

Zellbiologisches Praktikum WS 2023/24

Studiengang: Biosystemtechnik

Termin: 04.03.24 – 08.03.24

Ort: Institut für Experimentelle Innere Medizin
Campus der Medizinischen Fakultät, Haus 5

Wissenschaftliche Leitung: Prof. Dr. T. Kähne

Technische Betreuung: Y. Ducho

Themen:

Behandlung von T-Lymphozyten (Jurkat) mit Peroxivanandat (Tyrosinphosphatase-Inhibitor) und Analyse des lipid raft-Proteoms

- Zellkultur
- Behandlungskinetik
- Lipid raft-Gewinnung durch Dichtegradienten-Zentrifugation
- Elektrophorese, Western Blot, Chemolumineszenz
- miniaturisierte biochemische Trennverfahren
- massenspektrometrische Analyse des Phosphoproteoms in lipid rafts
- massenspektrometrische Analyse des lipid raft- Proteoms

Relative Quantifizierung durch MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie

- Verdau eines Musterproteins
- Isotopenmarkierung mit zwei unterschiedlichen iTRAQ-Labeln
- Herstellung von verschiedenen Mischungsverhältnissen
- experimentelle Bestimmung der Mischungsverhältnisse durch MALDI-TOF/TOF

Inhaltsverzeichnis

Peroxivanadat-Behandlung von Jurkatzellen	3
Ansetzen des Lysepuffers und der Lösungen für den Dichtegradienten	4
Behandlung von Jurkatzellen mit Peroxivanadat	5
Zellernte	5
Zellyse und Dichtegradientenzentrifugation.....	6
Fraktionierung des Dichtegradienten	7
Vorbereitung der lipid-rafts für die MS-Analytik	7
Phosphopeptidseparation / nano-LC-ESI-Massenspektrometrie	8
SCX-Fraktionierung / nano-LC-ESI-Massenspektrometrie	9
Analytik des Experiments	11
Verdaukontrolle durch SDS-PAGE	11
Qualitätskontrolle der lipid-raft Separation durch SDS-PAGE und Western Blot	16
Relative Quantifizierung durch MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie	24
Proteinverdau.....	25
Isotopenmarkierung	26
Probenreinigung	26
MALDI-TOF/TOF-Analyse	27
Anhang I	28
Theoretische Erläuterungen.....	28
Eukaryotische Zellkultur.....	28
SDS-Elektrophorese.....	31
Western Blot	33
Immunologische Detektion.....	34
Quantitative Proteomics – iTRAQ-Markierung	35
Anhang II	37
Richtlinien für die Erstellung des Praktikum-Protokolls.....	37
Sicherheitsdatensätze der verwendeten Chemikalien.....	38

Praktikumsaufgabe Teil 1: Peroxivanadatbehandlung von Jurkatzellen

Ziel des Experimentes:

Peroxivanadat ist ein effektiver und irreversibler Inhibitor von Tyrosinphosphatasen. Durch die Behandlung von humanen Jurkatzellen mit diesem Inhibitor kommt es zu einer schnellen Akkumulation tyrosinphosphorylierter Proteine, was teilweise die physiologische Aktivierung von humanen T-Zellen simuliert. Dadurch sollten sich Proteine verschiedener Signalwege unter anderem selektiv in lipid rafts organisieren.

Ziel der Experimente ist die Bestimmung von qualitativen Veränderungen des lipid raft Proteoms im zeitlichen Verlauf der Inhibitorwirkung sowie die Identifizierung von aktivierungsabhängigen Phosphorylierungen lipid raft lokalisierter Proteine.

Jeder Praktikumssteilnehmer ist für die Stimulation einer ausreichenden Menge von Jurkatzellen für **einen** Zeitpunkt verantwortlich. Für die Generierung einer Stimulationskinetik sind folgende Zeitpunkte vorgesehen: 0 min, 10 min, 20 min und 30 min.

Materialien:

- PBS (mit Calcium und Magnesium)
- Lysepuffer pH 7,4 (einige der Komponenten sind reizend, giftig oder gesundheitsschädlich!)
- Jurkat-Zellen
- Pipetten, Pipettenspitzen, Falcon-Tubes
- 1,5ml-Eppendorf-Tubes (beschriftet)
- Abfallbecher (flüssiger Abfall ist zu sammeln!!!)

Geräte:

- Pipetten, Pipettierhilfe (pipetboy)
- Mikroskop
- Sterilwerkbank
- Zentrifuge (vorgekühlt auf 4°C)
- Eisbad

Durchführung:

1. Ansetzen des Lysepuffers und der Lösungen für den Dichtegradienten:

Lysepuffer pH 7,4

Die meisten eukaryotischen Zellen können mit Detergenzien aufgeschlossen werden. Dabei wird die Zellmembran solubilisiert und zytosolische und Membranproteine können in Lösung gehen.

Für die Gewinnung von lipid rafts wird die besondere Resistenz dieser Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Membrandomänen gegenüber speziellen nichtionischen Detergenzien ausgenutzt. Während nicht-lipid raft Domänen weitgehend zerstört werden, bleiben Caveolae, lipid rafts und andere „Spezialformen“ biologischer Membranen intakt und können durch biochemische Verfahren abgetrennt werden.

Zusammensetzung:

Komponente	Endkonz.
Tris Base; reizend!	50mM
EDTA; reizend!	5mM
Natriumchlorid (NaCl)	100mM
Na-Vanadat (Na_3VO_4); reizend	1mM
Na-Fluorid (NaF); giftig!	50 mM
PMSF oder AEBSF; giftig!	1 mM
Na-Pyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$); reizend!	10 mM
Brij 58 (Detergenz)	3,0% (w/v)

Der Lysepuffer ist auf Eis bzw. bei 4°C aufzubewahren.

Dichtegradientenlösungen:

MNE-Puffer, pH 6,5

Zusammensetzung:

Komponente	Endkonz.
MES	25 mM
EDTA; reizend!	5mM
Natriumchlorid (NaCl)	150mM
Lösung 80% Saccharose	0,8g/ml MNE
Lösung 30% Saccharose	6 ml 80% Saccharose / 10 ml MNE
Lösung 5% Saccharose	0,5ml 80% Saccharose / 7,5 ml MNE

2. Behandlung von Jurkatzellen mit Peroxivanadat:

Zu Demonstrationszwecken wird der Betreuer beispielhaft das generelle Vorgehen an einer Zellkulturflasche demonstrieren. Dieses Experiment sollte dem eigentlichen Stimulationsexperiment direkt vorausgehen, um den Studenten das methodische „know-how“ zu vermitteln.

Peroxivanadat ist sehr giftig und wird vom Betreuer kurz vor Beginn der Arbeiten durch die Behandlung von Natrium-orthovanadat mit 30%igem Wasserstoffperoxid hergestellt.

(pro ml Medium werden benötigt: 10µl Na-orthovanadat (100 mM) + 1µl Wasserstoffperoxid (30%) für 2 min bei Raumtemperatur reagieren lassen)

Laborbereich Souterrain:

- Zellen pro Zellkulturflasche zählen
- alle vorhandenen Jurkatzellen in 4 Aliquots aufteilen (min. 100 Mio Zellen, max. 175 Mio Zellen/Aliquot)
- finale Aliquots in 50 ml Medium aufnehmen /vorsichtig resuspendieren (Falcon Tube)
- Zellaliquots im derart berechnetem Abstand mit Peroxivanadate versetzen, dass alle Stimulationsproben zum gleichen Zeitpunkt beendet werden

3. Zellernte:

Laborbereich Souterrain:

- Zellen zentrifugieren (500 x g, 5 min)
- Zellkulturmedium abnehmen, in Abfallbehälter pipettieren
- Zugabe von 50 ml PBS
- Resuspendieren und erneut zentrifugieren
- Waschschrift 2x wiederholen
- Sedimentierung der Zellen durch Zentrifugation bei 500 x g, 5 min
- Überstand verwerfen

!!! Sämtlicher Flüssigabfall wird in einem Abfallbehälter aufgenommen!!!

!!! Der Feststoffabfall wird in den bereitgestellten Abfallbehältern gesammelt und dann in den Autoklavierabfall (Tonne) gegeben!!!

4. Zellyse und Dichtegradientenzentrifugation:

- Zellpelett mit 1 ml Lysispuffer versetzen
- 10 sec vortexen, auf Eis stehen lassen, zwischendurch vortexen
- an dieser Stelle wird gewartet, bis alle Proben auf dem gleichen Verarbeitungsstand sind!

- **zwischenzeitlich erfolgt die Demonstration des Homogenisierens**

- Normierung der Volumina entsprechend der Zellzahlbestimmung
- Lysat in Homogenisator überführen, auf Eis
- Zugabe von 1 ml eiskalter 80% Saccharose
- 10x homogenisieren, auf Eis
- Lysat in Beckmann Polyallomer Centrifuge Tubes (½x 2 inch) überführen

Weitere Durchführung erfolgt im MS-Bereich im Keller:

- Lysat mit 2x 1 ml eiskalter 30% Saccharose vorsichtig überschichten
- nachfolgend mit 1 ml eiskalter 5% Saccharose vorsichtig überschichten
- Röhrchen vorsichtig in Swing-out-Einsätzen platzieren
- bei Swing-out auf Nummerierung der Einsätze und der dazugehörigen Deckel achten
- Positionen der Proben notieren!
- mit 5% Saccharose (5 + 30% Saccharose frisch herstellen) die Röhrchen austarieren
- starten des Zentrifugationsvorgangs:
 Ultrazentrifuge : ->Prog -> 1 / 50.000 U/min / 20h / 4°C / ohne Bremse

Hinweise:

- die durchschnittliche Zentrifugalbeschleunigung beträgt etwa 100.000 x g
- die Geschwindigkeit der Zentrifugenröhrchen erreichen den Überschall-Bereich, daher ist die Zentrifugation im Vakuum erforderlich
- keine Feuchtigkeit am Rotor hinterlassen – erschwert das Erreichen des Vakuums!

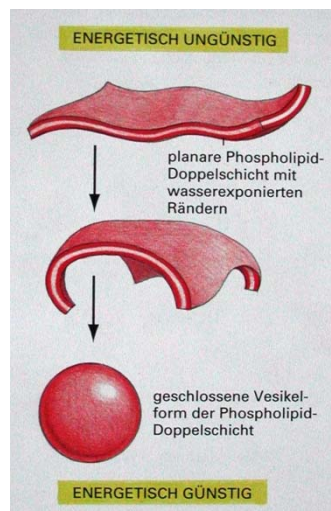
5. Fraktionierung des Dichtegradienten:

Achtung: Hier unbedingt die Hinweise der Betreuer beachten!!!!

