

*Versuch 3*

**Nachweis von Cytochrom P450-Isoformen mittels Western-Blotting**

**1. Einleitung**

Schon 1975 entwickelten E. M. Southern und seine Mitarbeiter eine Technik, in der gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA mittels eines Nitrozellulosefilters immobilisiert und mit Hilfe von DNA-Sonden spezifische Sequenzen identifiziert werden konnten. Eine Erweiterung des sogenannten "Southern-Blots" ist die Immobilisierung von RNA. Diese Technik wurde in Anlehnung an Herrn Southern als "Northern-Blot" bezeichnet. Erst 1979 entwickelten Towbin und Mitarbeiter eine Technik, die es erlaubte auch gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteinlösungen auf einer Nitrozellulosemembran zu immobilisieren, und mit Hilfe spezifischer Antikörper das jeweils zu untersuchende Protein nachzuweisen. Da die nördliche und südliche Himmelsrichtung nun schon vergeben waren, nannte man diese Technik "Western-Blotting".

Am häufigsten verwendet man bei der Elektrophorese Polyacrylamidgele als Trägermedium, weil sie chemisch inert sind und sich durch Polymerisation von Acrylamid leicht herstellen lassen. Außerdem kann man ihre Porengröße variieren, indem man bei der Polymerisation unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Methylbisacrylamid (einem quervernetzenden Reagens) einsetzt. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine hauptsächlich aufgrund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen trennen. Das Proteingemisch wird zunächst unter Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöst - einem Detergens, das fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken gibt man Mercaptoethanol oder Dithiothreitol zu. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten - etwa ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäurereste, so dass ein Komplex aus SDS und denaturiertem Protein entsteht, dessen stark negative Ladung der Masse des Proteins ungefähr proportional ist. Die durch das gebundene SDS erworbene negative Ladung ist meist wesentlich größer als die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins, die damit vernachlässigbar wird. Die so aufgetrennten Proteine werden dann zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Membran (Nitrozellulose-Membran) positionsgenau übertragen (geblottet) und immobilisiert. Die so erhaltene Membran, der

*Western-Blot*, kann nun für den Nachweis, die Lokalisation und evtl. Quantifizierung bestimmter Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper eingesetzt werden.

Der für ein bestimmtes Protein spezifische Antikörper (primärer Antikörper) bindet in einer ersten Inkubation des Western-Blots an das gesuchte Protein. Zur optischen Darstellung des gesuchten Proteins kann man sich verschiedener Methoden bedienen. In allen Fällen erfolgt aber eine zweite Inkubation, in welcher ein sekundärer Antikörper an den in Inkubation 1 verwendeten primären Antikörper bindet. Der sekundäre Antikörper erkennt dabei den konstanten Teil  $F_C$  des primären Antikörpers, dessen Struktur von der jeweiligen Tierart bestimmt wird, aus der dieser primäre Antikörper stammt. So würde man bei einem primären Antikörper, der aus Kaninchenserum gewonnen wurde, einen sekundären Antikörper verwenden, der spezifisch alle Kaninchen-Antikörper erkennt. Um nun ein optisches Signal zu erhalten, ist der sekundäre Antikörper mit einem Enzym gekoppelt, das es erlaubt, mit Hilfe verschiedener Substrate ein farblesches Signal auf der Membran oder einem Film zu generieren (Abb. 1).

