

8. Identifizierung eines Proteins über eine Antigen-Antikörper-Reaktion im Western-Blot

8.1 Einführung in die Problemstellung

Es ist möglich, Substanzen aus pflanzlichen, tierischen und menschlichen Zellen mit Hilfe spezifischer Immunreaktionen zu bestimmen. Dabei wird die Wechselwirkung von Antikörpern mit Antigenen ausgenutzt. Die Reaktion zwischen Antikörpern und Antigenen ist hochspezifisch. Antikörper können unter 10^8 ähnlichen Molekülen ein ganz bestimmtes Antigen gezielt herausfinden. Das bedingt die gute Einsetzbarkeit von Antikörpern als molekulare Sonden zur Identifizierung bestimmter Moleküle in Zellen, Geweben und biologischen Extrakten.

Antikörper (oder Immunglobuline) sind die antigenspezifischen Produkte von B-Zellen. B-Zellen sezernieren Antikörper, wenn sie durch das spezifische Antigen stimuliert werden. Die spezifische Aktivität des Antikörpers gegenüber dem Antigen gilt nicht für das gesamte makromolekulare Antigen, sondern nur für eine spezielle Region, die als antigene Determinante oder Epitop bezeichnet wird. Die antigenbindende Region ist von Antikörper zu Antikörper sehr verschieden. Sie bildet deshalb die sogenannte variable Region des Antikörpers. Die Region, die für die Immunabwehr und damit für den Wirkungs- und Effektormechanismus verantwortlich ist, variiert nicht in gleicher Weise und heißt daher konstante Region. Es gibt 5 Hauptformen (Isotypen) von Immunglobulinen, die auf die Aktivierung unterschiedlicher Immunwirkungsmechanismen spezialisiert sind - Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin E (IgE).

Alle Antikörper sind aus 4 Polypeptidketten aufgebaut. IgG-Antikörper, die typisch für die Struktur von Immunglobulinen sind, bestehen aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten. Die Gestalt ähnelt insgesamt einem 'Y' (Abb. 1). Jede der 4 Ketten besitzt an ihrem Aminoende die variable Region mit der Antigen-Bindungsstelle. Die sich daran anschließende konstante Region bestimmt im Fall der schweren Kette den Isotyp und damit die funktionelle Eigenschaft des Antikörpers. Die leichten Ketten sind über Disulfidbrücken an die schweren Ketten gebunden. Die variablen Regionen der leichten und schweren Ketten bilden Paare, so daß zwei identische antigenbindende Stellen an den Spitzen der Arme des 'Y' entstehen. Das Bein des 'Y' besteht aus den beiden C-terminalen Domänen der schweren Ketten. Die Arme des 'Y' sind über eine flexible Gelenkregion mit dem Bein des 'Y' verbunden.

Die Sequenzvariabilität ist nicht gleichmäßig über die variablen Regionen verteilt. Es gibt drei besonders variable Regionen, die die Bereiche der Aminosäuren 28-35, 49-59 und 92-103 umfassen. Diese Bereiche werden als hypervariable Regionen bezeichnet. Die hypervariablen Regionen der schweren und leichten Ketten liegen nebeneinander und bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle an den Spitzen der Arme des 'Y'. Sie bestimmen die Spezifität der Antikörper. Andere Teile der variablen Region spielen beim direkten Kontakt mit dem Antigen kaum eine Rolle. Sie liefern aber ein strukturelles Gerüst für die hypervariablen Schleifen.

Die Wechselwirkung zwischen dem Antikörper und dem Antigen erfolgt über nicht kovalente Bindungen. Elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals Kräfte tragen zur Bindung bei. Antikörper gegen native Proteine binden gewöhnlich an die Oberfläche dieser Proteine.