- sichtbare Ringe mit Insulin-Spritze bzw. Fraktionen zu je 400 µl entnehmen und in beschriftete 1,5 ml Tubes überführen
- Fraktionen auf Eis für die Weiterverwendung aufbewahren
- 20 µl Aliquots aller Fraktionen entnehmen, mit 5 µl SDS-Probenpuffer versetzen und für 5 min bei 95°C erwärmen
- Weiterverwendung für SDS-PAGE und Western Blot zur Qualitätskontrolle

6. Vorbereitung der lipid raft-Fraktion für massenspektrometrische Analytik:

- 4fache (v/v) Verdünnung der lipid raft Fraktion mit MN-Puffer (150 mM NaCl, 25 mM MES, pH 6,5)
- Ultrazentrifugation 166000 x g , 2h, 4°C (Beckmann, Swing out-Rotor)
- Überstand vorsichtig entfernen
- RAFTs sind im Pellet!
- Solubilisierung des Pellets in 100 µl 200 mM Na₂CO₃, pH 11.0
 - die Wahl des sehr basischen pH Wertes führt zu einer weitgehenden Öffnung der sich spontan bildenden Vesikel und ermöglicht somit der Protease (Trypsin) den Zugang zu den extramembranösen Domänen integraler Membranproteine von beiden Seiten des lipid Bilayers!
- 5x scheren (Spritze, 27G Kanüle)
- 2h auf Eis stehen lassen

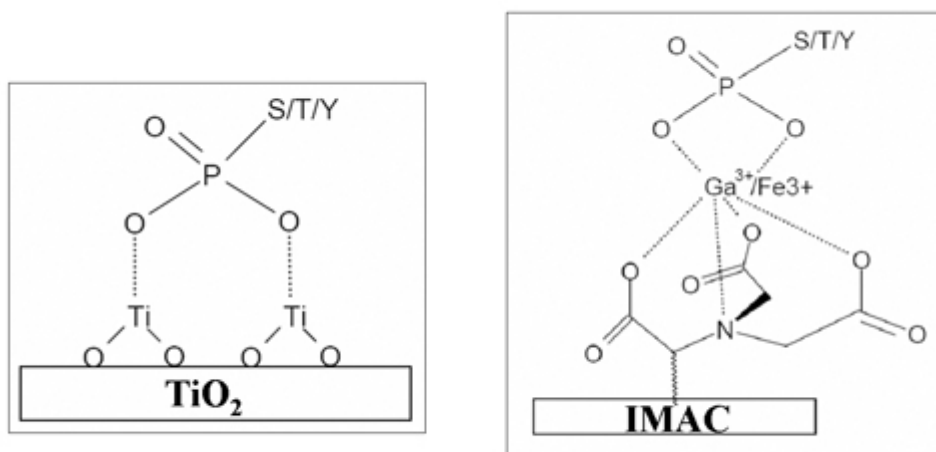


- Reduktion der Cysteinseitenketten mit 5 mM DTT, 1h, RT
- Alkylierung reduzierter Cysteine mit 15 mM Iodoacetamid, 30 min. RT, dunkel (Carbamidomethylierung)
- Probenaliquot (10% des Gesamtvolumens) für Verdau-Kontrollgel
- Verdau mit 2,5 µg Trypsin Gold (PROMEGA), über Nacht, 37°C
- Probenaliquot (10% des Gesamtvolumens) für Verdau-Kontrollgel

7. Phosphopeptidseparation mit Titansphere TiO₂ 5 μm:

Das Prinzip der Anreicherung Phosphatgruppen-tragender Peptide basiert auf den koordinierenden Eigenschaften (Chelatbildung) mehrwertiger Metallionen. Diese ermöglichen als „Brücke“ die Bindung der Peptide an einer speziellen Matrix. IMAC steht für „immobilized metal ion affinity chromatography“. Bei der Nutzung von Titandioxid ist das koordinierende Metall-Ion gleichzeitig als extrem wasserunlösliches Oxid auch die Matrix. Durch die Änderung des pH-Wertes von stark sauer in den stark basischen Bereich werden die drei Dissoziationsstufen der Phosphatgruppe übersprungen und damit der Verlust der negativen Ladung der Gruppe erzielt. Dieses führt dann zur Elution phosphorylierter Peptide.

Stark saure Peptide (Glutamat- und Aspartat-reich) können ebenfalls an den Metallionen binden und somit als „falsch positive“ Phosphopeptide angereichert werden. Daher kann erst nach der MS-Analyse über das tatsächliche Vorhandensein einer oder mehrere Phosphatgruppen am Peptid entschieden werden.



- Peptide müssen unbedingt auf pH3 gebracht werden → daher nachfolgende Umpufferung/Reinigung zwingend erforderlich:
- 3M Empore Universal Resin SPE Säule äquilibrieren mit 2 ml MeOH
- waschen mit 5 ml 0,1% TFA
- Peptide in 2 ml 0,1 % TFA in 3M geben
- waschen mit 5 ml 0,1% TFA
- 3 x 200 μl 70 % ACN/ 0,1 % TFA eluieren
- in SpeedVac partiell eindampfen
- TiO-Affinität:
- winzige Spatelspitze TiO-Beads (4 mg/ mg Protein)
- äquilibrieren mit 50 μl 80% ACN / 2,5% TFA
- Peptide in 150 μl 80% ACN / 2,5% TFA
- Beads zu Sample geben, 1h RT, rotierend (z.B. Miltenyi-Micromacs-Rotator)
- 16000xg / 1'
- **ÜS = non-Phospho-Peptide -> AUFHEBEN !!!!! weiterverwenden für MS!!!**
- Waschen der Beads:
- 100 μl 80% ACN / 2,5% TFA 1' RT, vortexen 16000xg / 1'
- 100 μl 80% ACN / 2,5% TFA 1' RT, vortexen 16000xg / 1'

- 100 µl 80% ACN / 0,1% TFA 1` RT, vortexen 16000xg / 1`
- 100 µl 80% ACN / 0,1% TFA 1` RT, vortexen 16000xg / 1`
- 100 µl 0,1% TFA 1` RT, vortexen 16000xg / 1`
- 100 µl 0,1% TFA 1` RT, vortexen 16000xg / 1`

- Elution der Beads:
- in neues Tube 10 µl 10% TFA vorlegen
- Beads 3x + 15 µl 400 mM NH₄OH / 30 % ACN 5`RT,vortexen16000xg / 1`
- Eluat in SpeedVac einengen, **aber nicht komplett trocknen!!!!**
- Eluate auf 12µl mit 0,1%TFA, 0,5% ACN auffüllen

- Applikation auf eine nano-C18 reversed phase Säule und kontinuierliche Elution mit einem ACN-Gradienten über 120 min
- online-Kopplung an ein ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer (Orbitrap)
- zyklische Akquisition von MS- und jeweils 20 MS/MS-Spektren der abundantesten Precursoren im vorhergehenden MS-Spektrum
- active exclusion
- positiver Modus
- Scanbereich: 200-1800 Da
- Fragmentierung der Precursorpeptide durch CID (wideband Modus)

- Peptid/Proteinberechnung über PEAKS Studio im *de novo*-sequencing Modus
- Abgleich der experimentellen Messdaten mit den theoretischen Daten der Uniprot-Datenbank (SwissProt, human)

- Vergleich der qualitativen Zusammensetzung des lipid raft Phosphoproteoms in zeitlicher Abhängigkeit einer Peroxivanadat Behandlung.

8. SCX-Fraktionierung der nicht-Phosphopeptidfraktion zur qualitativen LC-MS/MS-Analyse:

Zur Reduktion der Komplexität des Peptidgemisches soll eine Fraktionierung über einen starken Kationenaustauscher (SCX) erfolgen. Hierbei nutzt man die Eigenschaft der meisten Peptide, in einer stark sauren Umgebung in Kationen zu dissoziieren. Diese kationischen Peptide binden dann über elektrostatische Wechselwirkungen an einer negativ geladenen Matrix (SCX).

Durch eine stufenweise Erhöhung des Salzgehaltes (steigende Molarität des Ammoniumformiates) auf der Säule kommt es zu Verdrängungsreaktionen (Kompetition um Bindungsplätze) und Peptide mit der kleinsten Affinität eluieren. Peptide mit höherer Affinität eluieren erst bei höheren Salzkonzentrationen. Die finale Elution mit Ammoniumhydroxid ist stark basisch, so dass alle auf der Säule verbliebenen Peptide ihre positiven Ladungen verlieren und eluieren.

Zur Separation werden vorgefertigte Minisäulen verwendet, die ungefähr ein Matrixvolumen von 200µl besitzen.

- o Peptide + 200µl 0,5% FAC
- o 15000g /15 min / 4°C → ÜS für SCX → → pH < 3-Kontrolle

- Äquilibration der SCX-Matrix:
 - o 60 µl Acetonitril → 3500U/ min / 1 min.
 - o 100 µl 0,1% TFA → 3500U/ min / 1 min.

- Beladung der SCX-Matrix:
 - o Peptide (komplettes Volumen in 200 µl Schritten)
 - o Wasche mit 60 µl 0,1 % TFA → 3500U/ min / 1 min
- Erste Fraktion:
 - o 60 µl 50 mM Ammoniumformiat / 20% ACN / 0,5 % FAC → 3500U/ min / 1 min
- Zweite Fraktion:
 - o 60 µl 75 mM Ammoniumformiat / 20% ACN / 0,5 % FAC → 3500U/ min / 1 min
 - o Fraktionen 1+2 poolen
- Dritte Fraktion:
 - o 60 µl 125 mM Ammoniumformiat / 20% ACN / 0,5 % FAC → 3500U/ min / 1 min
- Vierte Fraktion:
 - o 60 µl 200 mM Ammoniumformiat / 20% ACN / 0,5 % FAC → 3500U/ min / 1 min
 - o Fraktionen 3+4 poolen
- Fünfte Fraktion:
 - o 60 µl 300 mM Ammoniumformiat / 20% ACN / 0,5 % FAC → 3500U/ min / 1 min
- Sechste Fraktion:
 - o 60 µl 5% Ammoniumhydroxid / 80% ACN → 3500U/ min / 1 min.
 - o Fraktionen 5+6 poolen
- alle Fraktionen werden in der Vacuumzentrifuge (Speed Vac) bis zur Trockene eingedampft
- Resolubilisierung der Peptide in 12 µl 0,1% TFA, 0,5% ACN
- luftblasenfreie Überführung der Probe in konische Autosamplervials, Verschluß mit Kreuzschlitz-Caps
- Applikation auf eine nano-C18 reversed phase Säule und kontinuierliche Elution mit einem ACN-Gradienten über 120 min
- online-Kopplung an ein ESI-Ionenfallen-Massenspektrometer (Orbitrap)
- zyklische Akquisition von MS- und jeweils 20 MS/MS-Spektren der abundantesten Precursoren im vorhergehenden MS-Spektrum
- active exclusion
- positiver Modus
- Scanbereich: 200-1800 Da
- Fragmentierung der Precursorpeptide durch CID
- Peptid/Proteinberechnung über PEAKS Studio im *de novo*-sequencing Modus
- Abgleich der experimentellen Messdaten mit den theoretischen Daten der Uniprot-Datenbank (SwissProt, human)
- Vergleich der qualitativen Zusammensetzung des lipid raft Proteoms in zeitlicher Abhängigkeit einer Peroxivanadat-Behandlung.

