

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

<u>Amersham Pharma Biotec Inc.</u>	dNTP-Set GFX™ PCR DNA and Gel Bord Purification GFX™ Micro Plasmid Prep Restriktionsenzym-Puffer One Phor All Plus 10x
<u>Biolab</u>	Restriktionsenzym Pme I 10 000U
<u>Biorad</u>	Trans-Blot Transfer Medium
<u>Biotech</u>	Elektrophorese Power-Supply EPS 200
<u>Biozym</u>	Agarose DNA für NCA > 500bp Charge Nr.00243 Sequiterm EXCEL™ II Long Read™ DNasequencing Kit Fast-Link™-Ligase Kit
<u>Boehringer Mannheim</u>	Aqua Spül-Lösung Restriktionsenzym Bln I 200 U T4-Ligase 100 U
<u>Eurogentec</u>	Goldstar Taq- DNA-Polymerase
<u>Gibco® BRL</u>	Concert™ Rapid Gel Extraction System TE-Buffer
<u>Life Technologies</u>	Elektrophorese Power-Supply
<u>MBI Fermentas</u>	Loading Solution 6x Restriktionsenzym Bln II 2500 U Restriktionsenzym Nco I 500 U

Restriktionsenzym-Puffer γ -Tango™ mit BSA

Restriktionsenzym Xba I

Restriktionsenzym Mlu

Längenmarker Gene Ruler™ 1kb DNA-Ladder

Merck

Dichlordimethylsilon

Dimethylformamid (DMF)

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Ethanol

Ethylendiamintertraacetat (EDTA)

Glycin

Isopropanol

Magnesiumchlorid

Natriumchlorid

Natriumhydroxid

MWG Biotech

Primer für HRS 3 HC 5'

Primer für HRS 3 HC 3'

Primer für HRS 3 LC 5'

Primer für HRS 3 LC 3'

Primer für TNF 5'

Primer für TNF 3'

Quiagen

QUIAGEN Plasmid Mini Kit 100

QUIAEXX II Gel Extraction Kit

Roche Diagnostik

Restriktionsenzym-Puffer: H-Puffer

Restriktionsenzym Bam H 12500 U

Sartorius

Nitrocellulosefolie

Sigma Chemical Company

Agarose für DNA- Elektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS)

Ampicillin
 Bromphenolblau
 Ethidiumbromid
 Laurylsulfat (SDS)
 Isoamylalkohol

Stratagene

Universal Puffer

3.2. Puffer und Lösungen

Blaumarker und Ladepuffer für Agarosegele:

0,25 % Bromphenolblau
 0,25 % Xylenxyanol FF
 0,25 % Orange G
 1 mM EDTA
 40 % Sucrose
 • ad H₂O_{dest}

Laemmli-Laufpuffer:

144 g Glycin
 30,34 g TrisBase
 10 g SDS
 • ad 2000 ml H₂O_{dest}

Luria-Bertoni (LB)-Medium:

10 g Trypton
 5 g Yeast-Extrakt
 10 g NaCl
 • ad 1000 ml H₂O_{dest}; autoklavieren

LB-Agar:

10 g Trypton
 5 g Yeast-Extrakt
 10 g NaCl
 15 g Agar
 • ad 1000 ml H₂O_{dest}; autoklavieren
 • auf etwa 55°C abkühlen lassen
 • in Petrischalen gießen

Mini-P1- Resuspending-Buffer

100 mM EDTA
50 mM Tris pH 8
100 µg/ml RNase

Mini P2 – Lysis-Buffer

0,2 N (200 µl 10 M) NaCl
500 µl (10% Lösung auf 10 ml) 1%
SDS

Mini P3 – Neutralisation-Buffer

3 M NaAc pH 4,8

TBS-T 10x Stammlösung:

1000 ml 10x TBS + 5 ml Tween 20

SDS 2x Proteinprobepuffer:

0,6 ml Tris pH 6,0 1M
2,5 ml Glycerol 100 %
2,0 ml SDS 10 %
0,5 ml Bromphenolblau 2 %
• ad 3,9 ml H₂O dest

Coomassie-Farblösung:

1g Coomassie brillant Blue 2850
450 ml Methanol
450 ml Aqua dest.
100 ml Essigsäure

SOC-Nährmedium

10 g Bacto-Typtane
2,5g Bactoeast Extract
0,25g NaCl
5ml (1,88g in 100ml) KCl 250 molar
• ad 5N NaOH ca 0,1 ml auf pH 7,0
2,5 ml steriles MgCl₂ 2M
• ad 500ml H₂Odest; autoklavieren
10 ml Glucose 1 M

TAE 50x Stammlösung:

242 g TrisBase
57,1 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
• ad 1000 ml H₂O_{dest}; autoklavieren

TBS 10x Stammlösung:

87,8 g NaCl
60,0 g TrisHCl
14,0 g TrisBase
• ad 1000 ml H₂O_{dest}

TBE für Flureszenzsequenzierung

162 g Tris-Base
27,5 g Bor-Säure
50 ml 0,5 M EDTA
• ad 100 ml H₂O_{dest}

TENS-Mini-Puffer

1 ml 100x TE (1M)
1 ml NaOH (10M)
2,5 ml SDS 20%
• ad 100 ml H₂O_{dest}

3.3. Verwendete PCR-Primer

3.3.1. Primer für HRS 3 HC 3'

5' AGA-GGA-TCC-ACT-CAC-CTG-AGG-AGA-CGG-TGA-CCG-TGG-3'

3.3.2. Primer für HRS 3 HC 5'

5' CGG-CCA-TGG-CCC-AGG-TGC-AAC-TGC-AGC-A-3'

3.3.3. Primer für HRS 3 LC 5'

5' CCG-CCA-TGG-ACA-TCG-AGC-TCA-CTC-AGT-CT-3'

3.3.4. Primer für HRS 3 LC 3'

5' GAT-GGA-TCC -ACT-CAC-GTT-TGA-TTT-CGA-GCT-TGG-TGC-C-3'

3.3.5. Primer für TNF 5'

5' TAA-CCA-TGG-TCT-CAT-CTT-CTC-GAA-CCC-CGA-3'

3.3.6. Primer für TNF 3'

5' GAT-CTC-GAG-GGC-AAT-GAT-CCC-AAA-GTA-GAC-C-3'

3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen (Saiki et al., 1985). Man nutzt dabei die Eigenschaften von DNA-Polymerasen, die einen Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang polymerisieren können sofern ihnen ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Durch Zugabe von zwei Oligonukleotidprimern (sense und antisense), die zum 5'- bzw. 3'- Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, und der Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen (Wright et al., 1990) ist eine automatisierte Durchführung der PCR in programmierbaren Thermoblöcken möglich. Es kommt dabei in einem dreiteiligen in Zyklen repetitierten Reaktionsprozess aus Primeranlagerung, Kettenverlängerung und Denaturierung der DNA-Doppelstränge zur exponentiellen Vermehrung der gewünschten Sequenzen. Einhergehend mit der so erzielten hohen Sensitivität der PCR besteht jedoch auch eine Anfälligkeit für Kontaminationen mit der Konsequenz falsch positiver Ergebnisse durch das Verschleppen von DNA in den Reaktionsansatz. Geeignete Maßnahmen zur Kontaminationsprophylaxe sind deshalb die UV- Bestrahlung von PCR-Arbeitsplätzen, Vermeidung der Benutzung jeglicher DNA am PCR-Arbeitsplatz und Verwendung von Pipettenspitzen mit Filtereinsatz zum Schutz vor Aerosol-Kontamination (Higuchi et al. 1989).

