

3. Material und Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Größtenteils sind die Vorschriften denen im Laborhandbuch von J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis (1989), Cornel Mülhardt (2002) und Hubert Rehm (2002) beschriebenen angelehnt.

3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA (Mini-Lysat-Methode)

Bei der Mini-Lysat-Methode handelt es sich um eine Schnellpräparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen. Das Protokoll ist eine Modifikation der Methoden von Birnboim et al. sowie Ish-Horowicz et al. (18, 105). Die Präparationen eignen sich gut zur Charakterisierung der DNA durch Restriktionsverdau. EDTA inaktiviert natürlich vorkommende Nukleasen. SDS lysiert die Zellen und Kerne, wobei auch Proteine denaturieren. Die sich anschließende Neutralisation bewirkt die Renaturierung der DNA, welche bei Plasmid-DNA schneller als bei der chromosomalen DNA vor sich geht.

1,4 ml einer Über-Nacht-Bakterienkultur werden in ein Eppendorf-Cup überführt und 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Um die Zellwand der Bakterien abzubauen und die Zellen zu lysieren, wird das Bakterien-Pellet in 100 µl eiskalter Lösung I (+ 2 mg/ml Lysozym) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 200 µl stark alkalischer Lösung II, was zur vollständigen Lyse der Zellen führt. Es wird vorsichtig geschüttelt, 5 min auf Eis inkubiert und mit 150 µl Lösung III unter kräftigem Schütteln neutralisiert. Nach einstündiger Inkubation auf Eis werden chromosomale DNA und Proteine 5 min bei 11.000 rpm pelletiert. Der Überstand wird in ein zweites Eppendorfgefäß pipettiert und mit 1 ml Ethanol 1 h bei -80°C gefällt. Die gefällte DNA wird 15 min bei 11.000 rpm pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Man nimmt das Pellet in TE-Puffer auf und lagert es bei -20°C.

Lösung I

50 mM Glucose
25 mM Tris/HCl
10 mM EDTA
pH 8,0 , sterilfiltrieren

Lösung II

200 mM NaOH
1 % (w/v) SDS
autoklavieren

Lösung III

3 M Na-Acetat
pH 4,8 , autoklavieren

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl

1 mM EDTA

pH 8,0 , autoklavieren

3.1.2 Präparation von Plasmid-DNA (Maxi-Lysat-Methode, Qiagen)

Zur Gewinnung sehr sauberer Plasmid-DNA, welche direkt zu Sequenzierungen und Transfektion eingesetzt werden kann, kombiniert man die oben beschriebene Prozedur mit einer säulenchromatographischen Reinigung. Die Anionentauscher-Säule stammt aus dem Qiagen-tip-100-Kit. Unter den gegebenen Bedingungen wird die Plasmid-DNA von Resten chromosomaler DNA und Protein-Verunreinigungen getrennt.

500 ml Bakterienkultur werden über Nacht im Schüttler bei 37°C kultiviert. Die Zellen werden bei 4°C mit 6000 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet löst man in 10 ml Lösung I (+ 2 mg/ml Lysozym + 100 µg/ml DNase-freie RNase A) für 15 min auf Eis. Nach der Zugabe von 10 ml Lösung II werden die lysierten Zellen vorsichtig geschüttelt und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird mit 10 ml Lösung III neutralisiert, kräftig geschüttelt und 45 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Proteine und Zellbestandteile werden durch Zentrifugation bei 4°C mit 12.000 rpm für 30 min pelletiert. Den Überstand nimmt man ab und stellt ihn auf Eis.

Die Qiagen-Säule wird mit 10 ml Puffer Q_{BT} equilibriert, dann wird der o. g. Überstand auf die Säule gegeben. Die Säule wird zweimal mit 30 ml Puffer Q_C gewaschen. In ein neues Röhrchen wird mit 15 ml Puffer Q_F eluiert. Die DNA fällt man 5 min bei RT mit 1 Volumen 2-Propanol und zentrifugiert bei 4°C mit 11.000 rpm für 30 min, wäscht das Pellet zweimal mit 5 ml 70% igem Ethanol, zentrifugiert und trocknet das Pellet an der Luft. Das Pellet wird in 350 µl TE-Puffer aufgenommen.

Puffer Q_{BT}

0,75 M NaCl

50 mM MOPS

15 % EtOH

pH 7,0 , sterilfiltrieren

Puffer Q_C

1 M NaCl

50 mM MOPS

15 % EtOH

pH 7,0 , sterilfiltrieren

Puffer Q_F

1,2 M NaCl
50 mM MOPS
15 % EtOH
pH 7,0 , sterilfiltrieren

Lösung I, II, III siehe oben

3.1.3 Fällung von DNA

DNA läßt sich nach Zugabe von Salz durch Ethanol und 2-Propanol in der Kälte fällen. NaCl und Ethanol haben die Funktion, die Hydrathülle der DNA zu vermindern. Dadurch wird die Löslichkeit der DNA soweit herabgesetzt, daß sie präzipitiert.

Es werden 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 4,8) und 2,5 Volumina -20°C kaltes Ethanol bzw. 2 Volumina 2-Propanol zugegeben, gevortext und 1 h bei -80°C inkubiert. Bei der iso-Propanol-Fällung reichen 5 min bei RT. Die gefällte DNA wird 30 min bei 11.000 rpm pelletiert, das Pellet zweimal mit -20°C kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, erneut pelletiert und anschließend an der Luft getrocknet. Das trockene Pellet wird in TE-Puffer aufgenommen.

3.1.4 Photospektrometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA weist bei 260 nm ein charakteristisches Absorptionsmaximum auf, was zur Konzentrationsbestimmung mittels eines UV-Spektrometers benutzt werden kann. Eine $OD_{260}=1$ entspricht dabei 50 µg/ml dsDNA oder 33 µg/ml ssDNA. Bei Messungen von RNA-Konzentrationen entspricht obige OD einer Konzentration von 40 µg/ml. Falls die Probe stark mit Proteinen verunreinigt ist, muß die OD_{280} gemessen werden und der Quotient OD_{260}/OD_{280} berechnet werden. Bei Werten zwischen 1,8 und 2,0 ist die Probe relativ sehr sauber.

3.1.5 Analytischer DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten dsDNA an einer spezifischen Sequenz von 4-8 Basen, die sehr häufig palindromisch sind (z. B. EcoRI: G'AATTC). Restriktionsverdau sind das Mittel der Wahl bei der Überprüfung von rekombinanten Plasmiden. Als Ausgangsmaterial dient aus Mini-

Lysat gewonnene Plasmid-DNA, welche eine ausreichende Sauberkeit für analytische Zwecke besitzt.

Die analytische Spaltung findet vorzugsweise bei einem Ansatzvolumen von 10 µl statt. Man setzt 6 µl Plasmid-DNA (oder ca. 0,3 µg), 2,5 µl aqua bidest., 0,5 µl Enzym und 1 µl des entsprechenden 10x Puffers ein und inkubiert 1-16 h bei geeigneter Temperatur meistens bei 37°C. Das Reaktionsgemisch wird dann mit 2µl Probenpuffer auf ein analytisches Gel aufgetragen.