Analytik des Experimentes:

1. Überprüfung der Effizienz des tryptischen Verdau der lipid raft Fraktionen mittels SDS-Elektrophorese und Silberfärbung der Proteine

Auf Grund der sehr basischen Reaktionsbedingungen beim tryptischen Verdau der lipid rafts ist eine Kontrolle der Verdauqualität dringend erforderlich. Das verwendete Trypsin besitzt bei einem pH-Wert von 8,5 seine stärkste Enzymaktivität (pH-Optimum). Beim verwendeten pH-Wert von 11 ist nur noch eine sehr geringe enzymatische Aktivität messbar und kann durch minimale pH-Schwankungen sehr stark beeinflusst werden.

Ein quantitativer Verdau der lipid raft Proteine kann durch das vollständige Verschwinden von Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich größer 20 kDa erkannt werden. Die generierten tryptischen Peptide haben üblicherweise eine Molmasse kleiner 10 kDa und sind sowohl für die Trennung in der Elektrophorese als auch für eine Silberfärbung nicht suszeptibel.

- die entnommenen Aliquots (vor- und nach tryptischem Verdau) aller vier lipid raft Präparationen werden mit $\frac{1}{4}$ ihres Volumens mit 4x SDS-Sample Puffer versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert
- alle 8 Proben (2 Proben/Gruppe) werden auf ein 12%iges SDS-Elektrophoresegels appliziert
- Laufbedingungen: Sammelgel: 100 V (ca. 15 min), Trenngel: 200 V constant, ca. 1h (nach Sicht- Abbruch, wenn Farbstofffront das Gelende erreicht)

Durchführung der SDS-Elektrophorese

Acrylamid (30% T; 29:1)-Lösung (giftig!!)

Ammoniumpersulfat (APS)

10% (w/v) 100mg/ 1 ml

Elektrophoresepuffer (10x)

248 mM Tris-HCl, pH 8,3 30,04 g/l
192 mM Glycin 144,13 g/l
1% (w/v) SDS 10 g/l

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 6,057 g/ 100ml

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 18,171g /100ml

Tris-HCl für 4x Probenpuffer

1 M Tris-HCl, pH 6,8 12,114g/ 100ml

4x SDS-PAGE-Probenpuffer

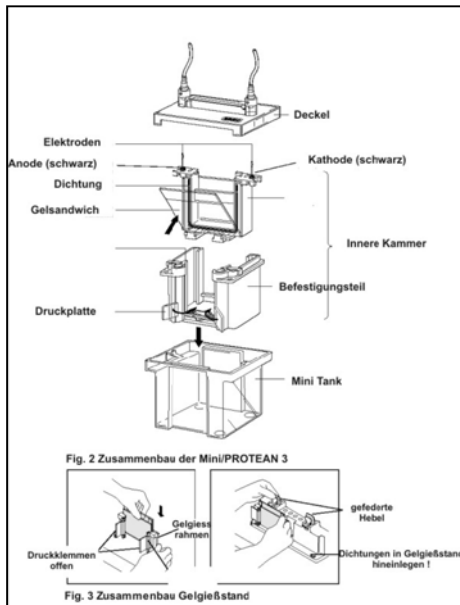
250 mM Tris-HCl, pH 6,8 2 ml (1 M Tris-HCl, pH 6,8)
40% Glycerol 3,2 ml
2% (w/v) SDS 0,64 g
Bromphenolblau (0,05 % w/v) 1,6 ml
dest. Wasser 1,2 ml
20% β -Mercaptoethanol oder 400 mM DTT

TEMED

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

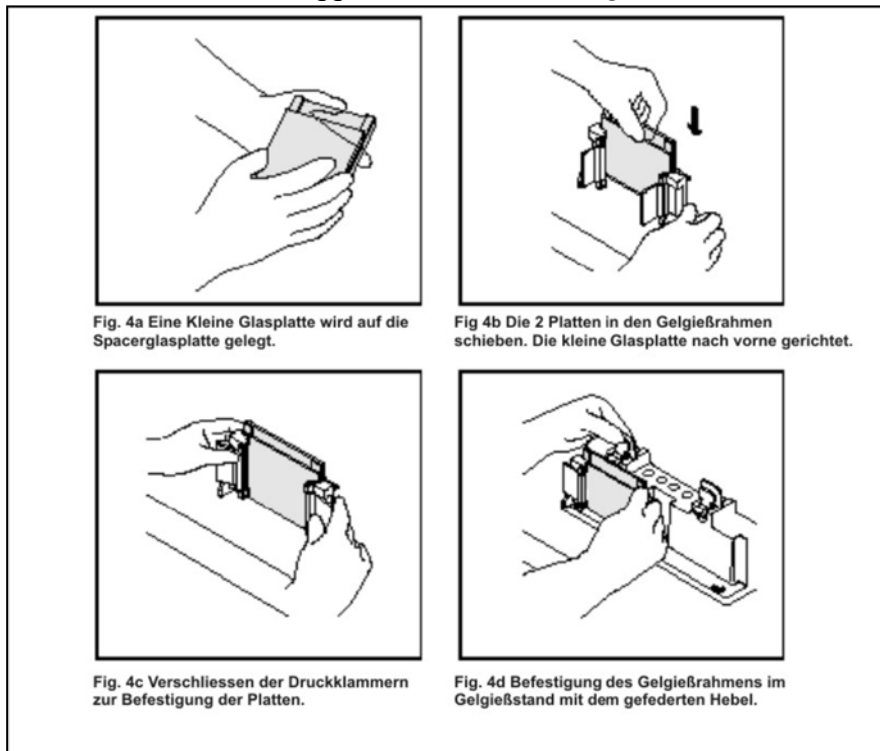
Versuchsablauf

Die SDS-PAGE wird mit dem Mini-PROTEAN 3 System (BIO-RAD) durchgeführt.



Zusammenbau des Gelgießstandes

- alle Komponenten des Gelgießstandes gründlich mit destilliertem Wasser und dann mit Ethanol reinigen
- Zusammenbau der Apparatur laut *Abbildung*



Zusammenbau des Gelgießstandes

Gießen des diskontinuierlichen Gels

Wichtig! Acrylamid ist in fester und gelöster Form ein Nervengift und kann durch Hautkontakt aufgenommen werden. Beim Arbeiten mit Acrylamid Handschuhe tragen. Polymerisiertes Acrylamid ist nicht mehr giftig.

Trenngel gießen

- ein Kamm zwischen die Glasplatten setzen und die Glasplatte 1 cm unter den Kammzähnen mit einem Stift markieren
- in einem Falcon-Tube werden folgende Komponenten gemischt; TEMED wird zuletzt zugegeben
- Achtung: 10 ml Gelansatz reicht für 2 Gele
- 10%iges Gel, 12%iges Gel

Komponenten	Volumen (12%)	Volumen (10%)
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
APS 10%	100 µl	100 µl
Acrylamidlösung 30%	4,0 ml	3,3 ml
Destill. Wasser	3,29 ml	3,99 ml
TEMED	10 µl	10 µl

- leichtes Schwenken der angesetzten Lösung
- mit Hilfe einer Pipette zügig die Lösung bis zur Markierung zwischen die Glasplatten füllen
- Überschichten mit Iso-Propanol oder Wasser und 30 min auspolymerisieren lassen
- wenn das Gel auspolymerisiert ist bildet sich eine scharfe sichtbare Linie zwischen dem überschichteten Iso-Propanol/Wasser und dem Trenngel

Sammelgel gießen

- während das Trenngel auspolymerisiert, wird das Sammelgel vorbereitet
- Achtung: 10 ml Gelansatz reicht für 2 Gele

3%-iges Gel

Komponenten	Volumen
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
APS 10%	100 µl
Acrylamidlösung 30%	1,0 ml
Destill. Wasser	6,3 ml
TEMED	10 µl

- abgießen des Iso-Propanols/Wassers vom Trenngel
- leichtes Schwenken der Sammelgel-Lösung
- Lösungsansatz wird mit Pipette bis zum oberen Ende der kleinen Platte gefüllt
- den Kamm SOFORT zwischen die Glasplatten stecken, eingeschlossene Luftblasen vermeiden
- Sammelgel nun für 30 – 45 min auspolymerisieren lassen
- Gelgießstand abbauen und die Glasplatten nach *Abbildung* in die Elektrophoreseeinheit einsetzen

Silberfärbung des Gels:

nach Blum et al. (1987) (mod.):

Reagenzien/ Lösungen

Fixierung:

30 % Ethanol, 10% acetic acid, 60% deionized water, 2 Stunden

Waschen:

30% Ethanol, 70% deionized water, 2x 20 min

Waschen:

deionized water, 20 sec

Sensitivieren:

0.02% sodium thiosulfate 1 min

Waschen:

deionized water, 3x 20 sec

Silberfärbung:

0.2% silver nitrate, 0.02% Formaldehyde (37%) 20 min

Waschen:

deionized water, 3x 20 sec

Entwicklung:

3% sodium carbonate, 0.05% formaldehyde (37%),
0.0005% sodium thiosulfate 3-5 min

Waschen:

deionized water, 3x 20 sec

Stoppen:

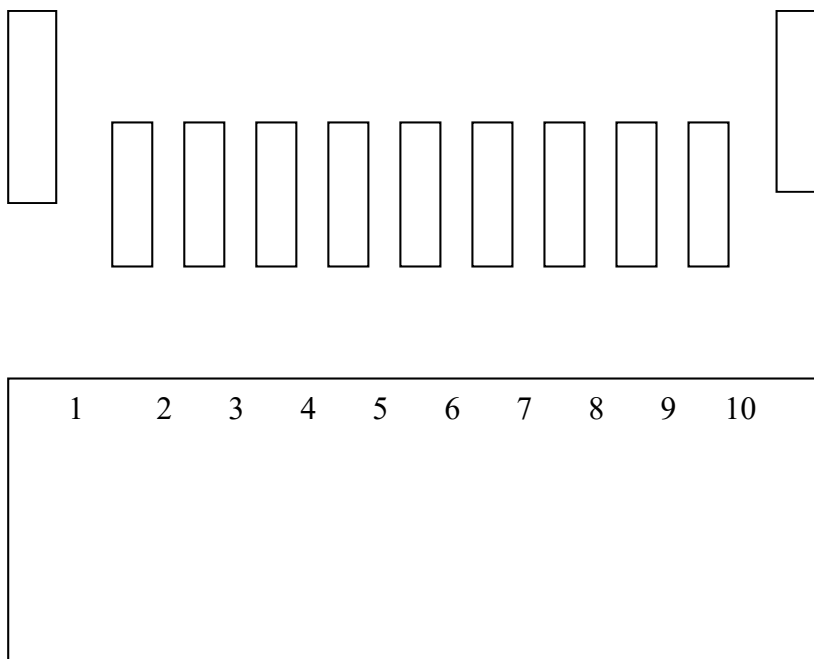
30 % Ethanol, 10% acetic acid, 60% deionized water 5 min

Nach erfolgreicher Färbung werden die Gele am Durchlichtscanner digitalisiert.

2. Überprüfung der Qualität der lipid raft-Anreicherung durch Dichtegradientenzentrifugation mittels SDS-Elektrophorese und Western Blot

Anhand der quantitativen Verteilung eines typischen lipid raft assoziierten Proteins (zelluläres Markerprotein) über die entnommenen Fraktionen des Dichtegradienten kann eine Aussage über die Qualität/Effektivität der durchgeführten biochemischen Separation getroffen werden.

