

Immuno-Affinitätschromatographie

Antikörper in der Molekularbiologie

Theorie

Prinzip

Wenn mit biologischem Material gearbeitet wird, besteht immer das Problem, dass dieses aus einer riesigen Vielfalt aus verschiedensten Biomolekülen besteht.

Stellt man mit Hilfe von Bakterien ein synthetisches Protein her¹- beispielsweise einen Enzyminhibitor für ein Medikament – so muss das Protein nach dem Aufschluss der Bakterien aus dem hochkomplexen Bakterienlysate gereinigt werden.

Wie soll man aus Tausenden von Biomolekülen ein Protein isolieren, das vielleicht nur 1% des Protein-Gesamtgewichts ausmacht? Wie können Moleküle genügend spezifisch erkannt werden?

In der Immuno – Affinitätschromatographie nutzt man die Fähigkeit des Immunsystems, fremde Molekülstrukturen mit Hilfe von Antikörpern hochspezifisch zu erkennen. Die Erkennung erfolgt mit der variablen Domäne des Antikörpers („Spitze“ des Ypsilon-förmigen Antikörpermoleküls), die genau zu einem bestimmten Epitop des gesuchten Proteins passt. Man spricht dabei auch von Antigen/ Antikörper – Erkennung und – Bindung.

Gewinnung von Antikörpern

Bis vor einigen Jahren war man darauf angewiesen, lebendige Tiere zur Gewinnung von Antikörpern zu verwenden. Dabei wurde das betreffende Protein einem Tier injiziert, das nach einer gewissen Zeit Antikörper dagegen produzierte, die anschliessend aus dem Blut isoliert werden mussten. Die Nachteile dieses Vorgehens liegen auf der Hand: Grosser zeitlicher und finanzieller Aufwand, wechselnde Qualität der Antikörper (Spezifität, Bindungsstärke, Heterogenität, da man so *polyklonale* Antikörper erhält), und natürlich auch ethische Bedenken.

Aus diesem Grund ist man dazu übergegangen, Antikörper mit definierter AS-Sequenz und damit auch einheitlichen Bindungseigenschaften herzustellen. Zunächst verwendete man dazu einheitliche Zelllinien („monoklonale Antikörper“); natürliche Antikörper aus Organismen haben bei der Verwendung zur Proteinreinigung zusätzlich noch zwei entscheidende Nachteile:

¹ Vorgehen: Einsetzen des Gens für das gewünschte Protein in ein Bakterienplasmid/ Wachstum der Bakterien/ Abtöten der Bakterien und Aufschluss/ Isolierung des Proteins aus dem Bakterienlysate

1. Sie bestehen aus vier verschiedenen Proteinketten. Diese sind zwar durch zwischenmolekulare Kräfte stabil miteinander verbunden, müssen aber bei der Herstellung zuerst mal zueinander finden – und können auch wieder auseinanderfallen.
2. Neben der Erkennungs-Funktion haben natürliche Antikörper auch noch eine Effektor-Funktion, da sie im Organismus die Immunantwort auslösen müssen. Der dazugehörige Proteinbereich (Senkrechter „Grundast“ des Ypsilon-förmigen Antikörpermoleküls) kann in der Reinigungsfunktion störend wirken.

Aus diesem Grund bestehen die molekularbiologisch verwendeten Antikörper heute meist nur noch aus dem variablen Teil eines Antikörpers („Seitenast“ des Ypsilon-förmigen Antikörpermoleküls). Da dieser natürlicherweise aus den Enden von zwei verschiedenen Proteinketten besteht (leichte und schwere Kette), wurden diese zusätzlich noch kovalent miteinander verknüpft. Sinnvollerweise werden solche Antikörper mit der Abkürzung **scFv** bezeichnet (single chain Fragment - variable).

Es war ein entscheidender Schritt der Molekularbiologie, die Basensequenz für die Gene solcher scFv's zu finden, und die entsprechenden Antikörpermolekülfragmente durch bakterielle Produktion verfügbar zu machen. So ist heute eine Vielzahl von Antikörperfragmenten erhältlich, die jeweils an eine ganz bestimmte kurze Aminosäuresequenz („Epitop“) hochspezifisch binden, deren Sequenz bekannt ist.

Bei der Reinigung von molekularbiologisch hergestellten Proteinen werden heute meistens solche scFv's verwendet.

Wie aber können solche Antikörper verwendet werden, um Proteine zu reinigen, deren Struktur nicht zur Erkennungsstelle dieser Antikörper passt?

Das elegante Prinzip dieser neuen Methode besteht darin, *das Gen für das gewünschte Protein mit der Basensequenz für ein Antikörper-Epitop zu ergänzen.*

Nach der bakteriellen Produktion kann das Protein – das am Ende seiner Struktur die zusätzlichen Aminosäuren des sog. Epitop-Tags aufweist – anschliessend einfach und effizient mit Hilfe des dazu passenden Antikörper isoliert werden.