PCR-Untersuchungen wurden nach bekannten Standardprotokollen durchgeführt. Eine Etablierung der PCR auf die einzelnen Klone erfolgte dabei durch Variieren von Zyklenzahl und Annealingtemperatur. Der Prototyp des Ablaufes der PCR-Reaktion war dabei wie folgt:

1. 94°C/2 Min. (Denaturierung)
2. 55-70°C/1 Min. (Annealing; Temperatur abhängig vom GC-Gehalt der Primer)
3. 72°C/2 Min. (Elongation)
4. 94°C/1 Min. (Denaturierung)
5. zurück zu Schritt 2 und Wiederholung des Ablaufes für 35-40 Zyklen
6. Schritt: 8 Min. bei 72°C (Endelongation)
7. 4°C/∞

3.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Bei DNA-Fragmenten handelt es sich meist um Fragmente, die entweder durch einen Restriktionsenzymverdau oder durch PCR-Amplifikation hergestellt werden. Sie liegen nach Auftrennung des jeweiligen Reaktionsansatzes im Agarosegel als Einzelbande vor und müssen aus dem Gel isoliert werden. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte unter Verwendung des Qiaex II-Kits bei dem das Gelstück mit der gewünschten Bande in einem Puffer mit einer hohen Salzkonzentration aufgelöst und die DNA dabei an ein Austauscherharz gebunden wird. Nach mehreren Waschschrritten erfolgt die Elution der DNA aufgrund der geringen Salzkonzentration des verwendeten bidestillierten Wassers. Die Durchführung der Methode erfolgte nach den Protokollangaben des Herstellers.

3.6. DNA-Ligation

Das Ligieren dient dem Einsetzen eines DNA-Stücks in einen DNA Vektor. Sowohl das DNA-Bruchstück (Insert) als auch der Vektor wurden zuvor mit komplementären Restriktionsenzymen geschnitten, so dass sowohl die Enden des Inserts als auch das Ende des aufgeschnittenen Vektors komplementär überlappen. Ligasen können durch eine 3',5'-Phosphodiesterbindung die Zucker der endständigen Basen verbinden und so den Vektor zum vollständigem Plasmid vereinigen.

3.7. Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien

E. coli Bakterien, die mit kaltem Kalziumchlorid (CaCl_2) behandelt und anschließend kurz erwärmt werden, sind in der Lage Plasmid-DNA aufzunehmen (COHEN et al.; 1972). Auf diese Weise gelingt es, Plasmide zur Expression in prokaryontische Zellen einzuschleusen oder durch Expansion des entsprechenden Bakterienklons massiv zu vermehren. Mit Ligationsansätzen transformierte Bakterien werden dazu auf Agarplatten ausgestrichen, unter Selektion aufwachsende Kolonien gepickt und bezüglich der im Plasmid enthaltenen Inserts analysiert.

100 µl kompetente Bakterien werden mit 1-3 µg Ligationsansatz oder Plasmid 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach einminütiger Erwärmung bei 42°C und direkter Abkühlung (4°C) gibt man 450 µl LB-Medium hinzu und schüttelt 1 h bei 37°C. 100-300 µl des Ansatzes werden dann auf Agarplatten mit Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.8. Anfertigung von Glycerolstocks

Durch das Anfertigen von Glycerolstocks ist es möglich, einzelne native Bakterien, aber auch Bakterientransfektanten, die ein bestimmtes Insert enthalten, über mehrere Jahre zu lagern. Hierzu wird ein Aliquot einer frischen Bakterienkultur mit 40 Vol% Glycerol versetzt und dann bei -80°C eingefroren.

3.9. Plasmid-Präparationen

Die verschiedenen Verfahren der Plasmid-Präparationen dienen dazu, Plasmid-DNA ohne Anteile von RNA oder chromosomaler DNA aus den Bakterien zu isolieren und diese so für die weiteren Verfahren wie Restriktionsenzymverdau, PCR oder Sequenzierung zur Verfügung zu haben. Dabei unterscheiden sich die Präparationen in Ausbeute und Reinheit der gewonnenen Plasmid-DNA.

3.9.1. Plasmid-Mini-Boiling-Prep

Die Plasmid-Mini-Boiling-Präparation ist eine schnelle Methode mit einer hohen Ausbeute, bei der jedoch die erhaltene Plasmid-DNA eine geringe Reinheit aufweist und deshalb für die Sequenzierung nur bedingt geeignet ist. Hier werden durch Einsatz von SDS und Lysozym Zellmembranen und Proteine hydrolysiert und hochgenomische DNA unter alkalischen Bedingungen hitzedenaturiert (HOLMES und QUIGLEY, 1981).