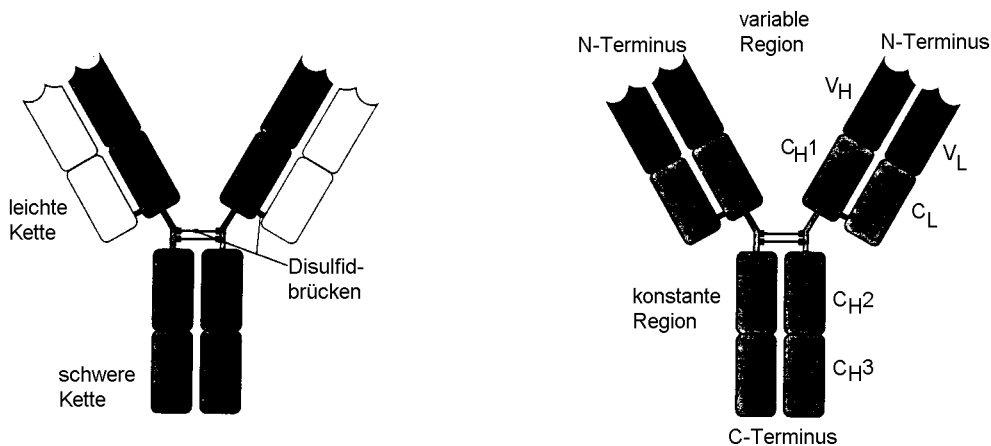


Abb. 1: Y-Gestalt der Immunoglobuline. Zwei schwere und zwei leichte Polypeptidketten sind über Disulfidbrücken so verknüpft, daß jede schwere mit einer leichten Kette und die beiden schweren Ketten miteinander verbunden sind. Der N-Terminus jeder Kette ist variabel, die übrigen Domänen sind konstant. Die beiden Domänen der leichten Kette heißen V_L und C_L, die der schweren Ketten V_H, C_H, C_H2 und C_H3.

Mit Hilfe von Immunreaktionen lassen sich sowohl Antigene als auch Antikörper nachweisen und quantitativ bestimmen. Eine mögliche Nachweismethode ist die Präzipitationstechnik, bei der die Antikörper mit den Antigenen quervernetzen und als Antigen-Antikörper-Komplex ausgefällt werden. Diese Methode kommt nur noch selten zur Anwendung. Heutzutage üblicher ist der Nachweis des gebildeten Immunkomplexes mit markierten Antikörpern oder Antigenen. Allgemein durchgesetzt hat sich die Markierung der Antikörper. Sie erfolgt üblicherweise mit Radioisotopen, Enzymen oder fluoreszierenden Farbstoffen.

Ein allgemeineres Verfahren, das die Markierung eines jeden Antikörpers umgeht, ist der Nachweis gebundener, unmarkierter Antikörper mittels eines markierten Antikörpers, der für alle Immunoglobuline spezifisch ist. Immunoglobuline wirken wie alle übrigen Proteine immunogen, wenn sie in eine fremde Spezies übertragen werden. Die Anti-Immunoglobulin Antikörper, die auf diese Weise entstehen, erkennen die konstanten Domänen, die in allen Immunoglobulinen vorkommen. Nach ihrer Markierung sind sie als allgemeine Sonden für gebundene Antikörper einsetzbar.

Die Immunreaktion zwischen Antikörper und Antigen ist ein wichtiges Hilfsmittel zur Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen. Eine in diesem Zusammenhang sehr häufig angewendete Methode ist das Western-Blotting. Damit kann ein bestimmtes Antigen aus einer komplexen Proteinmischung herausgefunden werden. Hierzu werden die Proteine in dem Gemisch durch Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Nitrozellulose wird dann im direkten Test mit einem radioaktiv-, enzymatisch- oder mit einem Fluoreszenzchromophor markierten Antikörper inkubiert bzw. im indirekten Test mit einem unmarkierten ersten Antikörper und einem markierten zweiten Antikörper. Nach der Entwicklung der enzymatischen, radioaktiven oder Fluoreszenzmarkierung wird die Antigenbande sichtbar, während alle anderen Proteinbanden unsichtbar bleiben.

8.2 Aufgabenstellung und Versuchsdurchführung

Im Serum von Kaninchen sind die Immunglobuline über eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit der Western-Blot Technik nachzuweisen. Dazu sind die folgenden Arbeitsgänge auszuführen:

- Auftrennung der Proteine im Serum von Kaninchen in der SDS-Elektrophorese;
- Blotten der elektrophoretisch getrennten Proteine auf Nitrozellulose;
- Nachweis der Immunglobuline durch eine Immunreaktion mit einem entsprechend markierten Antikörper und Abschätzung ihrer Molmasse.

8.2.1 SDS-Elektrophorese

In der SDS-Elektrophorese werden Proteine ausschließlich auf der Basis ihrer Molmasse aufgetrennt. Durch die Inkubation mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die unterschiedlichen Eigenladungen kompensiert. Es entstehen Anionen mit derselben Nettoladung. Außerdem werden Unterschiede in der Tertiärstruktur ausgeglichen, indem alle Proteinmoleküle gleichförmig gestreckt werden. Zur Reduktion von Disulfidbrücken werden Thiolreagenzien verwendet.