Natürlich muss bei der Wahl des epitop-Tags darauf geachtet werden, dass die zusätzlichen Aminosäuren die Funktion des gesuchten Proteins möglichst nicht verändern.

Der meistverwendete Epitop-Tag heisst *His-Tag* und besteht einfach aus sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Aminosäuren: His-His-His-His-His-His-

Immuno-Affinitätschromatographie

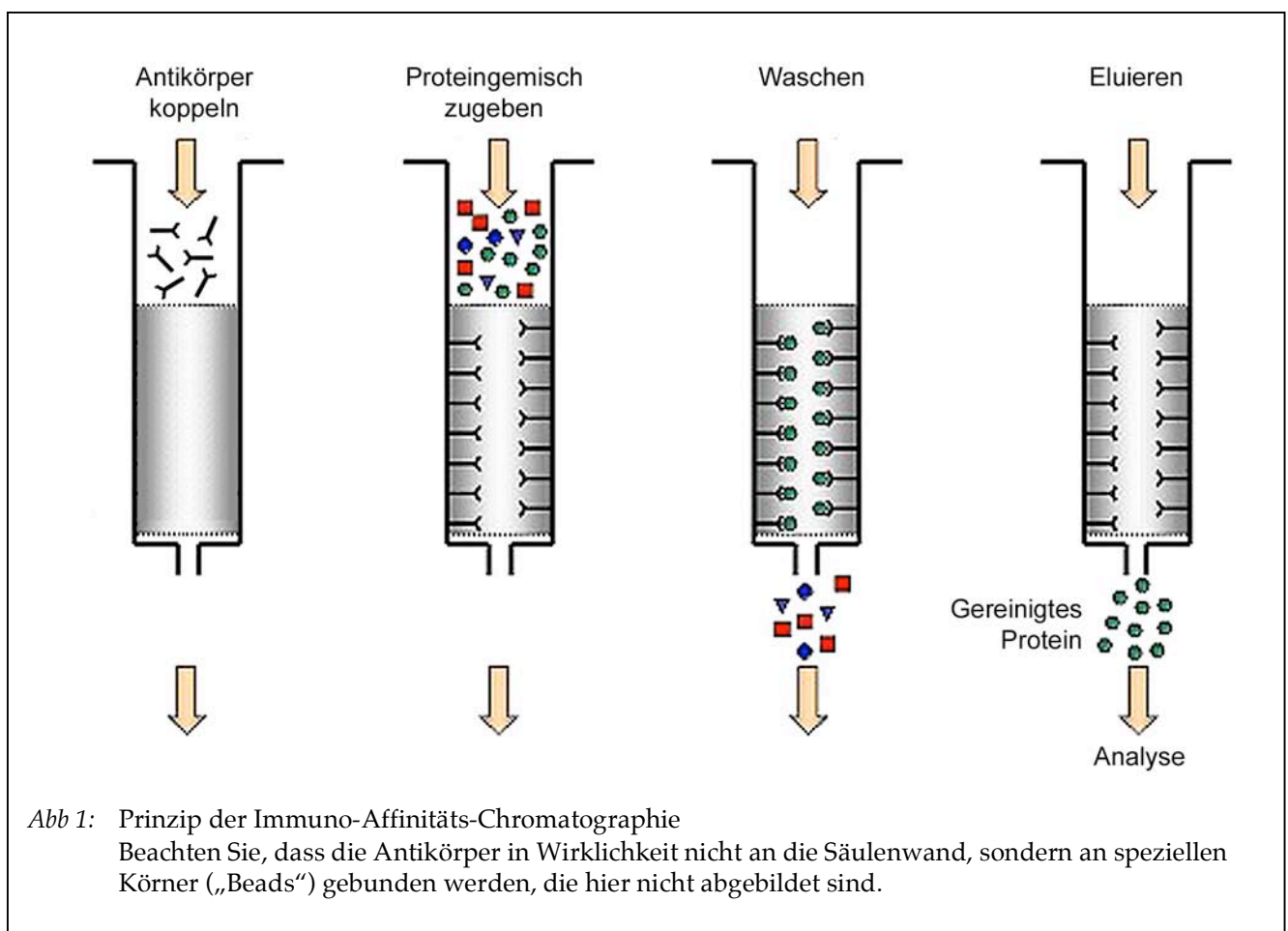
Prinzip

Mit der Immuno-Affinitätschromatographie kann hochspezifisch ein einzelnes Protein aus einem Proteingemisch isoliert werden.