Eine einzelne Bakterienkolonie, die mit einem das gewünschte Insert tragenden Konstrukt transformiert ist, wird über Nacht in 3 ml LB-Selektionsmedium bei 37°C auf einem Schüttler bis in die exponentielle Wachstumsphase kultiviert. Die Bakterien werden bei 8000 rpm/3 min pelletiert, in 200 µl STETL-Lösung resuspendiert und anschließend 30 sec im Wasserbad gekocht. Nach Abschrecken auf Eis werden Proteine, Zelldetritus und die hochgenomische DNA bei 4°C/12000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert, das Pellet mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und aus dem verbliebenen Überstand durch Zugabe von 200 µl Isopropanol und anschließende Zentrifugation bei RT/12000 rpm/15 min die Plasmide gefällt. Nach Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol und vollständigem Trocknen erfolgt eine Aufnahme desselben in 20 µl Puffer (P1 + RNase). Die Konzentration der so erhaltenen Plasmid-Präparation kann dann photometrisch bestimmt werden.

3.9.2. Plasmid-Mini-Präp nach Qiagen

Die Methode der Plasmid-Mini-Präp nach Qiagen ist zwar in der Ausbeute dem oben geschilderten Verfahren unterlegen, liefert dabei aber hochreine, nicht alkalisch denaturierte und damit gut sequenzierfähige Plasmid-DNA.

Bei diesem Verfahren (BIRNBOIM et al., 1975) erfolgt die Lyse der Bakterien in einem alkalischen, SDS haltigen Puffer P2 unter Anwesenheit von RNase (Puffer P1). SDS solubilisiert Phospholipide und Proteine der Zellmembran und führt dadurch zur Freisetzung der Zellbestandteile. NaOH denaturiert sowohl Proteine und hochgenomische DNA, als auch die Plasmid-DNA. RNase führt zur Zerstörung der freiwerdenden RNA. Bei genauem Einhalten der kritischen Lysezeit kommt es bei Neutralisierung mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration (Puffer P3) zur Ausbildung von Präzipitaten aus SDS, denaturiertem Protein, hochgenomischer DNA und Zellebris, wobei die korrekt renaturierte Plasmid-DNA in Lösung verbleibt und nach Zentrifugation als Überstand abgenommen werden kann. Eine Aufreinigung des Überstandes erfolgt dann über eine nur die Plasmid-DNA bindende voräquilibriumierte Säulenmatrix, wobei Reste von RNA und Proteinen mit einem Waschpuffer ausgewaschen werden. Die eluierte Plasmid-DNA wird dann mit Isopropanol gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, nach Lufttrocknung in TE-Puffer aufgenommen und kann dann zur Sequenzierung verwendet werden.

Die Durchführung der Methode erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers des QIAGEN Plasmid Mini Kits. Auf diese Weise wurden Mini- beziehungsweise Midi-Präparationen mit einem Ertrag von 20-100 µg hochreiner sequenzierfähiger Plasmid-DNA aus 3-100ml Bakterienkultur durchgeführt.

3.10. DNA Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung der Klone erfolgte nach der Didesoxynukleotidmethode, die erstmals von Sanger (SANGER et al., 1977) beschrieben wurde. Diese Methode basiert darauf, daß 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) zwar über ihre 5'-Triphosphatgruppe in eine neue Nukleinsäurekette eingebaut werden können, eine weitere Verlängerung der Kette jedoch aufgrund des Fehlens der OH-Gruppe in 3'-Position der Desoxyribose nicht möglich ist und es so zum Kettenabbruch kommt („Stoppnukleotide“). Erstellt man nun einen Reaktionsansatz aus zu sequenzierendem Template, Primer, DNA-Polymerase, ddNTPs und Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs), kommt es bei einer geeigneten Temperatur zunächst zur Anlagerung des Primers an die komplementäre Region des Templates („Annealing“). Anschließend erfolgt durch die DNA-Polymerase ein Anbau von dNTPs am 3'-Ende des Primers mit Verlängerung der Kette; bei Einbau eines ddNTPs kommt es jedoch zum Kettenabbruch. Über das Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs kann man die Wahrscheinlichkeit des Abbruchs einer in der Verlängerung befindlichen Kette beeinflussen. Man erhält deshalb durch exakte Einhaltung eines definierten Verhältnisses von dNTPs zu ddNTPs am Ende der Reaktion ein Gemisch aus vielen verschiedenen Oligonukleotiden, die sich in ihrer Länge jeweils um genau eine Base unterscheiden, da für jede Position dieselbe Wahrscheinlichkeit eines Kettenabbruches besteht. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer läßt sich dann, nach Auftrennung des Reaktionsgemisches in einer hochauflösenden Gelelektrophorese, die genaue Nukleinsäuresequenz ermitteln.