TAE-Puffer

40 mM Tris-Acetat
20 mM Na-Acetat
2 mM EDTA
pH 8,0 , autoklavieren

Probenpuffer

50 % (v/v) Glycerin
50 mM EDTA
0,05 ‰ (w/v) Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Lösung

5 mg/ml in TAE-Puffer

3.1.6 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese können DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer Moleküle ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Bei ringförmiger DNA können supercoiled-Strukturen auftreten, welche wegen der größeren Verdrillung schneller wandern und auf dem Gel als Banden bei zu kleinen Molekulargewichten auftreten. Die Nachweisgrenze liegt bei 1 ng DNA. Die Banden werden durch Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht. Auf Agarosegelen, unterschiedlicher Konzentration, können DNA-Moleküle im Bereich von 100-50.000 bp getrennt und identifiziert werden. Die ca. 0,5 cm dicken Agarosegele werden aus 50°C heißer 0,6-2 %iger (w/v) Agarose-Lösung gegossen. In das noch flüssige Gel wird ein Probenkamm eingesetzt, der nach dem Erkalten der Agarose herausgezogen wird und die Probenaschen bildet. Das Gel wird in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Geloberfläche muß gut mit Puffer bedeckt sein. Zu den Proben wird 1/5 Volumen Probenpuffer pipettiert. Die Probenkammern lädt man mit 10-15 µl der Proben; als Größenstandard werden 10 µl des DNA-Markers aufgetragen. Das Gel läuft bei 80 V. Man färbt 15 min im Ethidiumbromidbad und photographiert das Gel unter UV-Licht (366 nm).

3.1.7 Präparativer DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die eingesetzte Menge an Plasmid-DNA beträgt bei präparativen Spaltungen 80-200 µl. Die Reaktionsbedingungen entsprechen einem analytischen Verdau. Ebenso wird verfahren, wenn nur eine partielle Spaltung (z. B. bei Linearisierungen) gewünscht ist. Dabei wird nur wenig Enzym eingesetzt, 5 µl auf 150 µl Plasmid-DNA, damit nur die Sequenz mit der höchsten Priorität gespalten wird. Die Vollständigkeit der Spaltung wird gefördert, indem man ein Aliquot entnimmt und nochmals mit 1 µl Enzym 1 h bei geeigneter Temperatur weiter verdaut. Die Gelelektrophorese der Aliquots zeigt die Verhältnisse zwischen gespaltenen und ungespaltenen DNA. Soll danach mit einem zweiten Enzym unter anderen Pufferbedingungen gespalten werden, wird zuvor eine Ethanolfällung durchgeführt. Bei Verwendung des gleichen Puffers erfolgt keine Ethanolfällung. Nach der Ethanolfällung können 95 % DNA wieder gewonnen werden.

3.1.8 Präparatives Agarosegel

Der präparative Restriktionsverdau wird je nach Bandentrennung auf ein 0,6-2 %iges Agarosegel aufgetragen. Der Unterschied zu einem analytischen Gel besteht darin, daß ein besonderer Probenkamm verwendet wird. Dieser schafft eine Kammer für den Marker und eine 200 µl fassende Kammer für den präparativen Verdau. Das Gel wird nach der Elektrophorese im Ethidiumbromidbad gefärbt.

3.1.9 DNA-Gelextraktion (Qiaquick Gel Extraction Kit)

Die interessierende Bande des präparativen Verdau wird unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten. Da die DNA noch weiter verwendet werden soll, erfolgt das manuelle Heraustrennen der DNA bei einem UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm. Nukleinsäuren zeigen die größte Absorption bei 260 nm, sodaß bei einem UV-Licht von 254 nm Mutationen entstehen würden. Die Agarosestücke werden in 100 mg Portionen in Eppendorf-Cups mit 300 µl QG-Puffer gegeben und 10 min bei 50 °C inkubiert. QG-Puffer solubilisiert das Agarosestück und beinhaltet einen pH-Farbindikator, da die Qiaquick-Membran sowohl Salz als auch pH-abhängig ist. Anschließend wird die Probe bis zur Auflösung der

Gelfragmente gevortext. Die DNA-Probe wird auf die Qiaquick-Membran gegeben und kurz bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Agarosereste werden mit nochmaliger Zugabe von QG-Puffer aufgelöst. Die Qiaquick-Membran wird anschließend mit 0,75 ml PE-Puffer gewaschen und zweimal zentrifugiert. Die Elution der DNA erfolgt in ein neues Eppendorf-Cup mit 50 µl EB-Puffer oder aqua dest. (pH 7-8,5).

EB-Puffer

10 mM Tris/HCl

pH 8,5, autoklavieren

QG-Puffer (Qiagen)mit pH-Indikator $\leq 7,5$ *PE-Puffer* (Qiagen)

+96-100 % Ethanol (4:1)

3.1.10 Dephosphorylierung der Vektor-DNA-Fragmentenden

Die Dephosphorylierung der DNA-Fragmentenden soll verhindern, daß Vektorfragmente, die zwei zueinander kompatible Enden besitzen, mit sich selbst ligieren.

Nach dem Restriktionsverdau bleiben an den 5'-Enden der DNA-Fragmente Phosphatreste zurück, die für die Ligation benötigt werden. Entfernt man diese mit einer Phosphatase, kann keine Selbstligation des Vektors mehr stattfinden. Mindestens einer der beiden Phosphatreste des Inserts reicht für die Ligation mit dem Vektor aus.

Bei der präparativen Spaltung innerhalb der multiplen Klonierungsseite des pTRE2-Vektors wurde zunächst mit BamH1 (G↓GATCC) gespalten. Um für die Ligation mit dem Human-DPPIV-Insert passende Enden zu erzeugen, wurde weiterhin mit Hind III (A↓AGCTT) gespalten. Die Schnittstellen für BamH1 und Hind III sind jedoch so nahe beieinander gelegen, daß sich eine vollständige Spaltung von Hind III in der Gelelektrophorese nicht nachweisen ließe. Um eine Eigenligation der nicht mit Hind III gespaltenen Vektoranteile zu verhindern und die Ligationsrate zwischen Vektor zu erhöhen, erfolgt vor der Ligation eine Dephosphorylierung des Vektors.

Die Vektor-DNA wird gefällt, um Restriktionsenzym- und Pufferreste zu beseitigen und anschließend in 89 µl H₂O aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µl (1 %) bakterieller alkalischer Phosphatase und 10 x BAP-Puffer wird der Ansatz für mindestens 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 µl Enzym und weitere Inkubation für 1 h bei 60 °C wird das BAP-Enzym durch Phenol-Extraktion aus der DNA entfernt.

3.1.11 Phenol-Chloroform-Extraktion zur Reinigung der DNA-Fragmente

Mittels Phenolextraktion können Verschmutzungen und Proteine denaturiert (phenolhaltige untere Phase) und aus der Nucleinsäurelösung (obere wässrige Phase) abgetrennt werden. Die DNA-Lösung wird mit einem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation wird die wässrige Phase in ein neues Eppi pipettiert. Anschließend wird die wässrige Phase dreimal nacheinander mit einem möglichst großen Volumen, 800-1000 µl, Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Zwischen den Arbeitsschritten wird jeweils 10 min bei RT mit Unterbrechung gevortext, das Gemisch bei 11000 rpm 2 min zentrifugiert und die obere, wässrige Phase ohne Interphase in ein neues Gefäß überführt. Verbleibende Chloroformreste werden nach Salzzugabe durch Ethanolfällung entfernt.