Bei der Elektrophorese in einem Polyacrylamidgel, das wie ein Molekularsieb wirkt, sind die relativen Mobilitäten der SDS-Protein-Komplexe proportional zum Logarithmus der Molmasse. Mit Hilfe von parallel aufgetrennten Markerproteinen lassen sich über eine Eichkurve die Molmassen unbekannter Proteinproben ermitteln.

Die SDS-Elektrophorese wird als Horizontalelektrophorese in ultradünnen 12.5 %igen Polyacrylamidfertiggelen ausgeführt.

Vor der Elektrophorese werden die Proteinproben (Kaninchenserum) unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen wie folgt mit SDS denaturiert:

5 mg SDS werden in 0.1 ml Probenpuffer und 1.9 mg DTT in 0.5 ml Probenpuffer gelöst. Der Probenpuffer ist ein 0.05 M Tris/HCl Puffer, pH 7.6.

Von der 5 %igen SDS Stammlösung werden jeweils 2 µl zu 10 µl des Kaninchensersums sowie des Molekulargewichtsstandards und von der 25 mM DTT Stammlösung ebenfalls jeweils 2 µl hinzugefügt, sofern unter reduzierenden Bedingungen denaturiert wird. Bei der Denaturierung unter nicht reduzierenden Bedingungen wird das DTT weggelassen.

Von dem Kaninchenserum wird jeweils eine Probe mit und eine Probe ohne DTT denaturiert. Die Probelösungen werden 5 min bei 95 °C denaturiert. Danach werden erneut 2 µl der DTT Stammlösung zu den bereits DTT enthaltenden Proben zugesetzt und zu allen Proben jeweils 1 µl einer Bromphenolblau-Lösung. Die so vorbehandelten Proteinproben und der Molekulargewichtsstandard werden auf das Fertiggel aufgetragen.

Das Fertiggel wird vor dem Probenauftrag auf die Kühlplatte der Multiphorelektrophoresekammer gelegt, nachdem die Kühlplatte zuvor mit wenig Kerosin als Kontaktflüssigkeit beschichtet wurde. Die Fertigele werden mit der Folienseite nach unten aufgelegt. Luftblasen müssen vermieden werden. Auf das Gel sind anschließend der Anoden- und der Kathodenpufferstreifen aufzulegen. Dieser Arbeitsgang ist mit befeuchteten Gummihandschuhen auszuführen. Danach sind die vorbereiteten Proteinproben zügig aufzutragen. Anschließend wird die Elektrodenhalterplatte mit den Füßen in die kleinen Vertiefungen der Multiphorkammer aufgesetzt und die Elektroden so fokussiert, daß sie sich über den Pufferstreifen befinden. Darauf wird die Elektrodenhalterplatte mit den Füßen in die größere Vertiefung eingesetzt.

Dabei bekommen die Platindrähte mit den Pufferstreifen Kontakt. Nach dem Schließen des Sicherheitsdeckels ist die Stromversorgung in Gang zu setzen.

Achtung!! Die Elektrophoresekammer nur in Gegenwart eines Assistenten an das elektrische Netz anschließen.

Die elektrophoretische Auftrennung wird bei einem Fertiggel der Größe 245 x 110 x 0.5 mm unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Phase 1: 600 V, 30 mA, 30 W, 30 min

Phase 2: 600 V, 50 mA, 30 W, 60 min

Die entsprechenden Parameter sind am Stromversorgungsgerät einzuprogrammieren.

Nach Beendigung der Elektrophorese werden das Stromversorgungsgerät abgeschaltet, der Sicherheitsdeckel geöffnet und die Elektrodenstreifen abgenommen.

Es schließt sich der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran an.

8.2.2 Semidry-Blotting

Beim *Blotting* werden Proteine oder Nukleinsäuren auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran übertragen. Man verwendet diese Methode nach der elektrophoretischen Auftrennung zum Nachweis spezieller Fraktionen mittels immunologischer Methoden oder anderer spezifischer Ligandenbindungen. Diese Vorgehensweise ist erforderlich, weil die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine oder Nukleinsäuren in den Gelen für hochmolekulare Nachweissubstrate wie Antikörper, DNA oder RNA nicht zugänglich sind. Sie werden deshalb durch einen elektrischen Transfer auf eine Blotfolie übertragen, auf der sie an der Oberfläche hängen bleiben und für die Nachweisreagenzien zugänglich sind. Für den elektrischen Transfer hat sich in den letzten Jahren das Semidry-Verfahren durchgesetzt.