- von allen Fraktionen des Dichtegradienten werden 20µl mit jeweils 5 µl 4x SDS-Sample Buffer versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert
- für jede Dichtegradienten (insgesamt 4, 1 Gel pro Gruppe) wird ein 10%iges SDS-Elektrophoresegels hergestellt (Anzahl der Taschen/lanes in Abhängigkeit von der Fraktionszahl wählen!)
- Beladung des Gels mit jeweils 15 µl Probe pro lane



1. Molekulargewichtsmarker
2. Fraktion 1
3. Fraktion 2
4. Fraktion 3
5. Fraktion 4
6. Fraktion 5
7. Fraktion 6
8. Fraktion 7
9. Fraktion 8
10. Fraktion 9
11. Fraktion 10
12. ...

- Laufbedingungen: Sammelgel: 100 V (ca. 15 min), Trenngel: 200 V constant, ca. 1h (nach Sicht- Abbruch, wenn Farbstofffront das Gelende erreicht)

Durchführung der SDS-Elektrophorese

Benötigte Reagenzien werden am Versuchstag vom Betreuer ausgegeben

Acrylamid (30% T; 29:1)-Lösung (giftig!!)

Ammoniumpersulfat (APS)

10% (w/v) 100mg/ 1 ml

Elektrophoresepuffer (10x)

248 mM Tris-HCl, pH 8,3	30,04 g/l
192 mM Glycin	144,13 g/l
1% (w/v) SDS	10 g/l

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 6,057 g/ 100ml

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 18,171g /100ml

Tris-HCl für 4x Probenpuffer

1 M Tris-HCl, pH 6,8 12,114g/ 100ml

4x SDS-PAGE-Probenpuffer

250 mM Tris-HCl, pH 6,8	2 ml (1 M Tris-HCl, pH 6,8)
40% Glycerol	3,2 ml
2% (w/v) SDS	0,64 g
Bromphenolblau (0,05 % w/v)	1,6 ml
dest. Wasser	1,2 ml

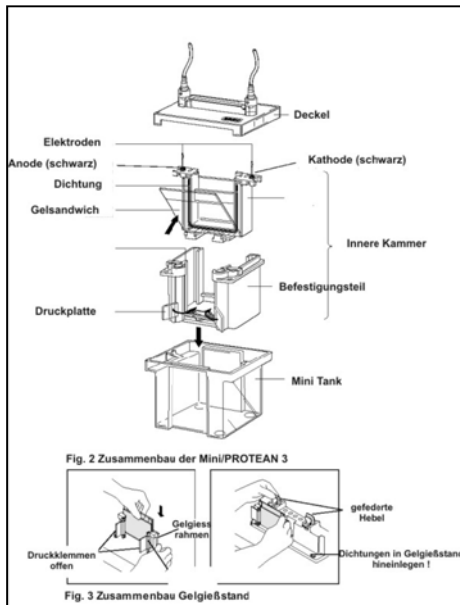
20% β -Mercaptoethanol oder 400 mM DTT

TEMED

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

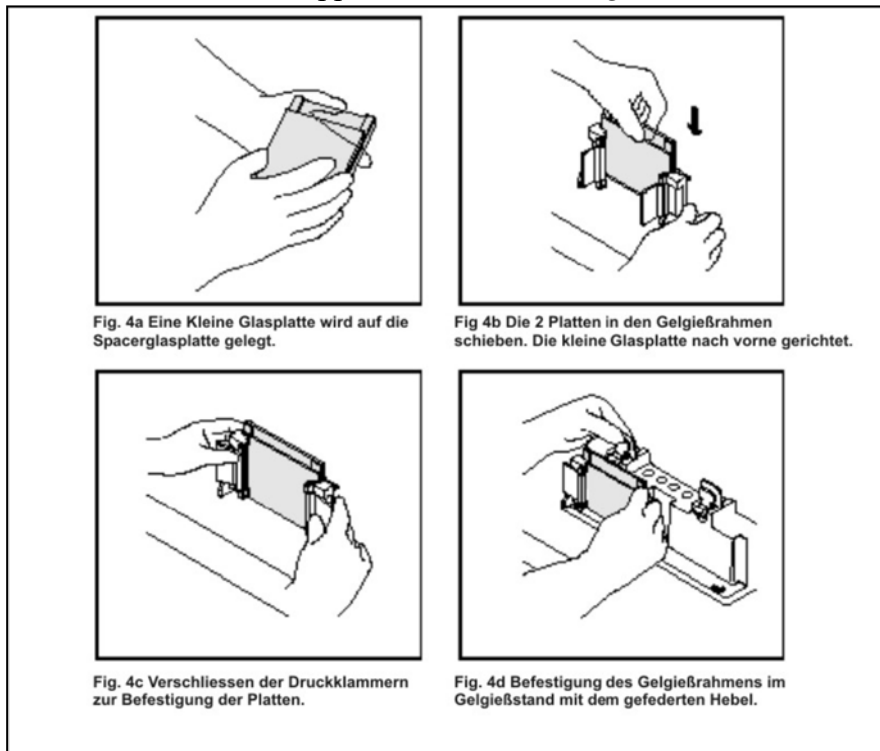
Versuchsablauf

Die SDS-PAGE wird mit dem Mini-PROTEAN 3 System (BIO-RAD) durchgeführt.



Zusammenbau des Gelgießstandes

- alle Komponenten des Gelgießstandes gründlich mit destilliertem Wasser und dann mit Ethanol reinigen
- Zusammenbau der Apparatur laut *Abbildung*



Zusammenbau des Gelgießstandes

Gießen des diskontinuierlichen Gels

Wichtig! Acrylamid ist in fester und gelöster Form ein Nervengift und kann durch Hautkontakt aufgenommen werden. Beim Arbeiten mit Acrylamid Handschuhe tragen. Polymerisiertes Acrylamid ist nicht mehr giftig.

Trenngel gießen

- ein Kamm zwischen die Glasplatten setzen und die Glasplatte 1 cm unter den Kammzähnen mit einem Stift markieren
- in einem Falcon-Tube werden folgende Komponenten gemischt; TEMED wird zuletzt zugegeben
- Achtung: 10 ml Gelansatz reicht für 2 Gele
- 10%iges Gel, 12%iges Gel

Komponenten	Volumen (12%)	Volumen (10%)
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
APS 10%	100 µl	100 µl
Acrylamidlösung 30%	4,0 ml	3,3 ml
Destill. Wasser	3,29 ml	3,99 ml
TEMED	10 µl	10 µl

- leichtes Schwenken der angesetzten Lösung
- mit Hilfe einer Pipette zügig die Lösung bis zur Markierung zwischen die Glasplatten füllen
- Überschichten mit Iso-Propanol oder Wasser und 30 min auspolymerisieren lassen
- wenn das Gel auspolymerisiert ist bildet sich eine scharfe sichtbare Linie zwischen dem überschichteten Iso-Propanol/Wasser und dem Trenngel

Sammelgel gießen

- während das Trenngel auspolymerisiert, wird das Sammelgel vorbereitet
- Achtung: 10 ml Gelansatz reicht für 2 Gele

3%-iges Gel

Komponenten	Volumen
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
SDS 10%	100 µl
APS 10%	100 µl
Acrylamidlösung 30%	1,0 ml
Destill. Wasser	6,3 ml
TEMED	10 µl

- abgießen des Iso-Propanols/Wassers vom Trenngel
- leichtes Schwenken der Sammelgel-Lösung
- Lösungsansatz wird mit Pipette bis zum oberen Ende der kleinen Platte gefüllt
- den Kamm SOFORT zwischen die Glasplatten stecken, eingeschlossene Luftblasen vermeiden
- Sammelgel nun für 30 – 45 min auspolymerisieren lassen
- Gelgießstand abbauen und die Glasplatten nach *Abbildung* in die Elektrophoreseeinheit einsetzen

Durchführung des Western Blot und Protein-Detektion

BSA (Bovines Serum Albumin)

ECL-Substratlösung

Milchpulver

TBS (10x) pH 7,6

- 200 mM Tris 24,2 g
- 1,37 M NaCl 80 g

TBST

- 10x TBS 100 ml/l
- 0,05% Tween 20 500 µl/l

Transferpuffer

- 10x Tris/Glycin-Puffer 100 ml/l
- Methanol (**Abzug !**) 100 ml/l

Tris/Glycin-Puffer (10x)

- 1,92 M Glycin 144 g/l
- 250 mM Tris 30,3 g/l

ggf. Stripp-Puffer

- 62,5 mM Tris pH 6,7 7,571 g/l
- 2% SDS 20 g/l

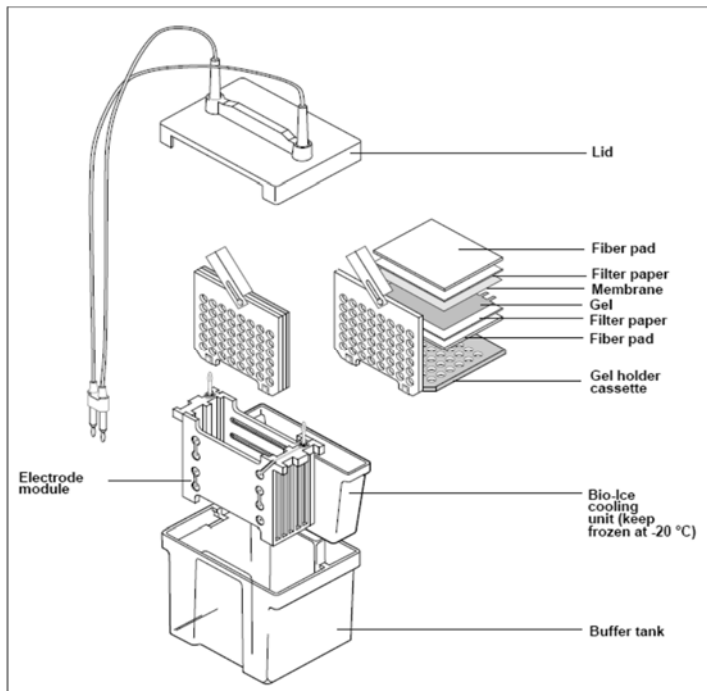
frisch dazugeben (**Abzug!**): 100 mM β -Mercaptoethanol 350 µl/50 ml Puffer

zusätzlich werden benötigt:

- **Filterpapier**
- **PVDF-Membran**
- **Rührer, Schalen**
- **ggf. Filmkassetten und Filme**
- **ggf. Folien für Blots (Detektion)**

Versuchsablauf (Tank-Blot)

Der Transfer der Proteine erfolgt mit dem Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell System (BIO-RAD) (Abb. 3).