Wie bei jeder Chromatographie gibt es auch hier eine stationäre und eine mobile Phase. Die stationäre Phase, mit der die Säule gefüllt wird, besteht aus kleinen Körnern (sog. Beads), an die Antikörper gekoppelt werden.

Fließt nun das gelöste Proteingemisch als mobile Phase an den mit den Beads verbundenen Antikörpern vorbei, wird ausschliesslich das Protein, das das entsprechende Epitop für den Antikörper aufweist, via Antigen-Antikörper-Erkennung gebunden.

Nach dem Waschen der Säule wird im letzten Schritt ein sog. Elutionspuffer auf die Säule gegeben, der – beispielsweise mit einem hohen pH-Wert – Bedingungen aufweist, der zur Lösung der Bindung zwischen Protein und Antikörper führt. Auf diese Weise kann das Protein gereinigt aufgefangen werden.



Eine Besonderheit bildet die Wahl der Beads, an welche die Antikörper gebunden werden:

- a) Oft werden aktivierte *Sepharosekörner* („Beads“) als feste Phase verwendet, die allerdings zwei Nachteile haben: Einerseits ist die chemische Kopplung der Antikörpern unspezifisch, d.h. teilweise betrifft die kovalente Bindung auch Aminosäureseitenketten der Bindungsstelle des Antikörpers, was die Bindungskapazität stark erniedrigt. Andererseits sind Sepharosebeads teuer.
- b) Im Falle des His-Tags gibt es ein Verfahren, das ganz auf Antikörper verzichtet: *Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography IMAC*. Wie der Name andeutet, enthalten die Beads via NTA gebundene Nickel-Ionen, die ein Protein mit dem His-Tag ebenfalls spezifisch binden können (wobei es sich natürlich nicht um eine AG/AK-Bindung handelt). Ein Nachteil dieses Verfahrens sind die ebenfalls hohen Kosten des von der Firma Roche patentierten Verfahrens.
- c) In diesem Praktikum wird ein neues Verfahren verwendet, das vor kurzem am Biochemischen Institut der Universität Zürich entwickelt wurde²:

Dabei wurde der Antikörper gentechnologisch so verändert, dass er eine zusätzliche kurze Proteinsequenz enthält, die eine starke Bindungsaffinität zu Chitin aufweist. Damit können als Chromatographiematerial Chitinbeads verwendet werden, die relativ einfach aus dem Schalenmaterial von Krustentieren hergestellt werden können: Eine schnelle, einfache und kostengünstige Methode.

Konkrete Fragestellung

Der Verlauf einer Immuno-Affinitätschromatographie kann meistens nicht direkt verfolgt werden, da Proteine in Lösung normalerweise farblos sind.

Aus diesem Grund werden Sie in diesem Praktikum ein ganz spezielles Protein reinigen, das direkt beobachtet werden kann und deshalb in den letzten Jahren in der Molekularbiologie grosse Verbreitung gefunden hat: Es weist ungewöhnlicherweise eine grüne Fluoreszenz auf und wird deshalb *Green Fluorescent Protein (GFP)* genannt. In der Natur kommt es bei der Meeresqualle *Aequorea victoria* vor, die in einer Bucht im US-Staat Washington lebt.

Das im Praktikum verwendete GFP enthält zusätzlich einen His-Tag, damit es mit anti-His-Antikörpern gereinigt werden kann. Es wurde rekombinant mit Hilfe von Bakterien am Biochemischen Institut der Universität Zürich hergestellt.

² Referenz: K. Blank, P. Lindner, B. Diefenbach and A. Plückthun. Self-immobilizing recombinant antibody fragments for immunoaffinity chromatography: generic, parallel, and scalable protein purification. *Protein Expr. Purif.* **24**, 313-322 (2002).

Das Material, das Ihnen zur Reinigung zur Verfügung steht, ist Bakterienlysat. Die Bakterien, die das GFP mit dem His-Tag produzierten, wurden dazu mit Ultraschall aufgeschlossen.

Zusätzlich zum Experiment und der Negativkontrolle werden Sie noch ein Experiment mit einem Bakterienlysat durchführen, das ein GFP mit einem leicht veränderten His-Tag enthält: Am Ende der sechs Histidin-Aminosäuren wurde noch ein zusätzliches Glycin angefügt, um zu prüfen, ob dieser leicht veränderte His-Tag auch bindet, oder ob die zusätzliche Aminosäure das Epitop zu stark verändert, sodass die Antigen/Antigen-Bindung nicht mehr möglich ist.