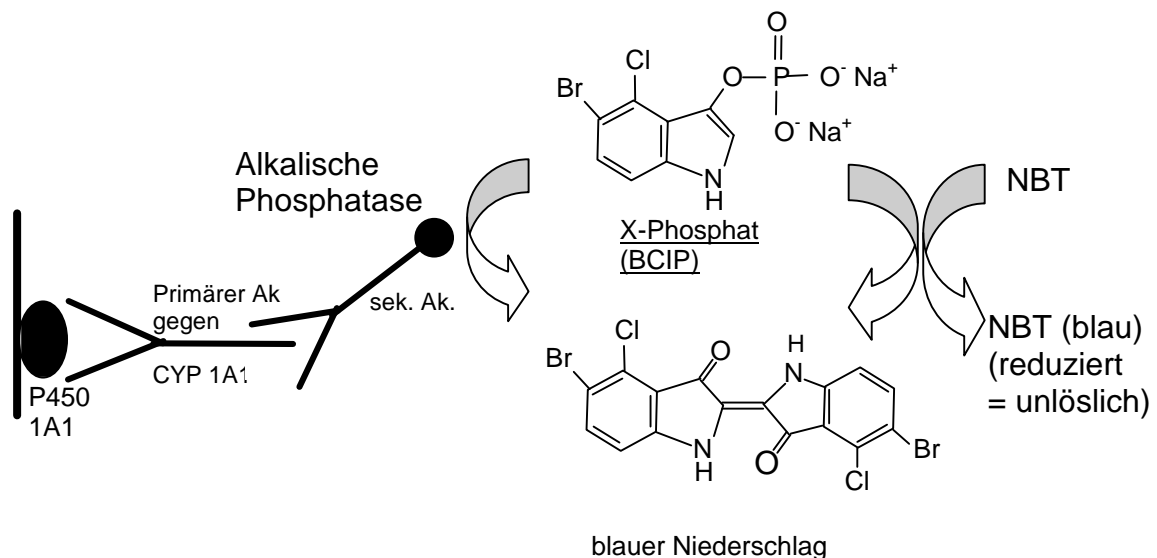


Abb. – Detektion mittels Farbstoffbildung

Cytochrome P450 sind im Endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Enzyme, die ein Sauerstoff-Atom in Fremdstoffe (Xenobiotika) einfügen können, und das zweite Sauerstoffatom in Form von Wasser freisetzen. Sie gehören daher zu den Monooxygenasen. Um diese Funktion zu erfüllen, besitzt das Cytochrom P450-Molekül ein Hämin mit  $Fe^{3+}$  im Zentrum des Porphyrinringes als prosthetische Gruppe. Die Eigenschaften dieses katalytischen Zentrums gaben diesem Enzym seinen Namen: anstelle des natürlichen Kosubstrates, dem Sauerstoff, kann dieses Enzym in reduziertem Zustand

(Fe<sup>2+</sup>) auch CO binden und zeigt dabei ein typisches Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .

Durch die Oxidation unter Verwendung der Kosubstrate NADPH und O<sub>2</sub> erhält der Fremdstoff eine funktionelle Gruppe, welches als Phase-I des Fremdstoffmetabolismus oder Funktionalisierungsphase bezeichnet wird. In der Phase II des Fremdstoffmetabolismus wird diese Gruppe mit einem stark hydrophilen Rest, wie z.B. Sulfat oder Glucuronsäure konjugiert, um die Wasserlöslichkeit zu erhöhen und die Ausscheidung zu ermöglichen. Die Aktivität der CYP kann durch Enzyminduktion um das bis zu 1000fache gesteigert werden, während bei Phase-II-Enzymen nur um das 3-5fache erhöhte Aktivitäten gefunden wurden. Diese starke Induktion kann z.B. die Wirkdauer von Arzneimitteln erheblich verkürzen oder die Bildung reaktiver Metabolite aus Promutagenen fördern. Da deren Bildung zu Mutationen führen und somit die Tumorentstehung anstoßen können, sind induzierende Substanzen von toxikologischem Interesse.

Der Nachweis des Proteins von CYP1A1/1A2 und CYP2B1 erfolgt in Anlehnung an den Versuch zur Bestimmung der Enzymaktivität im EROD/PROD-Assay. Der Nachweis erfolgt durch spezifische Antikörper, die Banden von ca. 56 kD (CYP1A1 58 kD, CYP2B1 55 kD) erkennen sollten.

