

F1-Praktikum Genetik

Protokoll Versuch 3: Klonierung, Reinigung und funktionelle Charakterisierung eines gegen CD7 gerichteten Immunotoxins
Gruppe 8, Manfred Depner & Susanne Duncker

Einleitung

Der hier protokollierte Versuch besteht aus zwei Teilen: Im ersten Teil stellten wir ein Protein her, das aus dem scFv-Fragment des CD7-bindenden Antikörpers und einer verkürzten Version des Pseudomonas-Exotoxins A besteht. Im zweiten Teil wurde das Protein in *E. coli* eingebracht und dort überexprimiert, affinitätschromatographisch gereinigt und anschließend auf sein Funktionieren hin getestet.

Material und Methoden

Das verwendete Material sowie die angewandten Methoden können dem ausgegebenen Skript auf den Seiten 29 – 47 entnommen werden.

Versuchsdurchführung

Zunächst wurde das CD7-ETA-Immunoxin aus zwei verschiedenen Plasmiden zusammenkloniert. Das eine Plasmid, pet27b-ETA', enthielt das ETA', das bakterielle Exotoxin A aus *Pseudomonas* – dieses Exotoxin ist jedoch verkürzt, Domäne A, die für die Bindung des Toxins an eukaryotische Zellen sorgt, ist abgespalten. Das andere Plasmid, pASK6-STREP-His-CD7-scFv, enthielt sowohl das CD7-scFv, das statt Domäne A an das ETA' kloniert werden und für die Anheftung an CD7-Oberflächenproteine sorgen soll, als auch einen STREP-tag, über den das fertig klonierte Immunotoxin am Ende aufgereinigt werden sollte, sowie einen 6x-His-tag, der für den Nachweis des Immunotoxins durch Western Blot nötig war. Das „Zusammenklonieren“ erfolgte wie im Skript beschrieben zunächst über einen Verdau beider Plasmide mit *NotI* und *XbaI*, die Verdauprodukte wurden auf ein Gel aufgetragen. Nach der Färbung der Banden schnitten wir die benötigten Banden aus. Wir benötigten aus dem pet27b-ETA'-Verdau die 6221 bp lange Bande (Vektor), wie wir anhand der Restriktionskarte feststellten. Die Restriktionskarte des pASK6-STREP-His-CD7-scFv-Plasmids zeigte uns, dass wir hier die 928 bp große Bande (Insert) brauchten. Das Gel wurde nach Ausschneiden der Banden fotografiert, das Bild befindet sich im Anhang.

Entsprechend der Anleitung der Firma Quiagen wurden die im Gel enthaltenen DNA-Banden mit einem Kit besagter Firma reisoliert und danach entsprechend der Anleitung im Skript ligiert. Es wurde auch eine Kontroll“ligation“ gemacht, bei der kein Insert zum Ligationsansatz gegeben wurde (s. Skript), um zu kontrollieren, ob in unserem Vektoreluat noch unverdauter bzw. einfach verdauter Vektor vorhanden war. Wäre dies der Fall gewesen, hätten die Enden religieren können, das Plasmid wäre abgelesen worden und es hätten sich Kolonien gebildet. Beide Ansätze wurden mit Bakterien elektroporiert, auf kanamycinhaltige Platten ausgebracht und über Nacht bebrütet – nur die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, hatten eine Kanamycinresistenz und konnten wachsen.

Gruppe	Kolonien Ligation	Kolonien Kontrolle
1	4	0
3	4	12
4	558	70
5	4	0
6	856	20
7	0	1
8	15	0

Unsere Gruppe hatte nur 15 Kolonien auf der Ligationsplatte und keine Kolonien auf der Kontrollplatte. Mit den Klonen der Ligationsplatte führten wir die auf S. 34 des Skripts beschriebene Miniprep durch. Um zu untersuchen, ob das Plasmid auch wirklich in die Kulturen eingebaut worden war, wurde der auf S. 34f des Skripts beschriebene Restriktionsverdau durchgeführt. Unsere Gruppe erhielt hier, wie man auf dem Gelbild sehen kann, leider kein Ergebnis. Ein positiver Klon hätte auf dem Gel jedoch vier Bänder ergeben, die 72 kb, 345 bp, 760 bp und 6015 bp groß gewesen wären. Ein negativer Klon sähe abweichend aus.

Auf unserem Gelbild ist der Standard in der Mitte ein einziger Schmier, was dadurch zu erklären wäre, dass wir zu viel Standard aufgetragen haben könnten. Die einzelnen Proben sind evtl. nicht verdaut worden – man sieht zwar Bänder, aber dies könnte daran liegen, dass ein Plasmid in linearer Form, als open circle sowie als covalently closed circle vorliegen kann und damit auch drei verschiedene Bänder ergeben kann. Die letzte Bande wäre zu erklären, wenn man annimmt, dass wir versehentlich sowohl den Vektor als auch das Insert in dieselbe Tasche pipettiert haben.