(Zur Aufbewahrung sollte das Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch mit TAE-Puffer überdeckt werden, um das Phenol bei pH 8 zu bewahren.)

3.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Die DNA-Fragmente werden mit hochspezifischen Restriktionsendonukleasen aus der Ursprungs-DNA herausgeschnitten. Die Vektoren besitzen eine sogenannte Multi-Cloning-Site (MCS), in der auf engem Raum die Schnittstellen von verschiedenen gängigen Restriktionsenzymen vorhanden sind. Da die DNA-Zielsequenz der Restriktionsenzyme meist palindromisch aufgebaut ist, können DNA-Enden von verschiedenen, geschnittenen Fragmenten oder Vektoren miteinander ligiert werden. Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten verwendet man T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym sorgt für die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Ketten.

Bei Erzeugung des regulierbaren h-DPPIV-Vektorkonstruktes F202 mußte die cDNA der h-DPPIV zunächst aus dem pFast Bac1-Vektor (TS16) herausgetrennt werden. Das h-DPPIV-Insert wurde anschließend in den pTRE2-Antwortvektor kloniert.

Ansatz für die Ligation:

Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert soll zwischen 1:1 und 1:5 liegen. Der Ligationsansatz besteht aus 3 µl Vektor (50ng), 15 µl Insert, 1 µl T4-DNA-Ligase, 2,3 µl 10x Ligationpuffer, sowie 1,7 µl sterilem Wasser. Der Ansatz wird über Nacht bei 12°C inkubiert.

Der Ligationsansatz kann dann direkt zur Transformation verwendet oder bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

3.1.13 Transformation von Ligationsansätzen in kompetente *E. coli* - Zellen HB101

Das ligierte Vektor-Fragment wird in HB101-Zellen transformiert und kloniert. Nach der Vermehrung wird ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA durchgeführt und so der Erfolg der Konstruktion des rekombinanten Plasmids überprüft.

Herstellung kompetenter Zellen mit CaCl_2 :

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß die Zellmembran durch die Behandlung mit CaCl_2 für DNA-Moleküle durchlässig gemacht wird.

Zur Herstellung kompetenter Zellen werden 3 ml LB-Medium mit 50 μl beziehungsweise einer Zahnstocherspitze *E. coli*-Stammzellen aus einer Petrischale geimpft und ü. N. bei 37°C unter Schütteln (195 rpm) inkubiert. 1 ml der Über-Nacht-Kultur gibt man zu 100 ml LB-Medium und läßt sie bei $37^{\circ}\text{C}/195\text{ rpm}$ bis zu einer OD_{600} von 0,2-0,5 wachsen. Die Zellsuspension wird 10 min auf Eis gekühlt und die Zellen dann 7 min bei 6000 rpm pelletiert. Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, resuspendiert man die Zellen vorsichtig in 20 ml kalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung. Die Zellen sind jetzt sehr empfindlich und dürfen nicht gevortext werden. Die Lösung wird 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren (7 min/6000 rpm) werden die Zellen in 0,5-1 ml kalter 0,1 M CaCl_2 -Lösung aufgenommen und für mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Sie können jetzt direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 15 % Glycerin bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ als kompetente Zellen gelagert werden.

Herstellung kompetenter Zellen mit Roti-Transform:

Es werden 300 μl einer frischen Übernachtskultur *E. coli* in 30 ml LB-Medium geimpft und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf dem Schüttler bis zu einer optimalen OD_{600} 0,4-0,7 kultiviert. 1,9 ml der Bakteriensuspension werden bei 5000 rpm zentrifugiert und in 100 μl kaltes LB-Medium resuspendiert. Die Zellen werden mit 90 μl eiskaltem Reagenz Roti-Transform vermischt, danach Reagenz Roti-Transform 2 zugegeben und abermals vermischt. Nach 5 min Inkubation der kompetenten Zellen auf Eis können diese für die weitere Transformation verwendet werden.

Transformation nach CaCl₂:

Bei der Transformation dringen DNA-Moleküle durch die permeable Zellmembran in die Bakterienzelle ein. Der eingesetzte pTRE2-Antwortvektor trägt ein Ampicillinresistenzgen und überträgt dadurch die Antibiotikaresistenz auf die Zelle. Aufgrund dieser Resistenz wachsen in den Kulturschalen nur Zellen mit eingeschleustem Plasmidvektor. Eine Selektion zwischen rekombinanten Plasmiden und Vektoren ohne Insert kann bei dieser Klonierung nicht getroffen werden.

LB-Ampicillin-Agarplatten werden für 1 h bei 37°C im Brutschrank getrocknet und vorgewärmt. Zu 100 µl kompetenten Zellen werden 10 µl DNA-Ligationsansatz (ca. 1µg/15µl) pipettiert. Der Transformationsansatz wird weitere 20-60 min auf Eis gehalten. Um einen Hitzeschock der Zellen auszulösen, werden diese 2 min bei 42 °C inkubiert und idealerweise wieder kurz auf Eis abgekühlt. Nach 10 min bei RT werden die Zellen mit 1 ml LB-Medium versetzt und 45 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Verschiedene Volumina 20 µl, 50 µl und 100 µl der Transformationsansätze werden auf den vorgewärmten LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation nach Roti-Transform:

Bei der Transformation nach Roti-Transform beträgt das Volumen 200 µl. Die Zellen müssen keinem Hitzeschock ausgesetzt werden. Der Transformationsansatz kann nach Inkubation auf Eis für 30-60 min direkt ausplattiert werden.

Kontrollen:

Als Kontrollen werden Leervektor pTRE2-DNA und H₂O und Human-DPPiV-Fast Bac1-DNA anstelle des Ligationsansatzes verwendet.

Auf den Ampicillinplatten wachsen nur transformierte HB101-Zellen. Zur Vermehrung überträgt man mit einem sterilen Zahnstocher ein paar Zellen in 3 ml LB-Ampicillin-Medium und inkubiert über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator. Die Plasmid-DNA wird zunächst durch ein Mini-Lysat gewonnen und kann mittels Restriktionsverdau untersucht werden

LB-Medium

5 g Hefeextrakt
10 g Bacto-Pepton
10 g NaCl
ad 1 l aqua bidest., autoklavieren

LB-Ampicillin-Medium

wie LB-Medium
+ 50 µg/ml Ampicillin

LB-Ampicillin-Agarplatten

wie LB-Ampicillin-Medium
+15 g Agar

3.2 Zellkulturmethoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in 10 cm Kulturschalen bei 37 °C unter 5 % CO₂-Begasung in entsprechendem Medium.