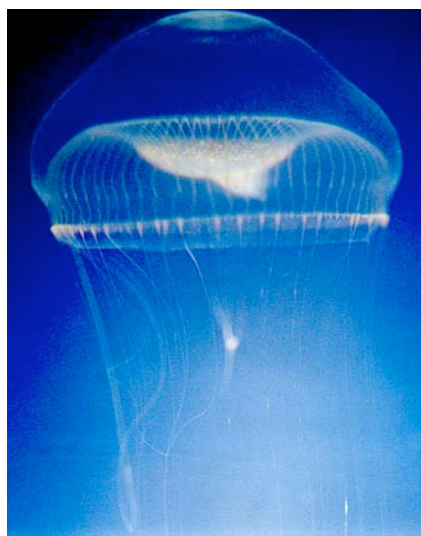
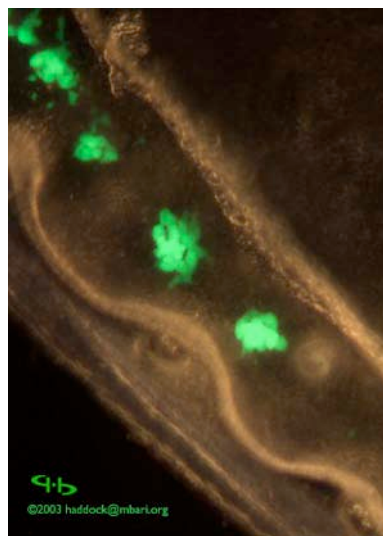
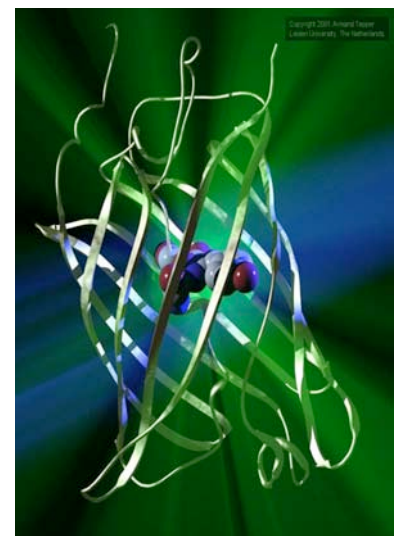


Abb 2: *Aequorea Victoria*



Fluoreszenz am Quallensaum



3D-Darstellung des GFP

Experimenteller Teil

1. Bereitlegen des Materials:

- 3 Säulen, 6 kleine Fritten.
- 4.5 ml Chitin-Suspension (in 10 ml Becherglas)
- 100 ml Puffer A, 100 ml Puffer B und 10 ml Puffer C (in Bechergläsern)
- 3 Eppendorf-Gefäße und ein Eppendorf-Gestell

2. Packen der 3 Säulen (wird zuerst von der Lehrperson demonstriert)

Schieben Sie zunächst vorsichtig mit einem kleinen Spatel eine kleine Fritte bis an den Boden der Säule.


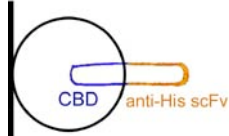
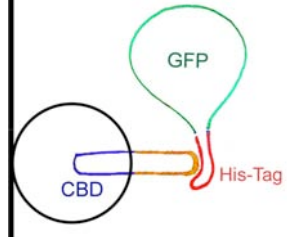
Füllen Sie anschliessend 10 ml Puffer A in eine Stabpipette; warten Sie aber noch mit zugeben! Geben Sie zuerst mit einer Mikropipette, deren vorderste Spitze abge-

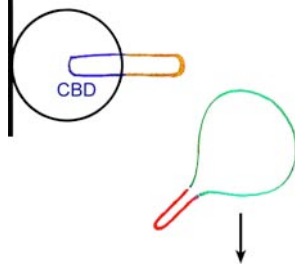
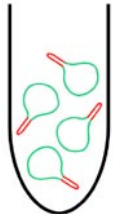
schnitten ist, insgesamt 1.5 ml Chitinsuspension in die Säule. Füllen Sie dann sofort die 10 ml Puffer A hinzu, damit die Säule nicht trockenläuft!

Geben Sie anschliessend die zweite Fritte in die Säule und klemmen Sie sie einige Millimeter oberhalb des Randes des Säulenmaterials senkrecht fest.

Nun kann die Säule nicht mehr trocken laufen.