Beim Semidry-Blotting werden Gel und immobilisierende Membran zwischen in Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt, die direkten Kontakt zu zwei Graphitplatten mit hoher Leitfähigkeit haben. Der prinzipielle Blot-Aufbau ist in der Abb. 2 schematisch gezeigt.

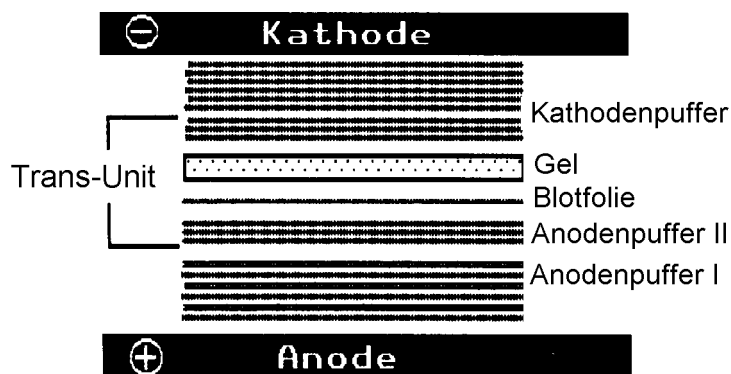


Abb. 2: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus beim Semidry-Blotting Verfahren

Das Semidry-Blotting Verfahren umfaßt die folgenden Arbeitsgänge:

Herstellen des diskontinuierlichen Puffersystems.

Anodenpuffer I (250 ml):

0.3 M Tris

20 % (v/v) Methanol

Anodenpuffer II (250 ml):

25 mM Tris

20 % (v/v) Methanol

Kathodenpuffer (250 ml):

40 mM 6-Aminohexansäure

0.01 % (g/v) SDS

20 % (v/v) Methanol

Anoden- und Kathoden-Graphitplatte mit dest. Wasser sättigen, überschüssiges Wasser mit saugfähigem Papier entfernen.

Jeweils 9 Filterpapiere für Anode und Kathode sowie 1 Blotfolie auf Gelgröße zuschneiden.

Anodenpuffer I in Färbeschale gießen. 6 Filterpapiere langsam durch Kapillarwirkung vollsaugen lassen und auf die anodische Graphitplatte legen.

Anodenpuffer II in Färbeschale gießen und das Elektrophoresegel (Kerosin von der Folienseite abtupfen!) mit der Oberseite nach unten für 30 sec im Anodenpuffer II äquilibrieren.

Trägerfolie vom Gel mit dem Film-Remover abtrennen. Dazu das Gel mit der Folienseite nach unten auf den Remover auflegen. Blotfolie kurz in Anodenpuffer II tränken und auf das Gel auflegen. Weiterhin 3 Filterpapiere mit Anodenpuffer II äquilibrieren und auf die Blotfolie auflegen.

Kühlplatte aus der Elektrophoresekammer nehmen und Anodenplatte einsetzen, Kabel einstecken.

Gel mit Blotfolie und Anodenfilterpapieren auf Filterpapierstapel in der Anodenplatte auflegen.

Kathodenpuffer in Färbeschale gießen und 9 Filterpapiere damit durchtränken. Vom Elektrophoresegel langsam und vorsichtig, an einer Ecke beginnend, die Folie abtrennen. Darauf die durchfeuchteten 9 Filterpapiere plazieren. Anschließend die eingeschlossenen Luftblasen mit einem Handroller herauswalzen.

Kathodenplatte auf den Blotstapel aufsetzen, Kabel anstecken.

Sicherheitsdeckel auf Elektrophoresekammer aufsetzen und Stromversorger anschließen. Unter den folgenden Bedingungen den Transfer ausführen (0.5 mm dünnes ExcelGel, 250 cm²):

200 mA, max. 10 V, max. 5 W.

Unter diesen Einstellbedingungen ergeben sich annähernd die folgenden Trennkonditionen:

200 mA, 3 V, 1 W.

Die Transferzeit beträgt bei Einhaltung dieser Bedingungen 1 Stunde.

Nach Beendigung des Transfers wird der Stromversorger abgeschaltet, das Kabel aus dem Netz gezogen sowie der Sicherheitsdeckel und die Kathodenplatte abgenommen.