## 2. Vorbereitungsschwerpunkte

- Enzyminduktion (siehe Skript Versuch 04 (EROD/PROD), Vorlesungsskript)
- SDS-PAGE (siehe Praktikum Lebensmittelchemie, Stryer „Biochemie“)
- Western Blotting (siehe Lottspeich „Analytische Biochemie“)
- Probeneinsatz berechnen (siehe Tab. 2)

## 3. Material und Lösungen

### **Proteinextrakte**

Rattenlebermikrosomen aus Kontrolltieren (K) und mit 3-Methylcholanthren (MC) oder Phenobarbital (PB) induzierten Ratten

Kontrolle:	20,0 mg/ml (26.6.00)
MC 1:	36,0 mg/ml (24.1.00)
MC 2:	20,0 mg/ml (21.7.00)
PB 1:	19,0 mg/ml (24.2.00)
PB 2:	19,5 mg/ml (20.7.00)

### **SDS-PAGE**

- Glasplatten mit aufgeklebten Spacern, Dicke: 0,75 mm
- kurze Glasplatten (ohne Spacer)
- Kämme, Dicke: 0,75 mm
- prestained molecular weight marker, 10 – 160 kDa (orange: 70 kDa)

Acrylamid-Lösung	30 %ige Fertiglösung enthält 29,2 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid auf 100 ml Lösung
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 18,15 g Tris base in 80 ml H <sub>2</sub> O dest. lösen, mit HCl <sub>konz.</sub> auf pH 8,8 einstellen, auf 100 ml auffüllen und über Rundfilter filtrieren
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 6 g Tris base in 60 ml H <sub>2</sub> O dest. lösen, mit HCl <sub>conc.</sub> auf pH 6,8 einstellen, auf 100 ml auffüllen und über Rundfil- ter filtrieren
SDS-Lösung	10 % (w/v) in H <sub>2</sub> O 10 g SDS in 90 ml H <sub>2</sub> O dest. lösen (vorsichtig rühren, schäumt stark!) und auf 100 ml auffüllen
Ammoniumpersulfat-Lösung	10 % (w/v) in H <sub>2</sub> O 0,1 g APS in 1ml dest. H <sub>2</sub> O lösen
TEMED	Fertiglösung
3x Auftragspuffer	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 10 % Glycerin 10 % SDS 5 % Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau (aus 2%iger Stocklö- sung)
5x Laufpuffer	3 % Tris 14,4 % Glycin 0,5 % SDS 30 g Tris base, 144 g Glycin und 5 g SDS in 900 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, auf 1 Liter mit dest. H <sub>2</sub> O auffüllen. pH der Lösung sollte bei ca. 9 – 9,4 liegen, ist der pH sehr verschieden von der Vorgabe, Puffer neu ansetzen
1x Laufpuffer	5x Laufpuffer 1:5 mit dest. H <sub>2</sub> O verdünnen

**Western Blotting (Semi-Dry)**

- Nitrozellulose-Membran der Größe 8,5 cm x 5,5 cm (gleiche Größe wie das Gel)
- pro Gel 9 Blatt Filterpapier der gleichen Größe

Anodenpuffer I	0,3 M Tris in 20 %igem Methanol 36,34 g Tris base in 700 ml H <sub>2</sub> O dest. lösen, mit dest. H <sub>2</sub> O auf 800 ml auffüllen und 200 ml Methanol dazugeben, der pH wird nicht eingestellt
Anoden-Puffer II	25 mM Tris in 20 %igem Methanol 3,629 g Tris base in 700 ml H <sub>2</sub> O dest. lösen, mit dest. H <sub>2</sub> O auf 800 ml auffüllen und 200 ml Methanol dazugeben, der pH wird nicht eingestellt
Kathodenpuffer	40 mM $\gamma$ -Aminocaprinsäure und 0,01 % SDS in 20 %igem Methanol 5,247 g $\gamma$ -Aminocaprinsäure in 700 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, 1 ml 10 %ige SDS-Lösung dazugeben, mit dest. H <sub>2</sub> O auf 800 ml auffüllen und 200 ml Methanol dazugeben, der pH wird nicht eingestellt
Ponceau-S-Lösung	Fertiglösung 0,2 % Ponceau S in 3%-iger Trichloressigsäure gelöst
10x TBST	200 mM Tris, pH 7,6 1,37 M NaCl 1 % Tween 20 24,23 g Tris und 80 g NaCl in 800 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, pH mit HCl <sub>conc.</sub> auf 7,6 einstellen, 10 ml Twenn 20 zugeben und mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 Liter auffüllen
1x TBST	10x TBST 1:10 mit dest. H <sub>2</sub> O verdünnt
Blockierungslösung	1 % Magermilchpulver und 1 % BSA in 1x TBST
1. Antikörperlösungen (primäre Ak)	Maus anti-CYP 450 2B1 (1:100 in Blockierungslösung)  Kaninchen anti-CYP 450 1A2 (1:3000 in Blockierungslösung)
2. Antikörperlösung (sekundäre Ak)	anti-Maus IgG (Peroxidase-Konjugat)  anti-Kaninchen IgG (alkalische Phosphatase-Konjugat); 1:2000 in Blockierungslösung
alkalische Phosphatase-Puffer	100 mM Tris 50 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM NaCl; pH 9,5 12,1 g Tris, 10,16 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O und 5,84 g NaCl in 800 ml dest. H <sub>2</sub> O lösen, pH 9,5 mit NaOH einstellen und mit dest. H <sub>2</sub> O auf 1 Liter auffüllen