3.2.1.1 CHO-Zellen (Chinese-Hamster-Ovary)

Als Kontrolle zur Untersuchung der DPPIV/CD26-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien wurden Chinese-Hamster-Ovary-Zellen gewählt (ATCC-Nr. CCL-61, Name: CHO-K1). Diese Fibroblasten-Linie exprimiert keine endogene Dipeptidylpeptidase IV/CD26 und wird in α -MEM-Medium kultiviert. Durch die Transfektion mit der rekombinanten DPPIV/CD26 erhalten die CHO-Zellen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (G-418 Sulfat, Gibco Life Technology). Die Resistenz liegt auf dem Expressionsvektor pRC/CMV und wird bei stabil transfizierten Klonen zusammen mit der DPPIV/CD26-cDNA in die Zell-DNA eingefügt. Transfizierte CHO-Zellen werden in α -MEM-Selektions-Medium kultiviert.

α -MEM -Medium (500 ml)

Firma Biochrom, zugeben

Ribonucleoside (2,5 mg G, je 5 mg A, C, T)

2 mM L-Glutamin

50.000 U Penicillin/Streptomycin-Lsg.

10 % v/v inaktiviertes FKS

α -MEM -Selektions-Medium

zusätzlich 400 mg/l Geneticin

(G-418 Sulfat, Gibco Life Technology)

3.2.1.2 Mel2A – Melanomzellen

Bei Mel 2A handelt es sich um eine humane Melanomzelllinie, welche ursprünglich aus einem malignen, metastasierten Melanom stammt (Sorg et al. (189); Bruggen et al. (25)). Mel 2A Melanomzellen werden in DMEM-Medium kultiviert.

Nach Transfektion mit Ratten-DPPIV/CD26-cDNA zusammen mit dem Expressionsvektor pRC/CMV werden die Zellen in DMEM-Selektionsmedium kultiviert.

3.2.1.3 303AG7 – Melanomzellen

Die Melanomzelllinie 303AG7 ist eine Subklonierung, der mit dem pTet-On-Regulationsplasmid transfizierten Melanomzelllinie Bro. Bei Bro handelt es sich um humane, schnellwachsende und undifferenzierte Melanomzellen (Lockshin et al., 1985 (136)). Das Regulationsplasmid pTet-On kodiert eine Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (G-418 Sulfat, Gibco Life Technology). Nach Transfektion des pTet-On Regulationsplasmid werden die 303AG7 in DMEM-Selektionsmedium kultiviert. Nach transienter Transfektion der Human-DPPiV-cDNA zusammen mit dem Antwortplasmid pTRE2 werden die Zellen ebenfalls in DMEM-Selektionsmedium gehalten. (Bezüglich doppelt-stabiler Transfektion mit pTRE2 und pTKHyg siehe 3.2.2.2.)

DMEM -Medium (500 ml)

w 4,5 g/l D-Glucose

Firma Biochrom, zugeben

1 mM Na-Pyruvat

2 mM L-Glutamin

50.000 U Penicillin/Streptomycin-Lsg.

10 % v/v inaktiviertes FKS

DMEM -Selektionsmedium

DMEM-Medium

+ zusätzlich 400 mg/l Geneticin

(G-418 Sulfat, Gibco Life Technology)

3.2.2 Transfektion von DNA in Melanomzellen

3.2.2.1 Transfektion mittels Elektroporation (Eppendorf-Multiporator)

Bei der Transfektion mittels Elektroporation macht man sich die Kondensatoreigenschaft der Zellmembran zunutze. Durch eine intakte Membran kann kein Strom fließen. Setzt man Membranen einem starken elektrischen Feld aus, so führt dies zu einem vorübergehenden Zusammenbruch ihrer Struktur und zur Bildung von größeren Poren, durch die Makromoleküle, wie z. B. DNA-Fragmente, in die Zelle gelangen können. Die Reorganisation der Membranen verläuft spontan aber mit zeitlicher Verzögerung.

Mel2A werden mit rekombinanter Ratten-DPPiV/CD26 transfiziert. Die subkonfluent gewachsenen Mel2A werden abgelöst, gezählt und mit dem hypoosmolaren Puffer (Eppendorf, Cat.-No.: 4308 070.501) auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je Elektroporation werden in die Küvette 400 μ l Zellsuspension und 2-4 μ g DNA in isoosmolaren

Puffer (Eppendorf, Cat.-No.: 4308 070.501) gegeben. Die DNA sollte vorher linearisiert werden, um die Transfektionsrate zu verbessern. Die Geräteeinstellungen für Mel2A sind 600V, 100 μ s mit einem Puls.

Nach dem Puls inkubiert man 10 min bei RT. Die Zellen werden 1x mit DMEM-Kulturmedium ohne Phenolrot gewaschen und dann 48 h in einer 6-well Platte mit dem gleichen Medium kultiviert. Nach 48 h wird das Medium gegen DMEM-Geneticin-Selektionsmedium getauscht. Die erste Woche wird das Selektionsmedium täglich, in der zweiten Woche alle 2 Tage gewechselt, um einen gleichmäßigen Selektionsdruck zu gewährleisten.

3.2.2.2 Stabile Transfektion mittels Superfect-Reagenz (Qiagen)

Bei der Transfektion mit Lipiden bestimmter Zusammensetzung werden Liposomen geformt, welche in der Lage sind mit Nukleinsäuren einen Komplex zu bilden und in die Zelle zu gelangen.

Am Tag vor der Transfektion werden 5×10^5 Zellen in einer 3 cm Kulturschale ausgesät. Am Tag der Transfektion sollten sie zu 40-80% konfluent sein.

5 μ g DNA in TE-Puffer, pH 7,4 werden mit serum- und antibiotikafreiem DMEM auf ein Gesamtvolumen von 200 μ l gebracht und mit 10 μ l Superfect-Reagenz versetzt. Die Suspension wird 10 sec gevortext und zur Komplexbildung 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen werden inzwischen mit 3 ml PBS gewaschen. Die DNA-Superfect-Mischung wird gründlich mit 600 μ l komplettes DMEM vermischt und zu den Zellen gegeben. Nach 3 h im Brutschrank nimmt man das Medium ab, wäscht die Zellen mit 4 ml PBS und gibt frisches Medium dazu. Nach 48 h wird das Medium gegen DMEM-Geneticin-Selektionsmedium getauscht.

3.2.2.3 Transiente und stabile Transfektion mittels DMRIE-C Reagenz (Invitrogen)

Zur Vorbereitung erfolgt 24 h vor der Transfektion eine Passage der 303AG7 auf eine 6-Loch-Platte zu 2×10^5 Zellen/Loch mit 2 ml Medium. Die Zellen sollten pro Loch eine Konfluenz von 60% nicht überschreiten. Zur Transfektion einer 6-Loch-Platte werden 6 ml Opti-MEM mit 6,3 μ l DMRIE-C in ein Polystyren-Tube gegeben, mehrere Male invertiert und 30 Minuten bei RT stehen gelassen.

Anschließend werden 0,63 µg Plasmid in 250 µl Opti-MEM direkt zu den 6 ml Opti-MEM mit DMRIE-C gegeben und mehrere Male invertiert. Der Ansatz wird zur Komplexbildung 15 Minuten bei RT belassen. Aus den 6 Löchern wird das Medium abgehoben und jeweils mit 2 ml Opti-MEM gewaschen. Dabei sollte das Medium möglichst vollständig abgesaugt werden. In jedes Loch wird 1 ml Lipid-Ansatz pipettiert und 4h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Daraufhin erfolgt ein Mediumwechsel mit DMEM mit Doxycyclin zur Induktion der h-DPPiV-Expression. Nach 24 h erfolgt der zweite Mediumwechsel mit DMEM-Selektionsmedium mit Doxycyclin.