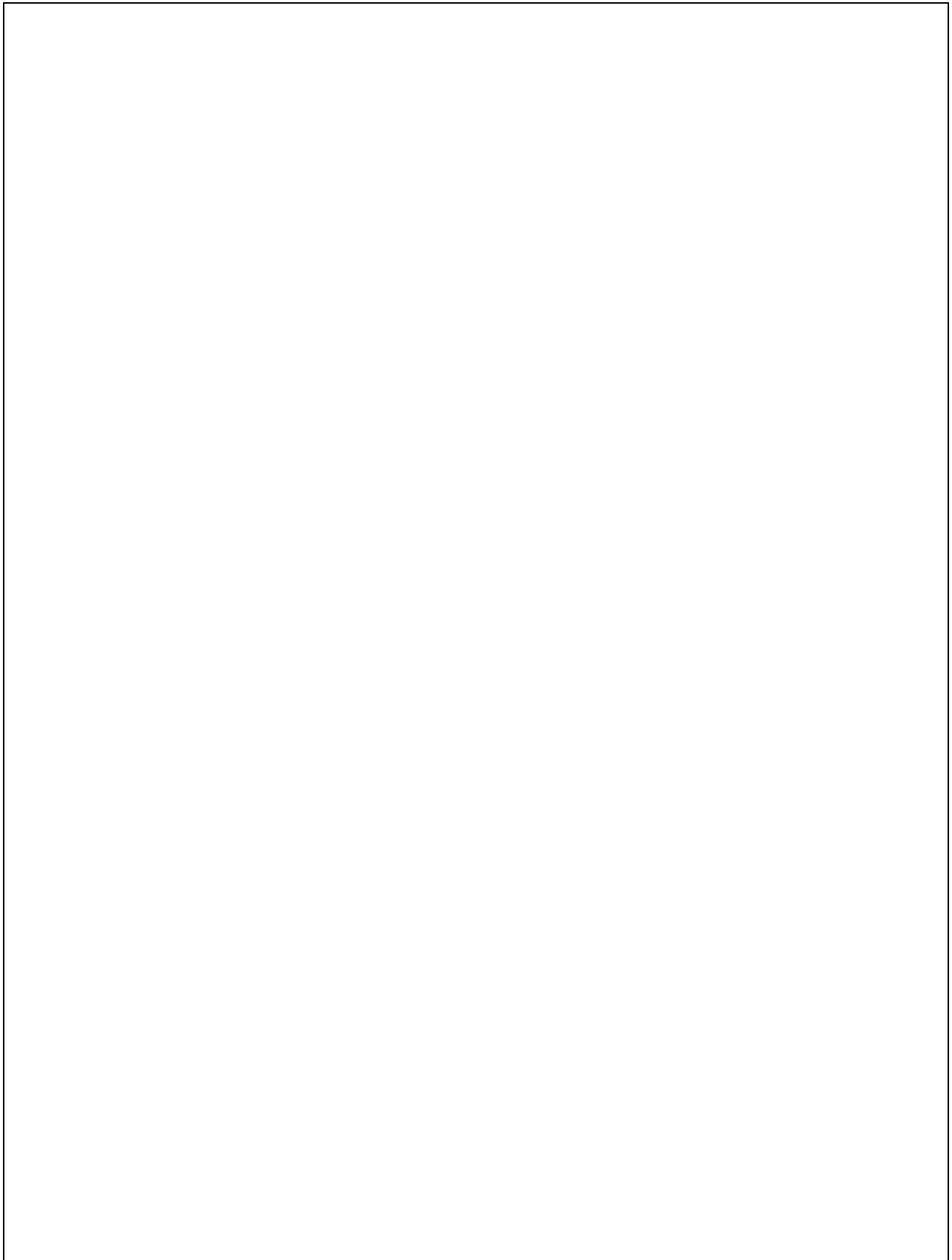
- Führen Sie nun die Chromatographie nach folgendem Schema durch. Verwenden Sie je nach zugegebener Menge Mikro- oder Stabpipetten und warten Sie jeweils vor jeder neuen Zugabe, bis die Lösung die obere Fritte erreicht hat.

	GFP - His	GFP – His ₆ -Gly (mit Glycin)	Negativkontrolle	Schematischer Zustand der Säule nach Zugabe
Waschen der Säule Puffer A (pH 8)	20 ml	20 ml	20 ml	
Antikörper koppeln Anti-His CPB-Lösung	1.5 ml	1.5 ml	Kein AK: 1.5 ml Puffer A	
Waschen Puffer A (pH 8)	2 ml	2 ml	2 ml	
Um-Äquilibrieren Puffer B (pH 6.5)	7 ml	7 ml	7 ml	
Antikörper bindet Protein Bakterienlysat	„GFP-His A“ 3 ml	„GFP-His B“ 6 ml	„GFP-His A“ 3 ml	
Waschen Puffer B (pH 6.5)	25 ml	25 ml	25 ml	

<p><i>Vor-Elution</i> Puffer C (pH 10.0)</p>	<p>0.5 ml</p>	<p>0.5 ml</p>	<p>0.5 ml</p>	
<p><i>Elution: Auf-fangen der Lösung in je einem Eppendorf-Gefäss!</i> Puffer C (pH 10.0)</p>	<p>2 mal 1 ml</p>	<p>2 mal 1 ml</p>	<p>2 mal 1 ml</p>	

Beobachten Sie den gesamten Verlauf der Chromatographie mit Hilfe einer UV-Lampe. Beachten Sie dabei vor allem die Veränderungen nach Zugabe der Lösungen und vergleichen Sie die drei Ansätze.