Wir transfizierten die Plasmide anderer Gruppen in Bakterien des Expressionsstammes BL21(DE3) ein. Dieser Stamm besitzt zwar das Gen für die T7-Polymerase, so dass das Plasmid, das unter der Kontrolle des T7-Promotors steht, prinzipiell abgelesen werden kann, doch das Gen für die T7-Polymerase wird vom lacZ-Promotor kontrolliert – durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) wird der lacZ-Promotor nicht mehr inhibiert → das Plasmid kann abgelesen werden, wodurch die Zellen jedoch im Wachstum zumindest behindert werden würden (auf dem Plasmid ist ja ein Toxin codiert).

Mit diesen Bakterien wurden Großkulturen mit einer oD von 0,2 angeimpft, deren Wachstum durch Messung der optischen Dichte überwacht wurde – bei einer gewissen optischen Dichte lösten wir nach der Anleitung im Skript osmotischen Stress aus. Nach weiterer Schüttelinkubation (siehe Skript) wurde die Expression des Plasmids durch Zugabe von IPTG induziert.

Während der Inkubation der Großkulturen wurden zu den Zeitpunkten T₀, T₁ und T₂₂ Proben entnommen und für den anschließenden Western Blot vorbereitet. Im Skript ist beschrieben, dass zu den Zeitpunkten T₀, T₂ und T₂₀ Proben entnommen werden sollten, doch unsere Bakterienkultur erreichte die benötigte optische Dichte erst so spät, dass wir, als wir kurz vor Verlassen des Praktikums die zweite oD nahmen, T₁ nehmen mussten. Am darauffolgenden Tag gab es erneut einige Schwierigkeiten, so dass wir statt der T₂₀ die T₂₂ nahmen.

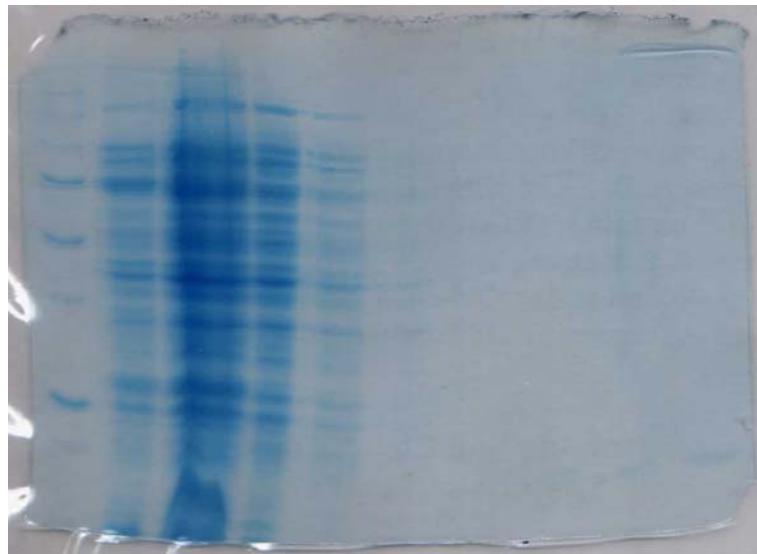
Zeitpunkt	oD-Wert
T ₀	0,2
T ₁	1,02
T ₂₂	2,24

Bei T₂₂ lysierten wir die Bakterien und reinigten das CD7-ETA'-Immunotoxin nach der Anleitung im Skript auf S. 36ff auf. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte jedoch nicht durch Ultraschall, sondern über eine Druckpumpe. Die Aufreinigung der so gewonnenen Proteine erfolgte affinitätschromatographisch über den STREP-Tag des Immunotoxins in einem Chromatographiesäulchen. Beim Aufreinigen entnahmen wir weitere Proben (Durchlauf, Waschfraktion 1 – 5, Elutionsfraktionen 1 – 4) für den Western Blot und das Coomassie-Gel, mit denen wir die Reinheit unseres Immunotoxins nachweisen wollten.

Am letzten Tag beluden wir die Gele und blotteten bzw. färbten die Gele, um sie auszuwerten.

Die Beladungsschemata waren wie folgt:

Coomassie-Gel: US – T₀ – T₂₂ – D – W₁ – W₅ – E₁ – E₂ – E₃ – E₄
(US: Biorad-Unstained standard (wird durch Coomassie gefärbt))



Western Blot: $T_0 - T_1 - T_{22} - PS - W_1 - W_5 - E_1 - E_2 - E_3 - E_4$
(PS: Biorad-Prestained standard)

Immunologische Detektion des Western-Blot

Wir trugen die gereinigten Proteine nach der Anleitung im Skript auf S. 38 auf eine Nitrozellulose-Membran auf. Die Färbung der Proteine erfolgte, anders als im Skript, folgendermaßen:

- der Western Blot färbt nur Proteine an, die einen 6x-His-tag enthalten (das Immunotoxin enthält diesen)
- der Blot wurde in 3% BSA in 15 ml TBS eine Stunde lang geschwenkt; dies diente dazu, den Antikörper derart zu blockieren, dass er nicht unspezifisch an der Membran bindet
- danach wurde 1:2000 maHis-Antikörper zur Blockierlösung gegeben und der Blot eine weitere Stunde lang geschwenkt; der maHis-Antikörper bindet an den 6x-His-tag
- wir wuschen den Blot dreimal mit TBS/Tween/Triton für je fünf Minuten; Tween/Triton reduziert die Oberflächenspannungen, wodurch die Membran besser benetzt werden kann
- mit TBS wurde der Blot ein weiteres Mal für fünf Minuten gewaschen
- 10 % Magermilchpulver in 15 ml TBS, darin Blot schwenken
- den Blot für eine weitere Stunde in 1:5000 gam-HRP-Antikörper schwenken
- erneutes Waschen, wie oben beschrieben
- mit den Betreuern wurde der Blot durch ECL entwickelt; dieses geschieht durch zwei Lösungen, wovon eine Luminol enthält, welches durch die HR-Peroxidase umgesetzt wird und somit Licht erzeugt; die andere Lösung enthält den Katalysator Wasserstoffperoxid → das Licht kann auf einem Film festgehalten werden

Ergebnisse und Fehlerdiskussion

Unsere Gruppe erhielt leider weder beim Coomassie-Gel noch beim Western Blot ein Ergebnis (siehe Bilder im Anhang).

Die Fehleranalyse lässt den Schluss zu, dass der Grund für das fehlende Immunotoxin vor dem Auftragen der Proben auf die Gele zu suchen ist, da sonst eine der beiden Methoden evtl. funktioniert hätte. Möglich wäre, dass wir beim Waschen den falschen Puffer gewählt haben und so das Immunotoxin beim Waschen verloren haben. Uns könnte auch ein Pipettierfehler unterlaufen sein, z.B. beim Resuspendieren der Matrix während der Aufreinigung – hätten wir die Matrix mit abgenommen, würde auch kein Immunotoxin nachweisbar sein. Beim Aufschließen der Bakterienzellen könnte der Aufschluss nicht geklappt haben, wodurch wir

die ganzen Zellen nach der Zentrifugation im Pellet gehabt hätten und keine Proteine im Überstand gewesen wären. Es wäre auch denkbar, dass aus uns unbekannten Gründen das IPTG nicht das Ablesen des Plasmids induzierte.

Zytotoxizitätstest

Für den Zytotoxizitätstest verwendeten wir nicht das selbst hergestellte Immunotoxin, was aufgrund der Ergebnisse des Western Blots und des Coomassie-Gels unsinnig gewesen wäre, sondern eine Elution von Gruppe 1.

Wir trugen in einer 24-Well-Platte, in der 1,5 ml Zellen pro Well in einer Konzentration von $2,25 \times 10^5$ Zellen pro ml waren, 20 μl Probe in drei Wells auf (Schema wie folgt):

Well Nr.	aufgetragene Probe (20 μl)	im Well enthaltene Zellen
1	CD7-ETA'-Immunotoxin	CEM CD7 ⁺ T-Zellen
2	Elutionspuffer	CEM CD7 ⁺ T-Zellen
3	CD7-ETA'-Immunotoxin	SEM CD7 ⁻ B-Zellen

Drei Tage später überprüften wir die Wells und sahen folgende Ergebnisse: Das DMEM-Medium in Well 2 und 3 färbte sich bereits gelb, ein Zeichen, dass die Zellen in diesen Wells Stoffwechsel betrieben und damit lebten. Das Medium in Well 1 war so rot wie am Tag zuvor, weswegen wir schlossen, dass die Zellen tot waren.

In Well 1 sollten die Zellen sterben, da das Immunotoxin, das spezifisch an CD7-Antigene bindet, die auf diesen T-Zellen vorhanden sind, die Zellen töten sollte.

In Well 2 wurde überprüft, ob die Zellen in Well 1 vielleicht wegen unsauberer Arbeitens, also verschmutztem Elutionspuffer, starben – wäre dies der Fall, so würde der Elutionspuffer die Zellen töten, was nicht der Fall war.

In Well 3 wurde überprüft, ob das Immunotoxin spezifisch gegen CD7⁺-Zellen wirkt – würde das Immunotoxin gegen jede beliebige Zelle wirken, so würden die CD7⁻-B-Zellen in Well 3 ebenfalls sterben, was sie nicht taten → das Immunotoxin wirkt CD7⁺-spezifisch.

Frage: Was bewirkt der CD7-spezifische monoklonale Antikörper?

Der CD7-spezifische monoklonale Antikörper dient dazu, das Immunotoxin nur an bestimmte Antigene, nämlich die CD7-Antigene, die auf Krebszellen vermehrt vorkommen, zu binden und somit eine gerichtete Toxinbehandlung durchzuführen.

Frage: Wozu dient der Isotyp-Antikörper?

Der Isotypantikörper dient zur Kontrolle der Spezifität. Würden die mit Isotypantikörper behandelten Zellen ebenfalls sterben, so läge die Wirksamkeit des Immunotoxins nicht an der Spezifität des CD7-Antikörpers, sondern allein am ETA'.