Doppelt-stabile Transfektion mit pTKHyg:

Um eine doppelt-stabile Transfektion zu erreichen, wird pTRE2 mit dem Selektionsvektor pTKHyg im Verhältnis 20:1 kotransfiziert. pTKHyg kodiert die genetische Information für die Resistenz gegen Hygromycin. Nach Kotransfektion von pTKHyg und pTRE2 erfolgt der erste Mediumwechsel zunächst mit DMEM ohne Antibiotika. Nach 24 h werden die Zellen ohne Induktion in DMEM-Geneticin-Selektionsmedium mit Hygromycin (100 µg/ml) kultiviert. Aufgrund der hohen Konzentration von pTRE2 im Transfektionsansatz, lassen sich pTRE2-positive Klone selektieren.

3.2.3 Selektion von stabil transfizierten Zellen durch Klonierung

Nach der Transfektion werden die Zellen zunächst für zwei Wochen kultiviert. Für die Klonierung werden die Zellen mit PBS/EDTA abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Sie wird auf 30 Zellen/ml eingestellt und die Zellsuspension mit 100 µl/Loch auf eine 96-Loch-Platte ausgebracht. Die Löcher mit einer einzigen Zelle werden markiert und nach Entstehung eines Zellklons auf eine entsprechend größere Kulturflächen umgesiedelt. Somit kann aus jeder einzelnen Zelle jeweils ein Klon angezchtet werden. Bei ausreichender Zellzahl werden die Klone unter dem Fluoreszenzmikroskop und im FACScan auf eine optimale DPPiV/CD26-Expression hin untersucht.

PBS 10fach

1000 ml H₂O
140 mM NaCl
3 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
1,5 mM KH₂PO₄
pH 7,4 (HCl); 294-304 mosmol/L
autoklavieren

PBS / EDTA

PBS (einfach) + 0,05 % EDTA

3.2.4 Anlegen von Zellstocks

Vor der Herstellung von Zellstocks sollten die Zellen nach Möglichkeit 24 h vorher in frischem Medium kultiviert werden. Eine Flasche ergibt 2-4 Stocks und eine kleine Flasche bzw. eine 10 cm Schale 1-2 Stocks. Alle Zentrifugationschritte erfolgen für 3 min bei 900 rpm. Zunächst werden die Zellen mit PBS gewaschen. Die adhärenen Zellen werden mit PBS/EDTA oder PBS/EDTA/0,1%Trypsin für ungefähr 5 min bei 37 °C abgelöst, in 10 ml Medium gewaschen und nochmals zentrifugiert. Jedes Stockpellet wird in 500 µl Medium-A und 500 µl Medium-B resuspendiert, kurz gevortext und in 1 ml Einfrierröhrchen aliqottiert. Die Stocks werden in Zellstoff eingepackt, für 2 h in -20 °C eingefroren, in -80 °C überführt und in flüssigem N₂ gelagert.

Medium-A

50 % Anzuchtmedium
50 % inaktiviertes Kalbsserum

Medium-B

80 % Anzuchtmedium
20 % DMSO

3.3 Proteinchemische und immunologische Methoden

Zur Darstellung der DPPIV/CD26 kommen unterschiedliche anti-DPPIV/CD26-Antikörper zur Anwendung, abhängig vom Vorhandensein und den Versuchsbedingungen.

Anti-DPPIV/CD26-Antikörper:

1. polyklonaler anti-Schwein-DPPIV/CD26 (α -Pig Thori) mit Kreuzreaktion zur Ratten- und Human-DPPIV/CD26 (von Dr. Thori).

Antikörper aus der AG Reutter:

2. polyklonaler anti-Ratten-DPPIV/CD26 (AS₃ K₇).
3. polyklonaler anti-Human-DPPIV/CD26 (R3/2)
4. polyklonaler anti-Human-DPPIV/CD26 (IgG 9/5)
5. monoklonaler anti-Ratten-DPPIV/CD26 (MAK13.4)

3.3.1 Immunfluoreszenz permeabilisierter und nicht permeabilisierter Zellen

Die in einer kleinen Kulturschale gewachsenen adhärennten Melanom-Zellen werden vom Medium befreit und 3x mit PBS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung inkubiert man sie 10 min mit 1 ml 3%igem Formaldehyd/PBS. Danach wird 3x vorsichtig mit PBS gespült. Um die Zellmembran zu permeabilisieren und somit für die Antikörper durchgängig zu machen, werden die Zellen 5 min 1 ml mit 0,1% Triton X-100/PBS inkubiert und anschließend 3x gewaschen. Zur Detektion von Proteinen auf der Zelloberfläche wird dieser Schritt ausgelassen. Um zu verhindern, daß es zu unspezifischen Antikörperbindungen kommt, werden die Zellen mit 5% Milchpulver/PBS für 1 h bei RT blockiert. Nach 3maligem vorsichtigen Waschen mit PBS-Puffer erfolgt die Kopplung des ersten Antikörpers. Man gibt 1 ml anti-DPPIV/CD26-Antikörper (1:500 in PBS) auf die Zellen und inkubiert 1 h bei RT. Es wird 3x mit PBS-Puffer gewaschen bevor man die Zellen 1 h bei RT mit dem farbstoffgekoppelten Antikörper inkubiert. Dabei handelt es sich um einen FITC-konjugierten anti-Maus/Kaninchen-Antikörper (Sigma Immunochemicals) in einer Verdünnung von 1:100. Die Inkubation und alle folgenden Schritte erfolgen unter möglichst wenig Lichteinwirkung, da die fluoreszierende Gruppe des Antikörpers durch Licht zerstört wird. Die Zellen werden 3x mit PBS-Puffer gespült, an der Luft getrocknet und zur Erhöhung der Fluoreszenz mit Elvanol und einem Deckglas eingedeckt. Die Detektion der DPPIV/CD26-Lokalisation durch Immunfluoreszenz erfolgt unter einem Mikroskop mit 40-100facher Vergrößerung. Die Photos werden mit einem angeschlossenen Videoprinter bzw. direkt mit dem Computer (IPLab-Programm) aufgenommen.

Elvanol

3 g Polyviol in 40 ml PBS 16 h rühren

15 ml Glycerin zugeben, 16 h rühren

15 min/12000 rpm

zum Überstand 1 mg Phenylidiamin geben und lichtgeschützt lösen, pH 8,0

250 µl β-Mercaptoethanol zugeben, bei -20°C lagern

3.3.2 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Die Fluoreszenz der mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper kann durch Anregung mit einem Laser sichtbar gemacht werden. Die durchflußzytometrische Analyse erfolgt mit Hilfe des FACScan (Fluorescence Activated Cell Sorting, Becton-Dickinson) (Parks et al., 1986). Bei der Durchflußzytometrie werden zudem die physikalischen Eigenschaften von Zellen gemessen. Die Zellen passieren einzeln verschiedene Detektoren, die die Lichtstreuung der Zellen und das Fluoreszenzlicht messen. Man unterscheidet zwischen einer Streuung in der Vorwärtsrichtung (Aufwärtsstreulicht) und einer Streuung im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl (Orthogonalstreulicht). Die Lichtstreuung einer Zelle ist abhängig von der Größe, sowie der Oberflächen- und Zytoplasmabeschaffenheit. Das Aufwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe der gemessenen Zellen, während das Orthogonalstreulicht die Granularität der Zellen mißt. Die Fluoreszenz der bei den Experimenten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin (PE, rot) und Fluoreszein (FITC, grün) wird mit einem Laser angeregt. In einem Koordinatensystem lassen sich die verschieden gefärbten Zellen darstellen. Alle FACScan-Analysen werden mit CellQuest Software (Becton Dickinson, Eremodegem, Belgien) ausgewertet.