Beobachtungen und Interpretation: (Machen Sie auch Skizzen, falls notwendig)



SDS-PAGE: Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Mit Hilfe dieser speziellen Elektrophorese werden Proteingemische in einem Gel durch ein elektrisches Feld aufgetrennt und anschliessend angefärbt.

Während es sich bei der Immuno-Affinitätschromatographie um ein präparatives Verfahren handelt, bei dem die aufgetrennten Proteinmengen so gross sind, dass sie weiterverwendet werden können, ist SDS-PAGE ein analytisches Verfahren.

In unserem Fall dient das Verfahren dazu, GFP nachzuweisen, und die Qualität der Aufreinigung zu überprüfen.

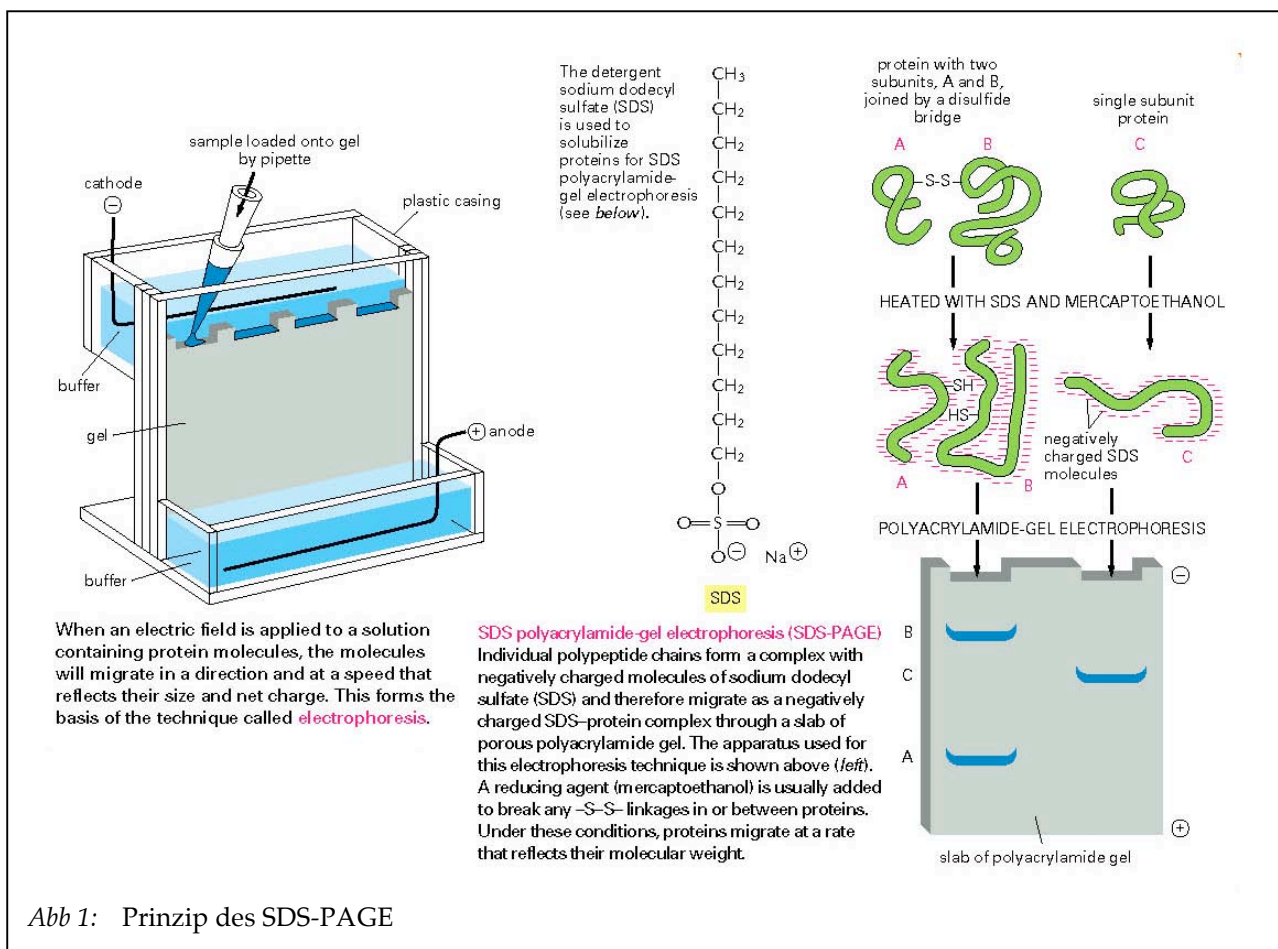


Abb 1: Prinzip des SDS-PAGE

Vorgehen

1. Geben Sie von jeder der drei aufgefangenen Fraktionen je 16 μl in ein Eppendorfgefäß und beschriften Sie diese.
2. Geben Sie zu jedem Gefäß je 4 μl der blauen Gelauftrags-Lösung.³
3. Geben Sie 5 μl des Standardmarkers in ein weiteres Eppendorfgefäß, das Sie ebenfalls anschreiben.⁴
4. Erhitzen Sie die Proben für 5 Minuten bei 95°C

Wozu dient das Erhitzen?