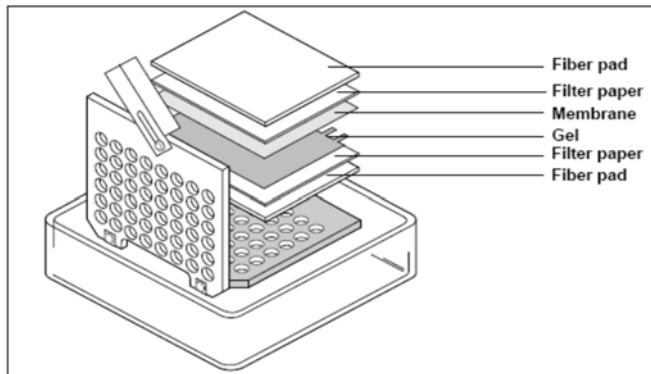
Mini-Trans-Blot System

Vorbereitung

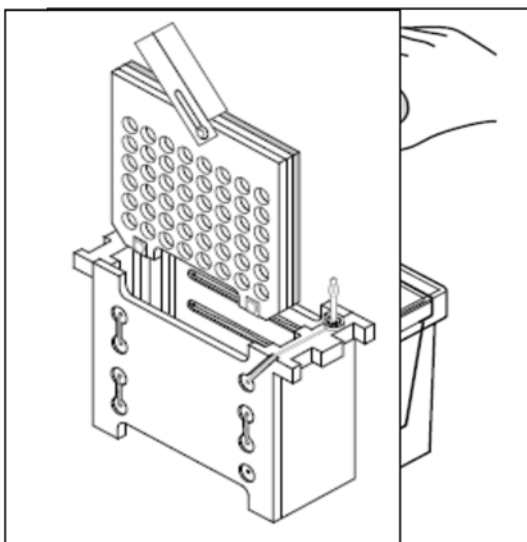
- pro Gel werden benötigt: 8 Filterpapiere (7,5 x 9 cm), PVDF-Membran (6,5 x 9 cm), 1 Klemmkasten, 2 Pads, kleine Schale mit Transferpuffer
- pro Tank-Blot System werden benötigt: große Schale, Rührer und Rührfisch, 1 Liter Transferpuffer (vorkühlen!), Eisakku (-80°C)
- äquilibrieren der Membran in 3 kleine Schalen (**Beschriftung der Membran nicht vergessen !**):
 - Membran in Methanol schwenken
 - Inkubation in H₂O bidest.
 - Lagerung in Transferpuffer
- äquilibrieren der Pads und Filterpapiere in Transferpuffer
- nach Beendigung der Elektrophorese: Apparatur auseinanderbauen und Glasplatten voneinander trennen
- Sammelgel entfernen und Trenngel in die Schale mit Transferpuffer überführen
- Elektrophorese-Puffer wird verworfen und der Tank mehrmals mit Wasser ausgespült

Zusammenbau der Blotapparatur

- schwarze Seite des Klemmkastens nach unten in eine mit Transferpuffer gefüllte Schale legen
- nachfolgend wie in *Abb. 4a* das Gel-Sandwich zusammen bauen: 1 Pad, 4 Filterpapiere, das Gel mit der Lauffront zur Innenseite, Membran mit der Beschriftung zum Gel (**Luftblasen wegstreichen !**), 4 Filterpapiere, 1 Pad
- Klemmkasten verschließen, **ohne das Sandwich zu bewegen (!)**



Zusammenbau der Apparatur



- Klemmkasten in die Vorrichtung einspannen (**schwarz zu schwarz !**) (*Abb. 4b*) und anschließend in den Tank hängen
- in den Tank werden weiter ein Rührfisch und ein Eisakku gegeben und der Tank mit Transferpuffer aufgefüllt (*Abb. 4c*)
- Blotapparatur wird auf einen Rührer gestellt, mit dem Deckel verschlossen und dem Stromversorgungsgerät verbunden.
- Strom: 100 V für ca. 1:30 h

Proteinnachweis – Immundetektion

- nach Beendigung des Transfers: Blotapparatur auseinander bauen und Blots für 5 min in H₂O bidest. schwenken (Schüttler)
- **Blockierung:** ca. 1 h in TBST + 5% Milchpulver (20 ml pro Blot)
- Zwischenzeit: Lösung für den 1. Antikörper (-20°C) auftauen (10 ml pro Blot)
- **Waschen:** ca. 3 x 10 min mit TBST
- Inkubation des **Primär-Antikörpers** erfolgt über Nacht bei 4°C
- folgender Antikörper stehen zur Verfügung:

Antikörper	Mw	Spezies	Verdünnung
anti Flotillin	48 kDa	goat	1:1.000 in TBST + 1,5% BSA

- nächster Tag: **Primär-Antikörper-Lösung wird aufgehoben und wieder verwendet**
- **Waschen:** ca. 4 x 15 min in TBST
- Zwischenzeit: Lösung für den 2. Antikörper ansetzen (10 ml pro Blot): 1:5.000 in TBST + 1,5%BSA
- nachstehende Antikörper werden verwendet: Peroxidase-conjugierte Anti-Goat, -Mouse
- Inkubation des **Sekundär-Antikörpers** wird 1-2 h bei RT durchgeführt
- **Waschen:** ca. 4 x 15 min Waschen in TBST
- **Detektion (Dunkelkammer):** (alternativ Detektion über Kamerasystem INTAS)
- 1-2 ml ECL-Substratlösung pro Blot: 1 Teil Lösung A + 1 Teil Lösung B mischen
- abgetropfte Blots 1 min mit dem Substrat-Mix inkubieren, abgetropfte Blots anschließend in eine vorbereitete Folie (Filmkassette) legen und glatt streichen
- **Nur bei Rotlicht!:** entsprechende Filme aus der Verpackung nehmen, zuschneiden, auflegen und nach 30 sec, 60 sec, 2 min, ... entwickeln

Praktikumsaufgabe Teil 2: Relative Quantifizierung durch MALDI-TOF/TOF Massenspektrometrie

- Verdau eines Musterproteins
- Isotopenmarkierung mit zwei unterschiedlichen iTRAQ-Labeln
- Herstellung von verschiedenen Mischungsverhältnissen
- experimentelle Bestimmung der Mischungsverhältnisse durch MALDI-TOF/TOF

Ziel des Experimentes:

Beispielhafte Demonstration der Verwendung isotopencodierter Proteinmarkierungen zur quantitativen Analyse massenspektrometrischer Daten.

Peptide eines tryptischen Verdau von bovinem Serumalbumin (BSA) werden separat mit zwei unterschiedlichen Isotopenlabeln markiert. Anschließend werden verschiedene Mischungsverhältnisse hergestellt und einer MALDI-TOF/TOF-Analyse unterzogen. Anhand der Intensitäten/Integrale der abgespaltenen Isotopen-Label werden die experimentell bestimmten Mischungsverhältnisse errechnet und mit den theoretischen Werten verglichen.

Jeder Praktikant führt diese Analysen separat durch. Eine Abstimmung der Messzeiten am MALDI-Massenspektrometer zwischen den Praktikanten ist erforderlich!

Arbeitsanweisung

Versuchsablauf

- Musterprotein (BSA) lösen, Cysteinbrücken reduzieren und blockieren
- Proteine mittels Trypsin verdauen (*über Nacht*)
- Peptide mit den iTRAQ-Reagenzien markieren (labeln)
- Probenvorbereitung für Massenspektrometrie –ZipTip
- Messung unterschiedlicher Mischungsverhältnisse beider Proben mit dem MALDI-TOF

Chemikalien und Materialien

- 30 % BSA Lösung (Serva; Masseprozent)
- Dissolution Buffer (pH 8.5)
- Reducing Reagent (50 mM tris-(2-carboxyethyl)-phosphine [TCEP])
- Cysteine-Blocking Reagent (200 mM methyl methane-thiosulfonate [MMTS])
- Trypsin

- Ethanol
- zwei iTRAQ label

- Acetonitril
- 0,1 % TFA
- 0,1 % TFA/ 70 % Acetonitril
- ZipTip (C18-micro-Säulen)

- Peptidemix
- CCA-Matrix

Protokoll

- ***Reduktion und anschließende Blockierung der Cysteinreste***
 - Entnehme dem iTRAQ Sample BufferKit folgende Reagenzien und lasse sie auf Eis auftauen: Dissolution Buffer, Reducing Reagent, Cysteine-Blocking Reagent und Trypsin
 - Verdünne die BSA-Lösung mit MQ-Wasser so, dass 5 µl 40 µg Protein enthalten
 - Präpariere zwei Proben parallel
 - Mische 5 µl Probe mit 20 µl Dissolution Buffer
 - Inkubiere die Proben für ca. 10 min bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler
 - Gib 2 µl Reducing Reagent zu den Proben, vortexe, zentrifugiere kurz an
 - Inkubiere die Proben bei 60 °C für eine Stunde
 - Platziere die Tubes in ein Rack und lasse die Proben auf RT abkühlen, zentrifugiere kurz an
 - Gib 1 µl Cysteine-Blocking Reagent zu den Proben, vortexe, zentrifugiere kurz an
 - Inkubiere die Proben bei RT für 10 min

- ***Trypsin-Verdau der Proteine***
 - Gib 2 µl Trypsinlösung zu den Proben, vortexe, zentrifugiere kurz an
 - Inkubiere die Proben bei 37 °C über Nacht

- **Peptidelabeling mit den iTRAQ Reagenzien des 8plex**
 - Entnehme dem iTRAQ Sample Buffer Kit bzw. iTRAQ Reagent Kit folgende Reagenzien und lasse sie auf Eis auftauen: Ethanol, zwei iTRAQ label und Dissolution Buffer
 - Platziere die Tubes in ein Rack und lasse die Proben auf RT abkühlen, zentrifugiere kurz an
 - Gib 70 µl Ethanol und ein Viertel Unit iTRAQ Reagenz zu den Proben (Beispiel)
 - Probe A – Label 117 (19,7µl total = 4,5 µl / Ansatz)
 - Probe B – Label 118 (18,5µl total = 4,2 µl / Ansatz)
 - Überprüfe den pH-Wert (pH ~8.0)
 - Eventuell gib etwas Dissolution Buffer zu den Proben und überprüfe nochmals den pH-Wert
 - Inkubiere die Proben bei RT für 2 Stunden
 - Trockne die Proben in einem Vakuumkonzentrator (SpeedVac; ~30 min; ‚gelartiges‘ Pellet)
 - Reinige die Proben sofort für die MS-Analyse auf oder bewahre sie bei -20 °C

- **Probenaufreinigung für MS-Analyse**
 - ZipTip
 - Löse die Peptide in 20 µl 0.1 % TFA
 - Aktiviere die solide Phase des ZipTip mit ACN
 - Wasche die solide Phase dreimal mit 10 µl 0.1 % TFA
 - Lade die Probe
 - Wasche die solide Phase dreimal mit 10 µl 0.1 % TFA
 - Eluiere die Peptide mit 30 % H₂O/70 % ACN/0.1 % TFA (v/v/v)
 - Trockne die Probe in einem Vakuumkonzentrator (SpeedVac)

- **MS/MS-Analyse mit dem MALDI-TOF**
 - CCA Matrix
 - Löse 50 mg CCA-Matrix in 500 µl 100 % Acetonitril
 - Peptide-Mix
 - Löse den Peptidemix mit 10 µl 0,1 % TFA und verdünne mit 30 µl 100 % Acetonitril
 - Vermische 1 µl Peptidemix mit 1 µl Matrix und spotte 1 µl auf eine MALDI-Targetplatte
 - Proben
 - Löse beide Proben mit 10 µl 0,1 % TFA
 - Stelle drei verschiedene Mischungsverhältnisse her (1:5; 1:1; 5:1)
 - Mische 1 µl Probenmix mit 1 µl Matrix und spotte 1 µl auf eine MALDI-Targetplatte (Beachte, dass die Proben neben dem Peptidstandard gespottet werden!)