Prozedere:

Zu analysierende Zellen werden mit PBS/EDTA abgelöst, bei 900 rpm 3 min abzentrifugiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Das Pellet wird in PBS/BSA 1% aufgenommen und mindestens 30 min blockiert.

Die Zellen werden mit dem ersten Antikörper, anti-DPPiV-Immunglobulin (1:500), in PBS/BSA 1% für 1 h inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS/BSA 1% gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten PE- oder FITC-konjugierten Antikörper (1:100) in PBS/BSA 1% erfolgt für 45 min in Dunkelheit. Nach dreimal Waschen mit PBS werden die Zellen in 1 ml PBS in ein FACS-Röhrchen aufgenommen und im FACScan gemessen.

3.3.3 Solubilisierung von Zellen

Um die Proteinkonzentration und die Enzymaktivität einer Zellpopulation zu messen, werden die Zellen solubilisiert und die Proteine von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Nach Abnahme des Nährmediums werden die Zellen mit 5 ml PBS/EDTA abgelöst und in ein Falcon-

Röhrchen überführt. Der Überstand wird nach 4 minütigem Zentrifugieren bei 900 rpm entfernt.

Das Pellet löst man mit der Pipettenspitze in 250-500 µl Solubilisationspuffer. Zu dem Puffer gibt man direkt vorher je ein Volumenprozent von Stammlösungen der Proteasehemmer PMSF, Leupeptin, Pepstatin und Aprotinin. Alternativ kann RIPA mit Trasinol und PMSF genommen werden. Das Solubilisat wird in ein Eppendorf-Cup überführt und mindestens 2 h bei 4°C im Drehschüttler inkubiert. Zur Abtrennung der Zellbestandteile von dem Zellprotein zentrifugiert man 10 min mit 18.000 rpm bei 4°C. Der Überstand mit der Proteinfraction wird in ein neues Eppi überführt.

Solubilisationspuffer

8,8 g NaCl
1,21 g Tris
0,2 g MgCl₂
0,1 g CaCl₂
10 ml Triton X-100
ad 1 l aqua bidest., pH 7,8

RIPA-Puffer:

50 mM Tris/HCl
150 mM NaCl
1 % Triton X-100
1 % Na-Desoxycholat
0,1 % SDS, pH 7,2

Proteaseinhibitoren:

Trasinol 1:1000
PMSF 1:100

3.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Methode, Pierce)

Diese Methode beruht auf der Reaktion von Peptidgruppen mit Bicinchinonsäure (BCA) (Smith 1985 (194)). Protein bildet mit Cu²⁺-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Über Cu⁺-Ionen kommt es mit Bicinchoninsäure zu einem violetten Farbkomplex, welcher im Photometer meßbar ist.

Die Reagenzien A und B werden im Verhältnis 50:1 gemischt. Das Probenvolumen 2 µl und 4 µl werden mit aqua bidest. auf 20 µl gebracht und jeweils 200 µl BCA-Gemisch dazugegeben. Die Reaktion findet für 30 min bei 37 °C im Heizblock statt. Im Photometer kann die Extinktion bei 578 nm gemessen werden. Die Konzentration ergibt sich anhand des BSA-Standards (0-500 µg/ml).

3.3.5 Bestimmung der DPPIV/CD26-Enzymaktivität in Lösung

Bei dieser photometrischen Methode wird Gly-Pro-p-Nitroanilidosylat von der DPPIV/CD26 zu einem Chromophor umgesetzt und photometrisch bei 405 nm vermessen (Kreisel. 1982 (127), Nagatsu 1976 (157)).

10 µl Zellsolubilisat und 1 µl Substratlösung werden in 190 µl Inkubationspuffer, 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion muß aufgrund der geringen Enzymaktivität und wegen der gleichzeitigen Messung in einer Mikrotiterplatte nicht mit Stopplösung beendet werden. Die Messung der Extinktion erfolgt im Photometer.

Substratlösung:

1 µmol/µl L-Gly-L-Pro-p-Nitroanilidosylat
in aqua bidest.

Inkubationspuffer:

100 mM Tris/HCl, pH 8,0

Stopplösung:

1 M Na-Acetat
pH 4,5

3.3.6 Immunopräzipitation von DPPIV/CD26

Man läßt 50 mg trockene Protein-A-Sepharose ü. N. bei 4°C in 1 ml PBS quellen. Die Sepharose/PBS-Suspension wird 30 sec bei 5000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand PBS verworfen. Zur Antikörperkopplung werden 15 µl Antiserum (15 µg) an 500 µl Sepharose/PBS-Suspension 2 h bei 4°C am Drehspieß gekoppelt. Anschließend wird die Sepharose 3x mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Die antikörpergekoppelte Sepharose-Suspension wird zu je 100 µl aliquotiert und erneut der Überstand PBS verworfen. Zur Präzipitation wird das Solubilisat auf den Sepharose-Antikörperkomplex mindestens ü.N. bei 10 °C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Abzentrifugation des Überstandes wird der gekoppelte Sepharose-Ak-Protein-Komplex viermal mit RIPA, einmal mit Prewash und anschließend mit PBS jeweils 1 ml gewaschen. Das PBS wird nahezu entfernt und je 10 µl 5x Probenpuffer (+ DTT 1:10) hinzu gegeben. Nach 5 min kochen, können die Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt werden.

Prewash-Puffer:

1 M NaCl
10 mM Tris/HCl
0,1 % NP-40
pH 7,2

3.3.7 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Denaturierte Proteine wandern in einer Gelmatrix entsprechend ihrer SDS-Ladung; die Struktur spielt unter diesen Bedingungen keine Rolle (Laemmli 1970 (132)). Zur Erhöhung der Bandenschärfe wandern die Proben erst durch ein niedrigvernetztes, nicht trennendes Sammelgel, bevor sie im Trenngel nach der Größe separiert werden.

Die Lösung für das Trenngel wird unter Eiskühlung gemischt und bis zu einer Höhe von 1,8 cm unter den oberen Rand der Minigel-Platten (9x8 cm, 0,75 mm Spacer) gegossen. Dann wird mit 2-Propanol überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Nach dem Auspolymerisieren mischt man in gleicher Weise das Sammelgel, nimmt das 2-Propanol ab und gießt die Sammelgellösung unter Verwendung eines geeigneten Kammes auf das Trenngel.