5. Füllen Sie Ihre Proben nach Anleitung der Lehrkraft in die Taschen des vorbereiteten Gels
6. Schalten Sie das Spannungsgerät ein
Verfolgen Sie das Auftrennen der Proteinbanden beim Standardmarker
7. Schalten Sie den Strom aus und geben Sie das Gel in die Färbelösung
8. Wechseln Sie Färbe- und Entfärbelösung nach Anleitung.

Foto Ihres Gels

³ Der blaue Farbstoff färbt lediglich die Lösung und nicht die Proteine selbst an. Er dient dazu, die Proben besser in die Geltaschen zu füllen und die Front während der Elektrophorese zu verfolgen.

⁴ Der Standardmarker enthält Proteine mit definiertem Molekulargewicht. Da diese bereits angefärbt sind, lässt sich die Auftrennung durch Beobachtung verfolgen.

Beobachtungen und Interpretation

REFERENZEN:

- K. Blank, P. Lindner, B. Diefenbach and A. Plückthun. Self-immobilizing recombinant antibody fragments for immunoaffinity chromatography: generic, parallel, and scalable protein purification. *Protein Expr. Purif.* **24**, 313-322 (2002).
- M. Kaufmann, P. Lindner, A. Honegger, K. Blank, M. Tschopp, G. Capitani and A. Plückthun. Crystal structure of the anti-His tag antibody 3D5 single-chain fragment complexed to its antigen. *J. Mol. Biol.* **318**, 135-147 (2002).
- ...oder natürlich: www.biochem.unizh.ch/pluckthun/ oder peter.lindner@bioc.unizh.ch oder 01-635 55 86

Anhang

Analytik von Proteinen

- *Qualitativ: Western-Blot:*
 - Trennung des Proteingemischs mit SDS-PAGE
SDS: Natrium-Dodecyl-Sulfat → Proteine erhalten eine neg. Ladung
PAGE: Polyacrylamid Gel Elektrophorese: Auftrennung der Proteine nach Größe im Polyacrylamid-Gel
 - Blotting: Übertragung der Proteine auf Nitrocellulose-Membran, damit sie für Antikörper zugänglich werden
 - Nachweis des synthetisierten Proteins
 1. Zugabe von AK → AG-AK-Komplex
 2. Zugabe eines 2.AK, der den ersten AK bindet, und mit einem Enzym verbunden ist, das eine Farbreaktion oder Lichterscheinung katalysiert (vgl. ELISA)
Problem: Nur Protein auf der Oberfläche der Proteinschicht ist für AK zugänglich, die Dicke der Proteinschicht auf der Nitrozellulose ist aber unbekannt, → Intensität der Nachweisreaktion ist der Gesamtmenge des Proteins *nicht proportional*. D.h. Methode ist höchstens semiquantitativ.

- *Quantitativ: ELISA: Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay*
Nachweis in Kunststoff- Tüpfelplatten:
 1. Inkubieren der Proteinlösung in Vertiefungen (Wells): Nachzuweisendes Protein wird gebunden (neben anderen Proteinen ebenfalls)
 2. Zugabe von Antikörpern: AG-AK-Komplex mit nachzuw. Protein.
 3. Zugabe eines 2.AK, der den ersten AK bindet, und mit einem Enzym verbunden ist, das eine Farbreaktion oder Lichterscheinung katalysiert (vgl. Western-Blot)
 4. Ausmass der Farb – oder Lichterscheinung ist der Menge Protein in etwa proportional

Material

	Pro Experiment (Gruppe)	8 Gruppen
10 ml-Säulen (Varian Bond Elut LRC)	3	24 Säulen
Minifritten	6	48 Fritten
Chitin-Suspension	3 x 1.5 ml = 4.5 ml	ca. 40 ml
Puffer A: TBST-CB (pH 8.0)	2 x 22 ml + 1 x 23.5 ml = 67.5 ml	ca. 600 ml
Puffer B: MBS-CB (pH 6.5)	3 x 32 ml = 96 ml	ca. 800 ml
Puffer C: Elutionspuffer (pH 10):	3 x 2.5 ml = 7.5 ml	ca. 100 ml
Antikörper-Lösung anti-His-CBD	2 x 1.5 ml = 3 ml	ca. 30 ml
Bakterienlysat GFP-His „A“ Positivkontrolle	2 x 3 ml = 6 ml	ca. 50 ml
Bakterienlysat GFP-His „E“ GFP (His)6G: mit Glycin	6 ml	ca. 50 ml
Eppendorf-Gefäße 1 ml	3	24 Eppi's

