativer und quantitativer Nachweis von sL-Selektin durch ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay)

Mithilfe des ELISA gelingt es, sL-Selektin hochsensitiv, d.h. in niedriger Konzentration, nachzuweisen und zu quantifizieren. Das nachzuweisende Protein (hier sL-Selektin) wird durch einen Antikörper am Boden einer Mikrowelltiterplatte immobilisiert. Über einen biotinylierten Sekundärantikörper kann an Extravidin gekoppelte Peroxidase gebunden werden. Peroxidase katalysiert eine Farbreaktion, deren Stärke (Extinktion) photometrisch ausgewertet werden kann. Die Nachweisgrenze des sL-Selektin-ELISA beträgt ca. 1 ng/ml.

Jeweils 200 ng des monoklonalen Antikörpers DREG-200 wurden, aufgenommen in Beschichtungspuffer, in die Vertiefungen einer 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde 2 h bei RT geschüttelt, dabei bindet der Antikörper unspezifisch an den Plattenboden. Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen mit TBS-T in folgender Weise entfernt: Dreimaliges Spülen mit jeweils 300 µl TBS-T, anschließend 5 min mit 300 µl TBS-T schütteln, weitere drei Spülschritte. Nach möglichst vollständigem Abnehmen der Flüssigkeit wurden auf den gebundenen Antikörper je 100 µl Überstand aus der K 562-Zellkultur in verschiedenen Verdünnungen gegeben. Es wurden jeweils Doppelmessungen vorgenommen, Verdünnungen erfolgten mit TBS-T, jedem folgenden Inkubationsschritt schloss sich ein Waschschritt wie oben beschrieben an. Zur Bindung des sL-Selektins wurde für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden pro Mulde 100 ng biotinylierter DREG-55 (10ng/µl) zugesetzt und erneut für 1 h inkubiert. Nach Zugabe von der Extravidin-Peroxidase (15 ng je Vertiefung) wurde für 30 min geschüttelt. Für die Farbreaktion wurden 100 µl frisch zubereitete Färbelösung dazugegeben, es wurde gewartet, bis eine ausreichende Farbreaktion sichtbar war (ca. 5-10 min). Sodann wurde die Farbreaktion durch je 50 µl 4 N

H_2SO_4 gestoppt. Die Intensität der Färbung wurde photometrisch bestimmt (λ = 450 – 490 nm).

Mithilfe einer Verdünnungsreihe eines bekannten sL-Selektinstandards wurde eine Eichgerade für die Konzentrationsbestimmung erstellt.

- Beschichtungspuffer: 50 mM Natriumcarbonat; pH 9,65
- TBS-T: 0,05 % Tween in TBS
- Färbelösung: 100 µl TMB-Lösung, 3 µl H_2O_2 (30%) in 10 ml Substratpuffer
- TMB-Lösung: 2% Tetramethylbenzidin in DMSO/Ethanol (1:1)
- Substratpuffer: 40 mM Citrat; pH 3,95