- MALDI-TOF und MALDI-TOF-TOF
 - Aufnahme eines MS-Spektrums mit dem MALDI-TOF (Autoflex)
 - Methode: RP_Proteomics_HPC.par
 - Summierung von mindestens 1000 Einzelspektren
 - Speicherung des Summenspektrums und Öffnen in FlexAnalysis
 - automatische Annotierung des Massenspektrums
 - Auswahl von mindestens drei verschiedenen putativen BSA-Peptiden als Precursoren für eine Fragmentierung (TOF/TOF-Analyse)

- Wechsel der Methode: lift.lft
- Auswahl der Precursormasse
- Akquisition von mind. 500 Spektren der Precursormasse (parent)
- Akquisition von mind. 2000 Spektren der Fragmentmassen (fragment)
- Speicherung des Summenspektrums und Öffnen in FlexAnalysis
- Bestimmung der Peak-Intensitäten und Flächenintegrale der iTRAQ-Fragmente
- Berechnung der Verhältnisse zwischen den Proben und vergleiche mit den tatsächlichen Mischungsverhältnissen (Statistik)
- Vergleich der Präzision der Messdaten in Abhängigkeit von der Verwendung der Peak-Intensitäten bzw. der Flächenintegrale der iTRAQ-Label

Anhang I:

Allgemeine Erläuterungen:

Eukaryotische Zellkultur

verwendete Zelllinie:

AGS-Zellen: menschliche Adenocarcinomzellen des Magens

Alle Zelllinien liegen in adhärenter Zellkultur vor und werden mit so genanntem Vollmedium, bestehend aus RPMI 1640-Medium mit 2mM Glutamin, 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 10mM HEPES, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin in Dauerkultur gehalten. Anzumerken ist, dass die Antibiotikazugabe nur bei den Versuchen erfolgt. In der Reinstkultur werden die Zellen ohne Antibiotika kultiviert, da ansonsten resistente Zellen entstehen können.

HEPES – 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure bewirkt eine verbessert Pufferung und pH-Stabilität bei schnell wachsenden Kulturen mit einer starken metabolischen Ansäuerung.

FCS wird aus dem Blut von Rinderfeten zwischen dem 3. und ca. 7. Trächtigkeitsmonat nach der Schlachtung keimarm gewonnen. Wichtig ist hier die natürliche Gerinnung, weil dabei offenbar ein Wachstumsfaktor aus den Thrombozyten abgegeben wird. Vor dem Zusatz wird das FCS 30 min auf 56°C erwärmt, um das Komplement im Serum zu inaktivieren.

Die Zelllinien wachsen als sub-konfluente Monolayer-Kulturen in Polystyrol-Zellkulturflaschen im CO₂- Inkubator unter konstanten Bedingungen.

- Temperatur : 37°C
- CO₂- Gehalt: 5 %
- Luftfeuchtigkeit: 95%

Alle Arbeitsschritte der Zellkultivierung werden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Wichtig ist, dass alle verwendeten Lösungen und Medien vorher im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt werden.

Subkultivierung

Zur Subkultivierung konfluent gewachsener Zelllinien wird zunächst das überstehende Medium abgossen und einmal mit PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen, um die Serumbestandteile des Mediums herauszuspülen.

Anschließend werden 3ml Trypsin-EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben, um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Danach erfolgt eine 3-10 min Lagerung der Flasche im Brutschrank. Hat sich die Mehrzahl der Zellen vom Flaschenboden gelöst und schwimmt in der Lösung, ist der Prozess abgeschlossen und die Zellen werden mit Komplettmedium abgespült. Der Serumzusatz bewirkt eine sofortige Inaktivierung des Trypsins und vermag auch teilweise das cytotoxische EDTA zu binden. In dieser Suspension wird die Zellzahl bestimmt und die Zellen danach bei 800xg für 3 min abzentrifugiert.

Zellzahlbestimmung

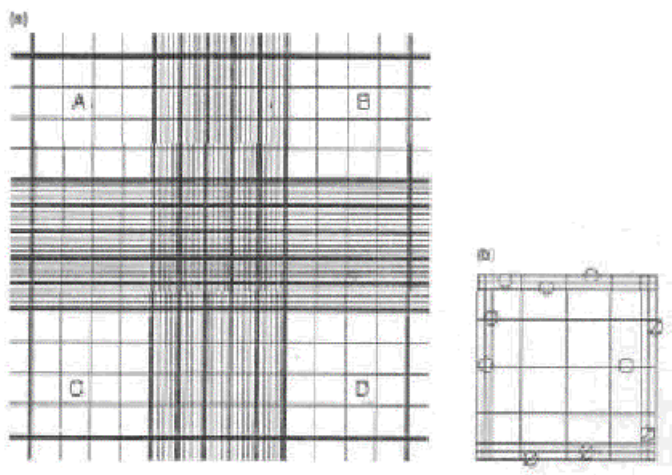
Die Zellzahl wird durch Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Durch die Zugabe von Trypanblau lässt sich zusätzlich die Vitalität der Zellen abschätzen. Trypanblau ist ein Farbstoff, der die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchdringen kann, jedoch das Cytoplasma toter Zellen blau färbt. Lebende Zellen erscheinen damit im Mikroskop hell mit blau kontrastiertem Rand, während tote Zellen sich durch ihre dunkelblaue Färbung deutlich von den lebenden abheben. Die Oberfläche der Zählkammer ist durch eingraviert Linien in ein feines Raster unterteilt (siehe Abbildung). Legt man auf diese zentrale Fläche ein Deckglas, so beträgt der Abstand zwischen der Unterseite dieses Glases und der Oberfläche des Objektträgers genau 0,1 mm. Jedes der fünf Quadrate (in den vier Ecken und im Zentrum des Raster) hat eine Fläche von 1 mm². Es berechnet sich ein Volumen von 0,1 µl über jedem dieser Quadrate.

Durchführung

Es werden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl einer 0,5% (w/v) Trypanblaulösung gemischt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. 10 µl dieser Mischung werden mit einer Pipette vorsichtig am Rand des Deckglases auf den zentralen, die Zählkammer umfassenden Teil des Objektträgers aufgebracht. Kapillarkräfte ziehen dann die Probe sofort in den Spalt. Die Zellzahl wird in den vier Großquadraten (A-D) ermittelt und je Milliliter nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} : 4 \times 2 \text{ (bei Trypanblaufärbung)} \times 10^4$$

Der Anteil der blau gefärbten Zellen wird gesondert gezählt und der Prozentsatz der toten Zellen bestimmt.

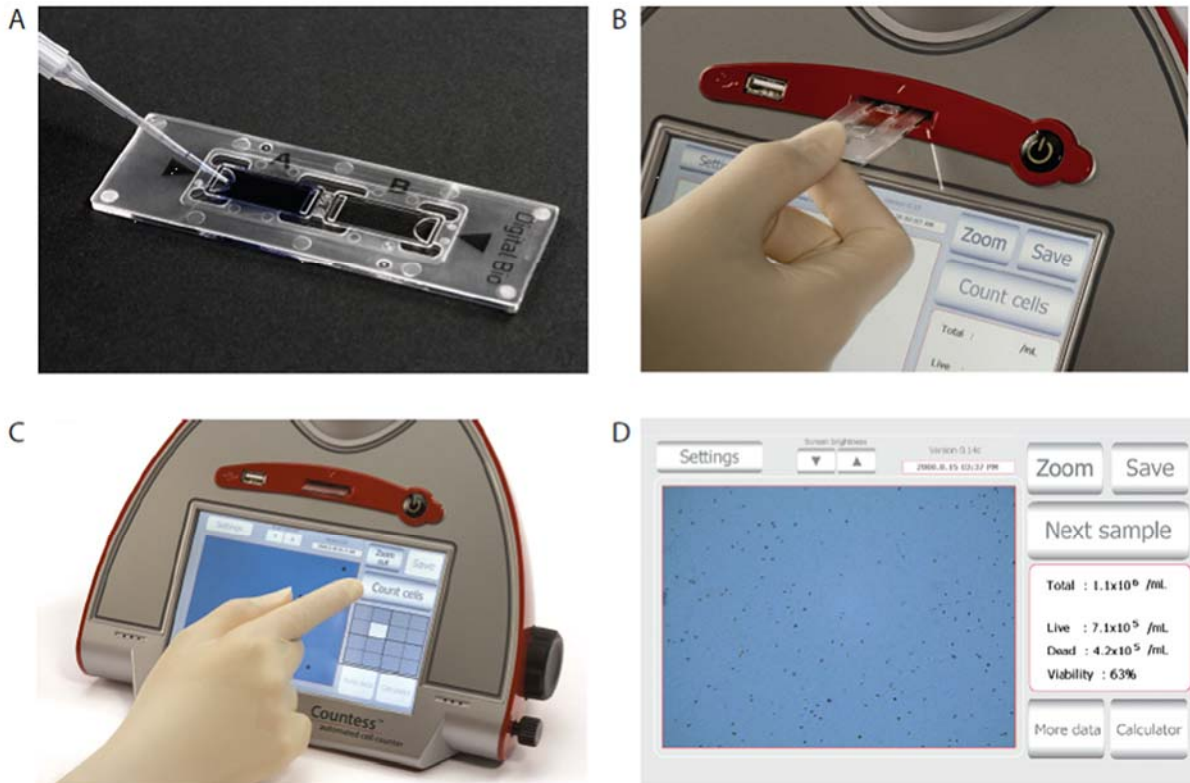


(a) Das Raster einer Zählkammer nach Neubauer. (b) Vergrößerung eines der 25 zentralen, kleinen Quadrate. Man erkennt, welche Zellen gezählt (O) und welche ignoriert (Ø) werden sollen. (aus Kultur tierischer Zellen, Spektrum-Verlag 1994).

Alternative Zellzahlbestimmung mit automatischem Zellzähler (Countess, InVitrogen)

Prinzip: automatisierte Bildanalyse

Hierzu wird ein kleines Volumen Zellsuspension in eine Dünnschichtkammer pipettiert. Anschließend erfolgt die Bildaufnahme mit einer im Gerät integrierten Kamera. Die Bildanalyse ergibt durch die Färbung (Trypanblau) die Zahl der lebenden und der toten Zellen, sowie die errechnete Viabilität.



Durchführung

Es werden 10 μl der Zellsuspension mit 10 μl einer 0,4% (w/v) Trypanblaulösung gemischt und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. 10 μl dieser Mischung werden mit einer Pipette vorsichtig in die Dünnschichtkammer gegeben.