Alle Sequenzreaktionen wurden mit dem Sequitherm Excel Long-Read LC-Kit durchgeführt. Zur Durchführung der Sequenzreaktion verteilt man zunächst 2µl der vier verschiedenen ddNTPs (G,A,T,C) auf Reaktionsgefäße. Ein Mastermix aus 1µg Template, 2 pmol Primer, 5 µl 5xPuffer BA, 2.5 µl 10xPuffer BB und 1 µl Polymerase wird mit bidestilliertem Wasser auf 17 µl aufgefüllt. Jeweils 4 µl dieses Mixes werden zu den verschiedenen Stoppnukleotiden

gegeben, mit einem Tropfen Paraffin überschichtet und in einem Thermocycler folgende Sequenzreaktion durchgeführt:

1. 94°C/2 min (Denaturierung)
2. 55-70°C/1 min (Annealing; Temperatur abhängig von GC-Gehalt des Primers)
3. 70°C/1 min (Elongation)
4. 94°C/1 min (Denaturierung)
5. Schleife von 4 an 2; 30 Zyklen
6. 4°C/∞

Jede Reaktion wird mit 3 µl Stoppuffer gestoppt und das Reaktionsgemisch nach einer erneuten Denaturierung (70°C/5 min) auf ein Elektrophoresegel aufgetragen. Zur Herstellung des hochauflösenden Polyacrylamidgels wurde der Sequagel-XR-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers für ein 0,25 mm dickes Gel verwendet und mit jeweils 1 µl der verschiedenen Reaktionsansätze beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 1500 V/50 W in TBE-Laufpuffer über 8-10 Stunden in einem automatischen Sequenzierapparat (LICOR DNA 4000L). Die Auswertung des Polyacrylamidgels wurde unter Verwendung der LICOR-Software durchgeführt.

3.11. Bearbeitung der Sequenzen

Die erhaltenen Sequenzen mit dem Softwareprogramm DNASIS (Pharmacia Biotechnologie) bearbeitet. Sequenzabgleiche mit bereits bekannten Sequenzen und Chromosomenmapping erfolgten über BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) an den Sequenzdatenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information; Bethesda; USA).

3.12. Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE

SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld (LAEMMLI 1970). Voraussetzung sind dabei Bedingungen unter denen die Dissoziation der Proteine in die einzelnen Polypeptide und Linearisierung gewährleistet ist. Nach Hitzedenaturierung und Verwendung reduzierender Agenzien binden die denaturierten

Polypeptide das stark anionische Detergenz SDS und werden so negativ geladen. Weil die Menge des gebundenen SDS proportional zum Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptids ist (SHAPIRO et al., 1967), wandern die SDS-Polypeptid-Komplexe bei der Elektrophorese nun in Abhängigkeit von der Größe des Polypeptids unterschiedlich weit im Polyacrylamidgel, so daß eine Auftrennung der unterschiedlichen Polypeptide möglich ist. Die Verwendung von Zwei-Phasen-Gelen, mit Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptidkomplexe in einem möglichst kleinen Volumen in einem oberen Gelabschnitt („stacking gel“) und Auftrennung dann im unteren Gelabschnitt, erhöht dabei die Auflösung der Gele (KING und LAEMMLI 1971). Zur Durchführung werden nach Standardprotokollen SDS-Polyacrylamidgele gegossen, mit gleichen Mengen der denaturierten Proteine (5 min/100°C) geladen und die Elektrophorese unter Verwendung eines Tris-Laufpuffers (Laemmli-Puffer) bei 200V/40min durchgeführt.