Anschließend wird das Blot einer reversiblen Färbung mit einer 0.1 %igen Lösung von Fast Green in 1 %iger Essigsäure unterzogen. Nach einer Färbung von ca. 5 min wird der Teil der Blotfolie mit dem aufgetrennten Molekulargewichtsstandard abgeschnitten. Für die jeweiligen

Proteine des Standards werden die R_f -Werte bestimmt und daraus mit den zugehörigen Molmassen eine Eichkurve aufgestellt.

Die Blotfolie mit dem aufgetrennten Kaninchenserum wird mit dest. H_2O wieder entfärbt und in Alufolie über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.

8.2.3 Nachweis der geblotteten Immunoglobuline

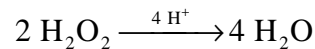
Vor der Antikörper-Reaktion werden die unbesetzten Bindungsstellen auf der Blotfolie mit einem Tris/HCl/Tween-Puffer (TBS-T) blockiert. Dazu werden zunächst 500 ml des folgenden Puffers hergestellt:

50 mM Tris/HCl
120 mM NaCl
0.5 % Tween 20
pH 7.4

Zur vollständigen Blockierung wird diesem Puffer noch 1 % Rinderserumalbumin (BSA) zugesetzt und das Blot 1 h unter Schütteln in dem TBS-T/BSA Puffer inkubiert. Danach anschließend wird das Blot einmal 15 min und zweimal jeweils 5 min in dem TBS-T Puffer gewaschen. Darauf erfolgt eine 1-stündige Inkubation mit der Anti-Immunoglobulin Antikörperlösung. Die Antikörperlösung wird 1:1000 mit einem TBS-T Puffer, der nur 0.05 % Tween 20 und 1 % BSA enthält, verdünnt.

Anschließend wird das Blot wiederum einmal 15 min und zweimal jeweils 5 min in dem TBS-T Puffer gewaschen. Danach erfolgt die Detektion des Antigen-Antikörperkomplexes mit der Peroxidasereaktion.

Das Anti-Immunoglobulin ist mit Meerrettich-Peroxidase markiert, die mit 4,4'-Difluoro-3,3'-dinitrophenylsulfon an das Protein gekoppelt ist. Das Enzym katalysiert die folgende Reaktion:



Die Reaktion läuft nur in Gegenwart eines Elektronendonators ab. Als Elektronendonator fungiert 4-Chloronaphthol, das selbst bei der Reaktion oxidiert wird. Das Oxidationsprodukt bildet an der Stelle der Antikörperbindung eine gefärbte Bande.

Die enzymatische Reaktion wird folgendermaßen ausgeführt:

0.6 Volumenteile (0.6 ml) einer Lösung von 4-Chloronaphthol (3 mg 4-Chloronaphthol in 1 ml Methanol gelöst) werden in 10 Volumenteilen (10 ml) eines 0.01 M Tris/HCl Puffers pH 7.6 gelöst.

Diesem Reaktionsgemisch werden 0.004 Volumenteile (4 μ l) 30 %iges H_2O_2 zugesetzt.

Das Nitrozellulose-Blot wird 30 min mit dieser Reaktionslösung inkubiert und anschließend ausgewertet.

Aus den experimentell zu ermittelnden R_f -Werten der geblotteten Proteinantigene sind deren Molmassen abzuschätzen.

Zur Dokumentation des Ergebnisses ist das Blot zu kopieren. Die erhaltenen Ergebnisse sind ausführlich zu diskutieren.

8.3 Kontrollfragen

1. Was sind Antigene und Antikörper?

2. Welche Struktur besitzen Antikörper?
3. Welche Trennprinzipien werden bei der Elektrophorese in Agarose- und Polyacrylamidge-
len realisiert?
4. Auf welche Weise kann die Molmasse unbekannter Proteine mit Hilfe elektrophoretischer
Techniken bestimmt werden?
5. Was ist unter der Blotting-Technik zu verstehen und welche unterschiedlichen Methoden
existieren dafür?

8.4 Literaturhinweise

Westermeier, R. (1990) Elektrophorese-Praktikum Verlag Chemie, Weinheim, New York,
Basel, Cambridge.

Schickle, H., S. Gronau, G. Theßeling und R. Westermeier (1990) Qualitative und quantita-
tive Bestimmung von Proteinen mit der horizontalen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel-
Elektrophorese. Pharmacia