Die Proben werden mit 10 % (v/v) reduzierten 5x Probenpuffer versetzt und 5 min auf 96 °C erhitzt und mit einer Hamilton-Pipette in die Probenaschen übertragen. Alternativ werden zur Darstellung der DPPIV/CD26 die Proben mit nichtreduzierendem 5x Probenpuffer und ohne Erhitzen aufgetragen. Als Marker verwendet man 10 µl High-Molweight-Marker oder 10 µl Prestained-Marker. Das Gel läuft 45 min bei konstant 200 V.

4 % Sammelgel

0,4 ml Lösung A
0,75 ml Lösung C
1,85 ml aqua bidest.
12 µl 10 % APS
3 µl TEMED

7,5 % Trenngel

2,25 ml Lösung A
2,25 ml Lösung B
4,5 ml aqua bidest.
50 µl 10 % APS
5 µl TEMED

Lösung A

30 %/0,8 % aa/bis-aa Lösung
(Firma Roth)

5x nichtreduzierender Probenpuffer

2,5 g SDS
10 ml Glycerin
0,72 g Tris
1 ml 0,3 % Bromphenolblau
ad 20 ml aqua bidest., pH 6,8

Lösung B

0,8 g SDS
36,3 g Tris/HCl
ad 200 ml aqua bidest., pH 8,8

5x reduzierender Probenpuffer

wie nichtreduzierender PP
zusätzlich 50 mM DTT

Lösung C

0,4 g SDS
6,0 g Tris/HCl
ad 100 ml aqua bidest., pH 6,8

Laufpuffer

30 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS
ad 1 l aqua bidest., pH 8,8

3.3.8 Western-Protein-Blotting

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus Gelen auf Nitrozellulose geschieht in Anlehnung an das Tank-Blot-Verfahren nach Towbin et al. (199). Die Nitrozellulose (Schleicher & Schüll) wird 30 min in Transfer-Puffer äquilibriert und mit dem Trenngel, zwei Whatman-Filterpapieren, zwei Schwämmen und dem Tankeinsatz luftblasenfrei zum Blot-Sandwich zusammengesetzt. Das Blotting wird 1 h mit konstant 250 mA unter Eiskühlung im Elektrophoresetank durchgeführt. Die Nitrozellulose zeigt dabei zur Anode, das Gel zur Kathode.

Blotpuffer

20 mM Tris/HCl
0,15 M Glycin
10 % (v/v) Methanol
pH 7,8

3.3.9 Ponceau-Rot-Färbung

Diese Färbung von geblotteter Nitrozellulose (Salinovic 1986 (181)) erlaubt die schnelle Kontrolle des Transfers beim Western-Blot. Die Nitrozellulose wird mit der Färbelösung übergossen und 20 min bei RT geschwenkt. Durch 1% ige Essigsäurelösung wird die Färbung sichtbar gemacht. Die Färbung kann durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt werden.

Ponceau-Rot-Lösung

0,1 % (w/v) Ponceau-Rot

1,5 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA)

1,5 % (w/v) Sulfosalicylsäure

3.3.10 Immunologische Detektion auf Blotmembranen

Im Anschluß an die Ponceau-Färbung wird die Nitrozellulose 1-2 h bei RT mit Blockierungspuffer auf dem Schwenktisch inkubiert. Zusammen mit ca. 5 ml Blockierungspuffer wird der erste DPPIV/CD26-spezifische Antikörper (10 µl Antiserum, 1:1000 in PBS) über Nacht bei 4°C gekoppelt. Überschüssiges Antiserum wäscht man zweimal je 10 min mit PBS/0,3% Tween und einmal mit PBS weg.

Luminolentwicklung:

Der zweite, Peroxidase tragende Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen/Ziege-anti-Maus), wird in einer Verdünnung von 1:5000 in 10 ml PBS/Tween 2 h bei RT gekoppelt. Vor dem Entwickeln werden Antikörperreste durch zweimaliges Waschen mit PBS/Tween entfernt. Zur Luminolfärbung benetzt man den Blot in der Dunkelkammer mit einem Gemisch aus 10 µl Lösung A, 1 ml Lösung B und 3 µl Lösung C und inkubiert für ca. 5 min. Der Blot wird kurz getrocknet, zwischen Plastikfolien in eine Filmkassette gelegt und der aufgelegte Film je nach Stärke der Lumineszenz für 1 sec bis 3 min belichtet. Der Film wird anschließend in einem Agfa CURIX60 entwickelt.

Luminol-Lösung A

6,8 mM Coumarinsäure in DMSO

*Luminol-Lösung B*1,25 mM Luminol in 0.1 M Tris/HCl
pH 8,5*Luminol-Lösung C*3 % H₂O₂ in H₂Oalkalische Phosphatase:

Der zweite Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen/Ziege-anti-Maus, DAKO Envision) ist mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt und wird im Verhältnis 1:20 in PBS verdünnt. Das aP-Substrat wird frisch in Substratpuffer angesetzt. Die Entwicklung erfolgt unter Sicht. Die Reaktion wird durch Waschen mit PBS/Tween unterbrochen.

aP-Substrat

10 ml Substratpuffer
 13 µl NBT
 100 µl BCIP

Substratpuffer

1000 ml aqua bidest.
 97 ml Diethanolamin
 0,1 g MgCl₂ x 6H₂O
 0,02 % NaN₃
 pH 9,8 (HCl), lichtempfindlich

3.3.11 Silberfärbung von Proteinen auf der Blotmembran

Bei der Silberfärbung bildet das Ag⁺-Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteine. Alkalisches Formaldehyd reduziert das Ag⁺ der Komplexe zu Ag.

Beim Arbeiten mit Silbernitrat muß darauf geachtet werden, daß das Gel nicht mit Protein verunreinigt wird (Handschuhe!). Das SDS-PAGE wird zunächst mindestens 1 h in 50 ml Fixierlösung¹ mit Formaldehyd fixiert (Steck et al.1980 (191)). Anschließend wird das Gel dreimal 20 min in 25 ml Ethanol/aqua bidest (1:1) gewaschen. Es folgt die Inkubation für 1 min in Lösung A, dreimaliges Waschen für 20 sec in aqua bidest, Inkubation für 20 min in Lösung B und zweimaliges Waschen für 20 sec in aqua bidest. Das Gel wird in Lösung C solange inkubiert, bis die Proteinbanden eine ausreichende Färbung erreicht haben. Eine leichte Nachfärbung sollte dabei berücksichtigt werden. Die Färbung läßt sich durch Auswaschen der Lösung C mit aqua bidest verlangsamen. Das gefärbte Gel wird anschließend für 30 min in Fixierlösung ohne Formaldehyd inkubiert.

hDPPIV/CD26 zeigt in der Silberfärbung eine typische braungelbliche Färbung. Neben Proteinen können sich auch Nukleinsäuren, Lipopolysaccharide, Lipide und Glykolipide anfärben. Sofern der Lämmli-Probenpuffer DTT enthielt, entstehen bei der Silberfärbung des Gels oft zwei Artefaktbanden in BSA-Höhe (Hashimoto et al. 1983 (88)).

Lösung A

10 mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O
 + 50 ml aqua bidest.

Lösung B

0,1 g AgNO₃
 37 µl Formaldehyd 37 % ig
 50 ml aqua bidest.