3.13. Western-Blot

Im Semi-dry-Verfahren (TOWBIN et al., 1979) werden das 10 min in Western-Blot-Transferpuffer äquilibrierte SDS-Gel und die Nitrocellulosemembran zwischen einigen Lagen puffergetränkter Filterpapiere direkt aufeinandergelegt und zwischen den Elektrodenplatten platziert. Beim Anlegen einer Spannung (21 V/20 min) wandern die negativ geladenen Proteine dann im elektrischen Feld Richtung Anode zur Membran und werden dort gebunden.

3.14. Immunologischer Nachweis von Proteinen

Zur Detektion spezifischer Proteinbindungen wird die Nitrocellulosemembran zunächst eine Stunde in 5 %Milch/TBS geblockt, anschließend eine Stunde mit dem primären und schließlich für eine Stunde mit dem AP-konjugierten sekundären Antikörper bei RT inkubiert. Die Antikörper sind in 0,5%Magermilchpulver/TBS geeignet verdünnt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wird die Membran jeweils 3x2 min in TBS gewaschen. In der Färbelösung des AP-Substrat-Kits erfolgt die Entwicklung bei Raumtemperatur bis zur ausreichenden Intensität der braun-violetten Anfärbung spezifischer Antikörperbindungen.

3.15. Zellkultur

Die für die Immunglobulin-Expression verwendete CHO-Zelllinie wurde bei 37°C und einem Kohlendioxidanteil von 5 % in RPMI 1640-Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Zur Vermeidung einer bakteriellen Kontamination wurden Penicillin und Streptomycin in einer Endkonzentration von 50 U/ml zugesetzt.

3.16. Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektionen eukaryontischer Zelllinien wurden mit Superfect Transfection Reagent (Qiagen; Hilden) durchgeführt. Dabei bildet der im Transfektionsreagenz enthaltene aktivierte Dendrimer dichtgepackte, positiv geladene Komplexe mit der zu transfizierenden DNA, die über negativ geladene Rezeptoren in die Zelle gelangen und dann als intakte DNA-Moleküle in den Kern transportiert werden. Durch Pufferung und Hemmung der pH-abhängigen Funktion lysosomaler Nukleasen bleibt die Stabilität der Superfect-DNA Komplexe gewährleistet.

Um die zu transfizierende adhärente Zelllinie in der logarithmischen Wachstumsphase zu transfizieren, sät man diese 24 Stunden vor Transfektion in einer Dichte von 50-70 % Konfluenz aus. Zur Transfektion werden 2,5-10 µg DNA 1:2 bis 1:10 mit dem Transfektionsreagenz in serumfreiem Medium gemischt und nach zehnmütiger Komplexbildung auf $1-8 \times 10^5$ Zellen gegeben. Nach 3-6 stündiger Inkubation wird das Transfektionsreagenz entfernt. Die Zellen werden dann gründlich mit PBS gewaschen und in Vollmedium überführt. Eine Expression des transfizierten Gens findet sich bei optimalen Bedingungen in 70-80 % der Zellen 12-16 Stunden nach Transfektion.

3.17. Transiente Genexpression mit HEK 293-EBNA-Zellen

Das transiente Expressionssystem ermöglicht eine schnelle Herstellung kleiner Mengen an rekombinantem Protein. Dabei wird zur Transfektion eine optimierte Calciumphosphat-Präzipitationsmethode verwendet (CHEN and OKAYAMA, 1987; WIGLER et al. 1977, Meissner et al., 2001). Für das optimierte Expressionssystem müssen der pEAK-8-Vektor

HEK293 EBNA-Zellen verwendet werden, da die Expression von EBNA1 (Invitrogen) zur intrazellulären Replikation von oriP-basierenden Plasmiden führt (Yates et al., 1985). Die Suspensionszelllinie wächst unter serumfreien Bedingungen in Rührflaschen („spinner flasks“) mit dem speziellen Medium EX-CELL VPro (SAFC Biosciences) und 6 mM L-Glutamin.