Die Dünnschichtkammer wird in das Instrument geschoben, das Bild wird bei Bedarf fokussiert. Danach erfolgt durch das Drücken der „Count cells“ Taste die Zellzahlbestimmung.

Relevant für die weiteren Arbeiten ist die Anzahl der vitalen Zellen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Einführung

Elektrophorese ist die Bewegung (Wanderung/Transport) von elektrisch geladenen Teilchen in einem als Trägermaterial dienenden Stoff unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Ladung des Teilchens, seiner Form und seiner Umgebung, sowie von der Größe des elektrischen Feldes ab.

Ein elektrophoretisches Trennsystem besteht aus einer Gleichspannungsquelle mit zwei Elektroden (Kathode u. Anode) in direktem Kontakt mit dem Trennmedium (*Abb. 1*).

Das Trennmedium, dessen Grundlage eine wässrige Elektrolytlösung bildet (Puffer), füllt den Raum zwischen den Elektroden. Die Probe wird auf das Trennmedium aufgetragen, bevor die Spannung angeschaltet wird.

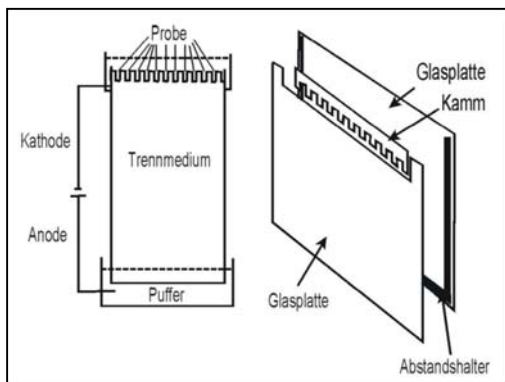


Abbildung 1: Elektrophoretisches Trennsystem mit schematischem Aufbau der Apparatur (links) und der Gelkassette (rechts)

Agarosegele kommen vor allem bei der Auftrennung von DNA-Fragmenten zum Einsatz, während Proteine meist in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt werden.

Je nach Anwendung werden dem Gel bei Proteingemischauftrennungen verschiedene Zusatzstoffe zugesetzt, beispielsweise SDS bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE= sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) oder Ampholyte bei der Isoelektrischen Fokussierung (IEF).

In einem solchen System werden die Komponenten (hier Proteine) elektrophoretisch getrennt, falls folgende drei Bedingungen erfüllt sind:

1. Die voneinander zu trennenden Teilchen müssen im elektrischen Feld wandern können, d.h. sie müssen eine Ladung tragen.
2. Die zu trennenden Teilchen müssen sich in wenigstens einer ihrer Eigenschaften (Größe, Molmasse, Ladung, isoelektrischer Punkt, etc.) voneinander unterscheiden.
3. Das Trennmedium muss auf die wandernden Teilchen eine Wirkung ausüben, die deren Eigenschaftsdifferenzen in unterschiedliches elektrophoretisches Verhalten umsetzt

Denaturierende Gelelektrophorese

Bei der nativen Gelelektrophorese bleiben bei entsprechender Wahl der Puffer (pH-Wert) die Proteine meist korrekt gefaltet, d.h. ihre dreidimensionale Struktur (Tertiärstruktur) bleibt erhalten. Werden dem Puffer und dem Polymer dagegen Detergenzien zugesetzt (z.B. Natriumdodecylsulfat, SDS) so spricht man von einer denaturierenden Gelelektrophorese. Dabei dissoziieren Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten, die Proteine werden denaturiert und das SDS bildet mit den Proteinmolekülen einen Komplex. Das Protein nimmt meist eine flexible und gestreckte Konformation an. Die Masse der an das Protein gebundenen Dodecylsulfat-Ionen (SDS-Protein-Komplex) ist der ursprünglichen Proteinmasse proportional.

Wegen der großen Zahl an SDS-Molekülen pro Proteinmolekül, besitzt der SDS-Protein-Komplex eine negative Gesamtladung mit einem (in erster Näherung) einheitlichen Masse/Ladungs-Verhältnis. Die Trennung dieser Komplexe im elektrischen Feld ergibt sich aus der restriktiven Wirkung des Trennmediums. Je größer die Protein-SDS-Komplexe desto stärker werden sie bei ihrer elektrophoretischen Wanderung durch die Polyacrylamid-Matrix gebremst, d.h. ihre elektrophoretische Mobilität nimmt ab. Die Trennung der Proteine erfolgt nach der Größe, wobei kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern als größere Proteine. Entsprechend ist die SDS-PAGE nicht nur zur Trennung von Proteinen geeignet, sondern kann auch zur Abschätzung der Molmasse unbekannter Proteine, relativ zu Markerproteinen mit bekannten Molmassen, verwendet werden.

SDS-PAGE nach Laemmli

Da die zu trennenden Proteine in der SDS-PAGE nicht fokussiert werden, kann man durch Verwendung eines diskontinuierlichen Trennmediums (Disk-Elektrophorese) die Trennschärfe erhöhen. Im Laemmli-System wird die Probe nicht direkt in das Trenngel aufgetragen, sondern in ein zweites, aufpolymerisiertes Gel. In diesem als Sammelgel (pH 6,8) bezeichneten Gelabschnitt bildet sich zwischen den schnell wandernden Leitungen (Chloridionen) und den langsam wandernden Folgeionen (Glycin) aufgrund des Mangels an Ladungsträgern eine Zone hoher elektrischer Spannung aus. In diesem Spannungsfeld befindliche Proteine wandern schneller, was sich in der Fokussierung der Proteine zu einer scharfen Bande äußert. Diese Aufkonzentrierung („Stacking“) wird durch eine große Polyacrylamidporenweite des Sammelgels (3 - 5%) unterstützt. Beim Erreichen des Trenngels geht der Sammeleffekt durch die erhöhte Acrylamidkonzentration (bis 20%) und einen höheren pH-Wert (pH 8,8) des Trenngels verloren. Dieser bewirkt, dass Glycinionen eine negative Ladung erhalten und dadurch die Proteine überholen können. Die SDS-Protein-Komplexe wandern im Trenngel entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Die Trennung der Proteine erfolgt daher erst im Trenngel.

Western Blot und Chemilumineszenz-Detektion

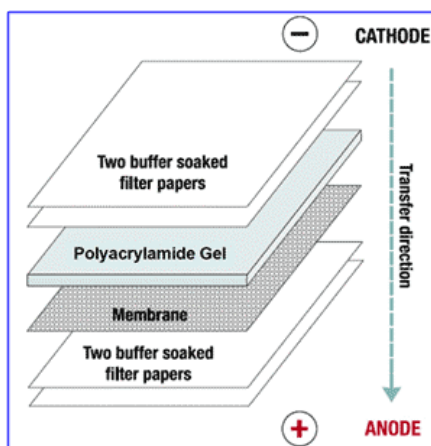
Einführung

Beim *Blotten* werden bestimmte Substanzen auf eine Membran übertragen, die dann dort detektiert und quantifiziert werden können. Handelt es sich bei den Substanzen um DNA, spricht man von einem *Southern Blot* (nach dem Erfinder dieser Methode Ed M. Southern). Überträgt man RNA, wird der Begriff *Northern Blot* verwendet. Für den Transfer und Nachweis von Proteinen auf Membranen führt man einen *Western Blot* durch.

Der Western Blot ermöglicht eine Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches (Lysat oder Immunpräzipitat). Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Transfer auf eine entsprechende Membran erfolgt die Detektion mit Hilfe spezifischer Antikörper. Im Vergleich zum Gel ist die stabile Membran leicht zu handhaben und Proteine werden dauerhaft fixiert.

Transfer der Proteine auf eine Membran (Blot)

Der Transfer von Proteinen auf eine Membran findet durch Elektrophorese (siehe SDS-PAGE) statt. Zwei unterschiedliche Verfahren werden dazu angewendet: *Wet-Blot* (auch Tank-Blot) und *Semidry-Blot*. In beiden Fällen ist die Anordnung (Abb. 1) gleich. Der Vorteil des Wet-Blots ist die schonendere Art des Transfers und einer geringeren Erwärmung des Proteins. Nachteilig sind der höhere Zeitaufwand und die größere Menge an Transferpuffer. Der Transfer mittels Semidry-Blots gelingt schneller und es wird weniger Transferpuffer benötigt. Durch die fehlende Kühlung kann es zu starken Erwärmungen kommen und somit die Integrität des Proteins beeinflussen.



Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus

Blot-Membranen bestehen u.a. aus Nitrocellulose, Polyvinylidendifluorid (PVDF) oder positiv geladenem Nylon (⁺Nylon). Die Membranen binden die Proteine durch hydrophobe (Nitrocellulose) oder hydrophobe und ionische Wechselwirkungen (⁺Nylon). Aufgrund der hohen Bindekapazität für Proteine und der mechanischen Stabilität werden häufig PVDF-Membranen eingesetzt.

Die *Transferpuffer* unterscheiden sich je nach Anwendungsbereich und gewähltem Blot-Verfahren. Die meisten Transferpuffer enthalten Tris, Glycin und Methanol. Die Leitfähigkeit des Puffers sollte gering gehalten werden. Der Blot kann sich durch den fließenden Strom erwärmen und die Transferrate verschlechtern. Methanol im Transferpuffer erhöht die Transferrate, da die Bindung der Proteine an das SDS gelockert wird und sich somit deren Bindung an die Membran erhöht.

Proteindetektion

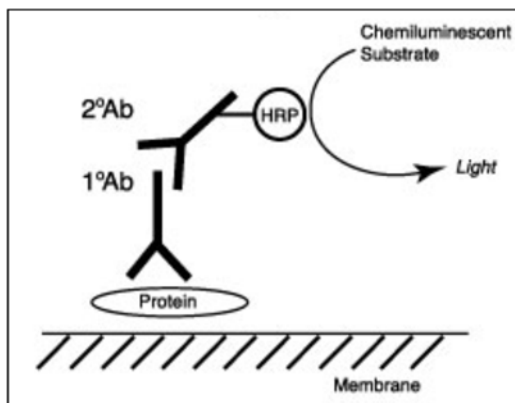
Nach erfolgtem Transfer kann die Blot-Effizienz mittels rotem *Ponceau-S-Farbstoff* überprüft werden. Ponceaurot färbt Proteine auf Blot-Membranen. Diese Nachweisreaktion ist reversibel und stört nicht die anschließende Immunfärbung.

Die Immundetektion von Western Blots besteht aus folgenden Arbeitsschritten:

1. Absättigung der Membran (Blockieren)
2. Antikörper-Markierung
3. Visualisierung.

An die Membran binden nicht nur die Proteine aus dem Gel sondern auch Andere wie z. B. Nachweisantikörper. Um unspezifische und freie Proteinbindestellen abzudecken (*Blockieren*) wird die Membran zuerst mit irrelevanten Proteinen inkubiert. Hierzu eignen sich BSA, entfettetes Milchpulver oder Gelatine. Anionische Detergenzien (z. B. Tween 20) ergänzen gut die Blocker.