Lösung C

1,25 ml Lösung A
 = 0,25 mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O
 + 3 g Na₂CO₃
 + 25 µl Formaldehyd 37 % ig
 + aqua bidest. bis auf 50 ml

Fixierlösung¹

50 % : 10 % Essigsäure
 40 % Ethanol
 50 % aqua bidest.
 50 % : Formaldehyd 37 % ig

3.4 Apoptoseinduktion

Vor Versuchsbeginn erfolgt eine Zellzählung und die gleichmäßige Aufteilung der Zellen auf Kulturplatten. Nachdem die Zellen adhärirt sind, wird unter dem Mikroskop nochmals überprüft, daß die Zellen auf allen Kulturschalen in gleicher Dichte und weder zu dicht noch zu dünn ausgesiedelt sind ($1-3 \times 10^5$ Zellen/10 cm Kulturschale). Die Apoptose wird durch Serumentzug induziert. Als Kontrolle dienen zum einen die parentalen Zellen und zum anderen die gleichen Zellen kultiviert in DMEM + Serum. Um die Zellen sowohl mit Serum als auch ohne Serum zu kultivieren, wird der Versuchansatz jeder Zelllinie für jeden Tag oder alternativ wenigstens für den letzten Versuchstag doppelt angesetzt.

Prozedere:

Für eine Versuchsreihe mit 4 Tagen ohne Serum werden pro Zelllinie mindestens 5 Kulturschalen unter gleichen Bedingungen angesetzt. Es ist anzumerken, daß die am Versuch beteiligten Zelllinien mit gleicher Dichte angesetzt werden. Nach 24 h wird das Medium der Kulturschale Tag 4 mit DMEM ohne Serum ausgetauscht. Nach 48 h wird das Medium der Kulturschale Tag 3 mit DMEM ohne Serum ausgetauscht. Analog wird mit den Proben Tag 2 und Tag 1 verfahren. Die doppelte Probe Tag 4_{Kontrolle} mit Serum bleibt über den gesamten Versuch erhalten. Am fünften Tag nach Versuchsbeginn erfolgt die Ablösung, Färbung und Messung der Zellen im FACScan.

3.4.1 Messung der Apoptose durch Annexin V

Annexin V gehört zur Familie der kalziumabhängigen Phospholipid-bindenden Proteine. Phosphatidylserin wird auf der zytosolischen Innenseite der Zellen exprimiert und während der Apoptose nach außen gekehrt. Auf apoptotischen Zellen bindet Annexin V Phosphatidylserin und inhibiert dessen prokoagulatorische und proinflammatorische Aktivität. Die Annexin V-Bindung ist ein sicherer Nachweis der Apoptose. Da Annexin V in folgendem Versuch mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE gekoppelt ist, läßt sich die Apoptose im FACScan quantitativ nachweisen.

Prozedere:

Nach Ablösung mit PBS/EDTA werden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen und im Zellcounter gezählt. Die Zellen werden in vorverdünnten Bindungspuffer mit einer Konzentration von $2-5 \times 10^5$ Zellen/ml aufgenommen. 195 µl Zellsuspension werden mit 5 µl

human Annexin V-PE (Bender Medsystems) vermischt und für 10 min. bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und im FACScan gemessen.

Bindungspuffer

10 mM Hepes/NaOH

pH 7,4

140 mM NaCl

2,5 mM CaCl₂

3.4.2 Messung der Apoptose und Zellzyklusanalysen durch Propidiumjodid im FACScan

Propidiumjodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in permeabilisierten Zellen durch die Kernmembran gelangt und sich dort in die DNA einlagert. Während der Apoptose kommt es zu einer DNA-Fragmentierung, welche durch das Propidiumjodid im FACscan (mit logarithmischer x-Achse) sichtbar gemacht werden kann. Weiterhin gibt die Markierung der DNA durch Propidiumjodid Aufschluß über die Zyklusphasen der Zellen (mit linearer x-Achse).

Prozedere:

Die Zellen werden mit PBS/EDTA abgelöst, bei 1200 rpm für 5 min. zentrifugiert und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisation und Fixation der Zellen werden 800 µl Ethanol 70% hinzugegeben und über Nacht bei -20°C gelagert.

2 µl Propidiumjodid-Stocklösung werden mit 200 µl PBS vermischt und 1 µl RNase A-Stocklösung hinzugefügt. Zunächst werden die Zellen wie oben zentrifugiert und anschließend mit 203 µl Propidiumjodid-Mix für 6 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS aufgenommen und im FACScan gemessen. Zur Analyse des Zellzyklus wird neben CellQuest auch ModFit-Software verwendet.

Propidiumjodid

Stocklösung 5 mg/ml in PBS

Endkonzentration 50 µg/ml in PBS/EDTA

RNase A

Stocklösung 5mg/ml in PBS

Endkonzentration 25 µl/ml in PBS/EDTA

3.5 Adhäsionstest

Einen Tag vor Versuchsbeginn werden Mikrotiterplatten mit je 100 µl Matrix-Protein pro well beschichtet und ü.N. bei 4°C gelagert. Die Beschichtung im Einzelnen besteht aus den Matrixproteinen Fibronectin, 20 µg/ml; Kollagen I, 100 µg/ml; Kollagen IV, 100 µg/ml gelöst in PBS. Die Ränder der Mikrotiterplatte werden frei gelassen. Die Proteinlösung wird entfernt und die Platte zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen und mit 100 µl 1% BSA 4 h bei 4°C blockiert.

Zwischenzeitlich werden die Zellen mit PBS/EDTA/0,1%Trypsin abgelöst, mit serumfreien Medium gewaschen, gezählt und 30 min in serumfreien Medium im Brutschrank inkubiert. Die Blockierlösung wird von der Mikrotiterplatte entfernt und zweimal mit je 200 µl PBS gewaschen. Pro Loch werden 100 µl Zellsuspension (5×10^4 Zellen) ausgesät und 60 min im Brutschrank inkubiert. Nach Entfernen der Zellsuspension wird die Platte „unter Klopfen“ viermal mit PBS gewaschen. Adhärente Zellen werden mit 200 µl 1% Glutaraldehyd/PBS für 30 min bei RT fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen erfolgt mit 200 µl Kristallviolett für 30 min bei RT auf dem Schüttler. Die Mikrotiterplatte wird so lange mit PBS gewaschen, bis die Leerkammern sauber entfärbt sind und 5-10 min an der Luft getrocknet. Die Zellen werden in 100 µl TritonX-100 0,2% über 30 min bei RT lysiert (bei 4°C würde Kristallviolett ausfallen). Die Blaufärbung ist ein Maß für die Anzahl der gebundenen Zellen und wird im ELISA-Reader bei 595 nm bestimmt.

Fibronectin

Stocklösung 1 mg/ml
in 0,001 % Essigsäure
Endkonzentration 20 µg/ml in PBS

Kollagen I

Stocklösung 1 mg/ml
in 0,001 % Essigsäure
Endkonzentration 100 µg/ml in PBS

Kollagen IV

Stocklösung 1 mg/ml in 0,001 % Essigsäure
Endkonzentration 100 µg/ml in PBS

Glutaraldehyd 1 % in PBS

Kristallviolett 0,1 % in PBS

Triton X-100 0,2 % in PBS