- **Puffer A: MBS-CB (pH 6.5):**
20 mM Mes
500mM NaCl
0.1mM EDTA
pH 6.5 mit NaOH
- **Puffer B: TBST-CB (pH 8.0):**
50mM Tris
1M NaCl
0.1mM EDTA
pH 8.0 mit HCl
1 % Triton X-100
- **Puffer C: Elutionspuffer (pH 10):**
50mM Caps
500mM NaCl
0.1mM EDTA
pH 10.0 mit NaOH

Zusätzlich

- Luftballone
- 25 Stabpipetten mit 8 Peleusbällen
- Mikropipetten: 4 ul bis 1 ml – alle Sets, inkl. Pipettenspitzen
- 25 Stabpipetten mit 8 Peleusbällen
- 8 Eppendorf-Gestelle

Material für SDS-PAGE (Gel-Elektrophorese)

- Elektrophorese-Kammer
- 2 Protein-Gele
- Standard-Größenmarker-Lösung: einige ul
- Laufpuffer
- Färbelösung: Coomassie-Blau
- Entfärbelösung: Essigsäure 20%

Bezugsquelle für die Säulen:

Typ: Varian 3CC LRC-3ML-2Frits, 100/PK, Part # 00131005

P.H. Stehelin & Cie AG, Spalentorweg 62, CH-4003 Basel

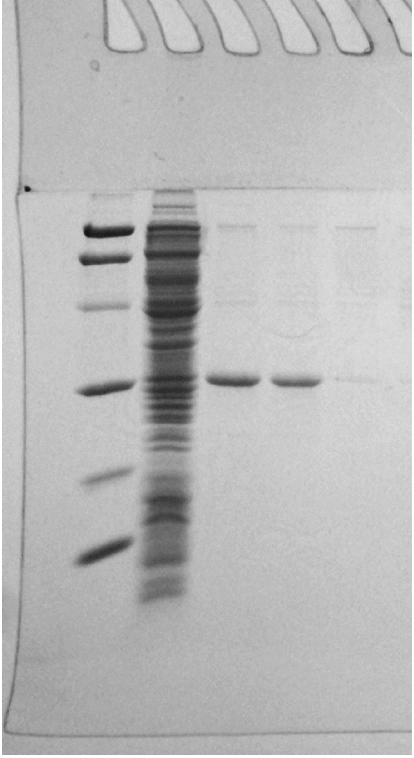
Tel +41 (0)61 272 3924, Fax +41 (0)61 271 3907, www.stehelin.ch

oder

Varian A.G. Chollerstrasse 38, CH-6303, Zug, Tel: 0848 80 3800, www.varian.com

Bemerkungen für die Lehrkraft

- Die Pufferlösungen sind gekühlt ca. 1-2 Jahre haltbar (ev. einige Tropfen gelöstes Natriumazid zufügen)
- Vor dem Praktikum muss der pH-Wert kontrolliert werden: Im Laufe der Zeit sinkt der pH-Wert des Elutionspuffers (Puffer C, pH 10), und muss deshalb mit NaOH 2 M wieder eingestellt werden. Ist der pH zu tief, wird das GFP unvollständig eluiert.
- Die Tropfgeschwindigkeit soll idealerweise 1 Tropfen pro Sekunde betragen. Ist die Geschwindigkeit zu langsam (was oft geschieht), kann folgendermassen beschleunigt werden:
 - mit speziellen Geräten via Druckluft (analog Flash-Chromatographie)
 - Durch vorsichtiges Aufsetzen eines gefüllten Luftballons
 - Durch die Reduktion der Menge Säulenmaterial (Chitinsuspension) auf maximal die Hälfte
 - Durch Reduktion der Puffermenge beim Waschen auf die Hälfte
- SDS-PAGE: Musterbeispiel:

	Spur	Menge	Bemerkungen
	1	5 μ l	Bio Rad low-Grössenstandard
	2	2 μ l	GFP-His Rohextrakt: Verschiedenste Protein-Banden, GFP ist ebenfalls sichtbar (Vergleich mit Spur 3 und 4)
	3	16 μ l	GFP-His gereinigt GFP-Bande deutlich sichtbar
	4	16 μ l	Positivkontrolle: GFP-His gereinigt GFP-Bande deutlich sichtbar
	5	16 μ l	Negativkontrolle: Keine Protein- Banden