Die eigentliche Detektion des relevanten Proteins erfolgt mit einer indirekten *Antikörper-Markierung* (Abb. 2). Die auf eine Membran geblotteten Proteine werden von einem antigenspezifischen, unmarkierten *Primär-Antikörper* selektiv erkannt (Schritt 1). Ein speziesspezifischer, markierter *Sekundär-Antikörper* bindet an den konstanten Teil des Primärantikörpers (Schritt 2) und weist so indirekt das gesuchte Protein nach. Dieser Signalverstärkungseffekt steigert die Sensitivität des Western Blots. Die Spezifität der späteren Immunfärbung hängt von den Spezifitäten der Antikörper und auch von der Verdünnung der Antikörper-Lösung ab. Die Inkubationszeiten der Antikörper mit dem Blot richten sich nach der Menge von Antigen und der Affinität der Antikörper.



Skizze der Chemilumineszenz-Detektion

Die Art der *Visualisierung* wird von der an den Sekundär-Antikörper konjugierte Markierung bestimmt. Entweder ist das Nachweisreagenz direkt sichtbar (radioaktive oder fluoreszierende Markierung) oder es handelt sich um eine indirekte Visualisierung (Enzymreaktionen). Entsprechende Enzyme sind die Alkalische Phosphatase und die Meerrettichperoxidase. Bei der jeweiligen Nachweisreaktion katalysiert das gekoppelte Enzym die Umsetzung eines entsprechend zugegebenen Substrates in ein farbiges oder lumineszierendes Produkt. Das durch Oxidation von Luminol entstehende Licht (*Chemilumineszenz*) wird über einen Film gemessen. Blots können mehrmals mit verschiedenen Antikörpern angefärbt werden. Nach der Detektion werden Primär- und Sekundär-Antikörper durch *Strippen* (Lösung enthält β -Mercaptoethanol und SDS) abgewaschen und der Nachweis beginnt wieder mit dem Blockieren.

Quantitative Proteomics – iTRAQ labeling

Proteomics refers to a methodology that studies, qualitatively and quantitatively, the proteomes. Mark Wilkins in 1994 coined the word “proteome” as all proteins present in a defined biological system (cell/tissue/organism) at a distinct time point under a specific condition. Technological advancements in the last decades, in particular mass spectrometry-based technologies, now allow the quantitative analysis with good reproducibility and high proteome coverage. One example is the iTRAQ based proteomics approaches to elucidate expression differences within proteomes.

The iTRAQ-based quantitative strategy involves the labeling of peptides using isobaric tags, the iTRAQ reagents. The label is composed of a peptide reactive group and an isobaric tag of 145 Da, which consists of a balancer group and a reporter group. ITRAQ reagents allow the simultaneous measurement of eight samples in one experiment. Protein samples are reduced and blocked prior digestion. After trypsin digestion peptides are labeled with one of the iTRAQ reagents (Fig. 1). Then, the samples can be pooled and fractionated by liquid chromatography in order to reduce sample complexity and thereby increase the number of identified peptides/proteins and their relative quantification. Whereas the same peptide species in different samples are labeled with different iTRAQ reagents, they all have the same physio-chemical properties, i.e. they have the same precursor mass as measured by the first stage mass spectrometer, and the same retention time on the liquid chromatography column. These features greatly reduce the technical variations across the 8 samples. When a peptide is subjected to collision-induced fragmentation, 8 distinct reporter ions (corresponding to the specific iTRAQ labels from the 8 different samples) alongside a single daughter ion spectrum will be generated (Fig. 2a). The peak intensities of the reporter ions can be used for relative quantification, while the daughter ion spectrum is used for protein identification (Fig. 2b). A single protein may be identified and quantified by multiple peptides, thereby enhancing confidence in both identity and abundance.

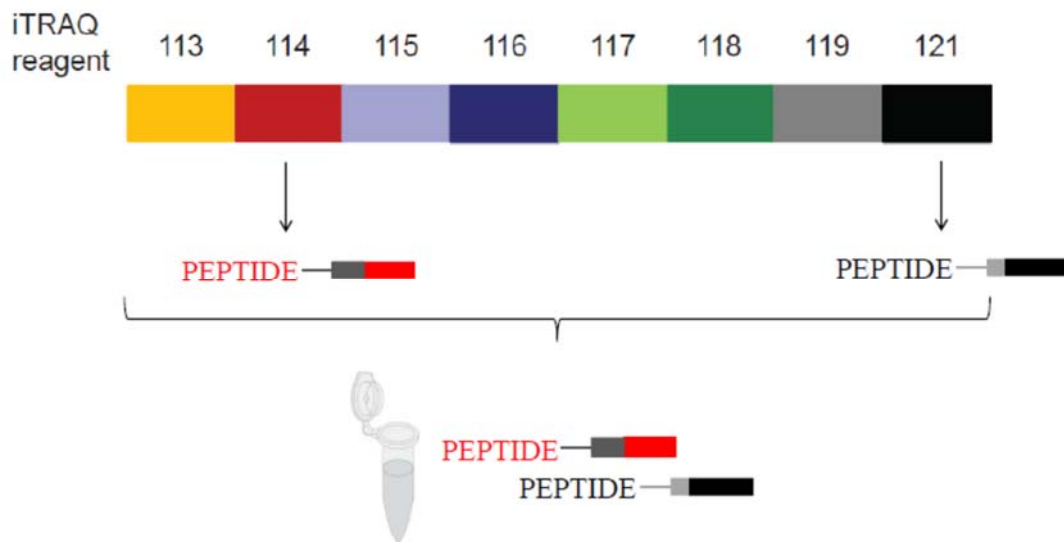


Fig. 1: iTRAQ labeling. Mittels dem iTRAQ Reagent 8plex Kit können bis zu acht Proben gleichzeitig vermessen werden. Nach der parallelen Denaturierung der Proteine, Reduzierung und Blockierung der Cysteinreste und dem anschließenden Verdau werden die Peptide einer Probe mit einem spezifischen iTRAQ-Reagenz markiert. Dann könne alle Proben vermisch werden.

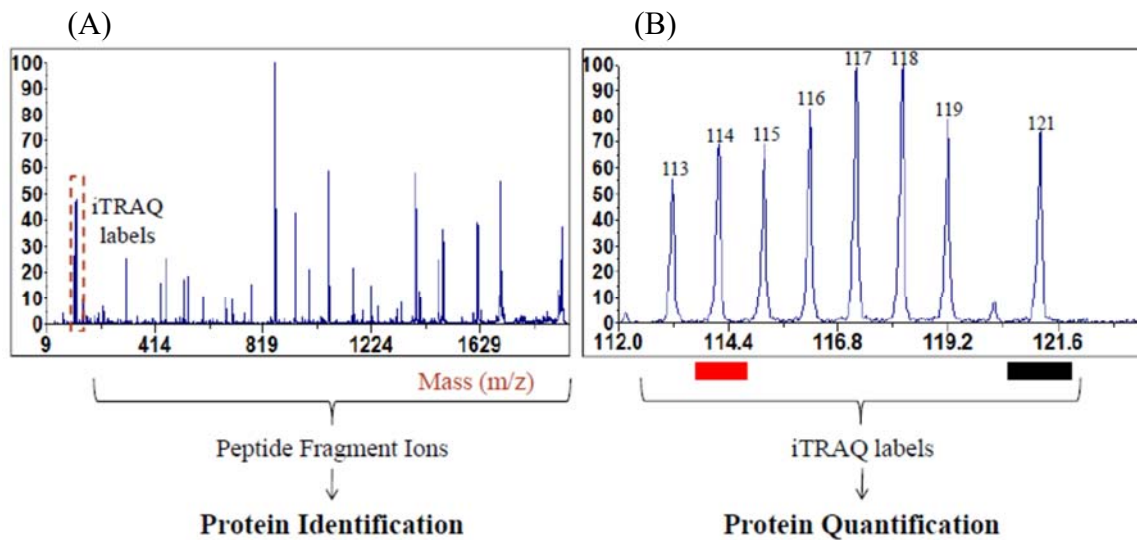


Fig. 2: Typisches Tandem-MS-Spektrum eines iTRAQ markierten Peptides. (A) Die Peptide werden mittels MALDI-TOF-TOF analysiert, wobei die Aminosäuresequenz durch das Fragmentationmuster bestimmt wird und somit das entsprechende Protein identifiziert werden. (B) Während der Fragmentierung im Massenspektrometer entstehen auch die Reporterionen, deren Intensität für die Ermittlung der relativen oder absoluten Menge genutzt werden (Zoom in den niedrigeren molekularen Bereich des Spektrums).

Anhang II:

Richtlinien für die Erstellung des Praktikumsprotokolls:

- während des gesamten Praktikums arbeiten die Studenten in Zweiergruppen
 - jede „Zweiergruppe“ hat für die praktischen Arbeiten **ein** Protokoll anzufertigen und dieses am Ende des Kurses dem jeweiligen Betreuer zu übergeben
 - das Protokoll kann in gedruckter und/oder elektronischer Form eingereicht werden
 - in elektronischer Form werden die Formate „pdf“ und „doc/docx“ akzeptiert (Computerarbeitsplätze können in begrenztem Umfang durch das Institut zur Verfügung gestellt werden)
 - die formelle Bestätigung des Praktikums kann erst nach der finalen Akzeptanz des Protokolls durch den Betreuer erfolgen
 - für die Erstellung des Protokolls sind folgende Richtlinien einzuhalten:
1. Gliederung des Protokolls in die jeweiligen Experimente (keine chronologische, sondern inhaltliche Anordnung!)
 2. Kurze Einleitung in das Experiment (Redundanzen zum Praktikumskript vermeiden)
 3. lückenlose Kurzdokumentation der durchgeführten Arbeiten (insbesondere müssen alle Berechnungen, z.B. bei Verdünnungen oder bei der Herstellung von Puffern und Lösungen und die primären Meßdaten dokumentiert werden) – auch hier bitte generell Redundanzen zum Praktikumskript vermeiden!
 4. Darstellung der Ergebnisse in Form von Bilder (Durchlichtscanner!), Graphiken oder Tabellen (die Abbildungen müssen korrekt beschriftet und mit Legenden versehen sein)
 5. Ausführliche Interpretation der Ergebnisse
 6. Fehlerdiskussion zum jeweiligen Experiment

Sicherheitsdatensätze:

Acrylamid:	R 45, 46, 20/21, 25, 36/38, 43, 48/23/24, 62 S 53, 45
EDTA:	R 22-36/37/38 S 26-36
DTT:	R 22, 36/38
Na-Pyrophosphate:	R 36/37/38 S 26-36
Na-Molybdate:	R 36/37/38 S 26-36
Na-Fluoride:	R 25-32-36/38 S 22-36-45
Na- Vanadate:	R 25-36/37/38 S 37-45
PMSF:	R 34 S 26-36/37/39-45
β-Mercaptoethanol:	R 20/22-24-34-51/53 S 26-36/37/39-45-61
Methanol:	R 11-23/24/25-39 S 16-36/37-45-7
Essigsäure:	R 10-35 S 23-26-45
Ethidiumbromide:	R 22/26/36/37/38/68 S 26/ 28.2/36/37/45
Temed:	R 11-20/22-24-34 S 16-26-36/37/39-45
PMSF:	R 34 S 26-36/37/39-45