Zur transiente Transfektion wird ein Mediumwechsel auf DMEM/F12 Medium (Life Technologies) durchgeführt, welches ergänzt wird mit 29 mM Natriumbikarbonat, 10mM HEPES, 2,5 mg/l humanes Transferrin, 2,5 mg/l Insulin, 0,1 mM Diethanolamin, 0,1 mM L-Prolin und 1% FCS. Der Transfektionsansatz besteht pro Milliliter Medium aus 2,5 µg DNA, 50 µl 250 mM CaCl₂ und 50 µl HEPES-Phosphat-Puffer (1,4 mM Phosphat in 50 mM HEPES und 280 mM NaCl) sowie 5x10⁵ Zellen und kann beliebig nach Bedarf, Flaschengröße oder verfügbarer DNA-Menge dimensioniert werden. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wird EGFP-Plasmid (ca. 2,5% der Gesamt-DNA-Menge) kotransfiziert. Die DNA wird im entsprechenden Volumen der CaCl₂-Lösung aufgenommen. Anschließend wird das gleiche Volumen HEPES-Phosphat-Puffer hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von exakt 1 Minute bei Raumtemperatur wird der Mix schnell zur Zellsuspension gegeben. Das Einhalten der Minute ist ein wichtiger Faktor für die Größe der sich bildenden DNA-Calciumphosphatpräzipitate. Etwa 12-16 Stunden später wird zum gesamten Transfektionsansatz das gleiche Gesamtvolumen frisches Medium hinzugefügt, um eine Auflösung der Präzipitate zu erleichtern, da diese sonst bei zu langer Verweilzeit im Ansatz zu Zellschäden führen. Nach einer entsprechenden Expressionszeit (abhängig vom exprimierten Protein 4-10 Tage) kann der Überstand mit enthaltenem Protein (CD30-TNF-Antikörper) gewonnen werden.

3.18. Durchflusszytometrie (FACScan®)

Die Durchflusszytometrie hat gegenüber der konventionellen Immunzytochemie den Vorteil, dass vitale Zellen getestet werden, die keine Veränderung ihrer antigenen Eigenschaften durch Fixation erfahren haben. Ferner ermöglicht die Durchflusszytometrie eine Objektivierung und Quantifizierung der Testergebnisse, da sie die Untersuchung einer ausreichend großen Menge an Zellmaterial in kürzester Zeit spezifisch ihrer Antigenität bzw. Antikörper bezüglich ihrer Bindungseigenschaften ermöglicht.

Zur Durchführung einer FACS-Durchflusszytometrie müssen zunächst die Zellen mit verschiedenfarbigen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, die dann später im Gerät bei 488 nm zur Lichtemission angeregt werden. Photodetektoren registrieren selektiv die verschiedenen emittierten Lichtimpulse. Spezifische Filter für die einzelnen Farbstoffe lassen nur das Licht passieren, das charakteristisch für die einzelnen Farbstoffe ist. Diese charakteristischen Emissionsbereiche liegen für Fluoreszin bei 530 nm, für Phycoerythrin bei 585 nm und für Propidiumjodid bei 650 nm. Das aufgefangene Emissionssignal erreicht dann über vier Dekaden logarithmische Verstärkung und wird als Zählimpuls registriert (Parks et al., 1986).

3.19. Indirekte Immunfluoreszenz im FACS

Die zu testenden Zellen wurden zunächst bei 4 °C (zur Vermeidung der Internalisierung der gebundenen Antikörper) auf eine Konzentration von $4 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ / ml eingestellt und je 1 ml dieser Zellsuspension in ein FACScan®-Teströhrchen pipettiert. Nach dem Waschen der Zellen mit Puffer (PBS + 0,1% Na-Acid., pH 7.4) wurden 100 µl Antikörperlösung in genannter Konzentration zugegeben. Nach Inkubation (4 °C , ca. 60 Min.) und Zugabe von 100 µl sekundärem fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen Fc oder Fab-Fragmente (von uns verwendet) des primären Antikörpers wurde das Gemisch für weitere 60 Min. bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität und Häufigkeit.