#### 4. Durchführung

##### **SDS-PAGE**

Alle hierfür benötigten Glasplatten werden zuerst mit Spülmittel und danach mit Ethanol (70 %) gereinigt und mit dest. H<sub>2</sub>O gespült. Nach dem Zusammenbauen der Gelkammern werden die Trenngel- und Sammelgellösungen bis auf APS und TEMED lt. Tabelle zusammenpipettiert. Nun wird der Trenngellösung APS und TEMED wie unten angegeben zugesetzt und mit einem Magnetrührer gut gemischt. Je 3,5 ml der Trenngellösung werden mit einer 5-ml-Eppendorf-Pipette zwischen die Glasplatten pipettiert und danach vorsichtig mit 900 µl Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist (nach ca. 30 min), wird das Isopropanol über dem Trenngel abgegossen und mit Hilfe eines Filterpapiers das restliche Isopropanol entfernt. Anschließend wird zur Sammelgellösung APS und TEMED pipettiert, mit einem Magnetrührer gut gemischt. Das Sammelgel wird bis zum Glasplattenrand gegossen und der Gelkamm zwischen die Glasplatten gesetzt.

Tabelle 1 – Zusammensetzung des Polyacrylamidgels

	<b>dest. H<sub>2</sub>O (ml)</b>	<b>30 %iges Acrylamid (ml)</b>	<b>Gel-Puffer (ml)</b>	<b>10 %ige SDS- Lösung (ml)</b>
Trenngel (11 %)	3,7	3,7	2,5	0,1
Sammelgel (4 %)	6,1	1,3	2,5	0,1

unmittelbar vor dem Gießen werden dazugegeben:

Trenngel: 100 µl 10 % APS (w/v in dest. H<sub>2</sub>O)  
5 µl TEMED

Sammelgel: 50 µl 10 % APS (w/v in H<sub>2</sub>O)  
10 µl TEMED

Während das Sammelgel polymerisiert (ca. 30 min) werden die Proben vorbereitet. Pro Geltasche soll ein Volumen von 18 µl mit 50 bzw. 100 µg Protein aufgetragen werden (siehe Tab. 3). Der Ansatz der Proben erfolgt in 1,5-ml-Eppendorf-Röhrchen.

Tabelle 2 – Berechnung der einzusetzenden Proteinmengen

	50 µg Protein (µl)	H <sub>2</sub> O (µl)	Auftragspuffer 3x (µl)	ges. Volumen (µl)	100 µg Protein (µl)	H <sub>2</sub> O (µl)	Auftragspuffer 3x (µl)	ges. Volumen (µl)
<b>Kontrolle</b>				18				18
<b>MC 1</b>				18				18
<b>MC 2</b>								18
<b>PB 1</b>				18				18
<b>PB 2</b>								18

Die Proben werden wie berechnet pipettiert und danach für 5 Minuten bei 95°C im Thermomixer erhitzt und dann kurz zentrifugiert. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert ist, wird der Gelkamm vorsichtig entfernt und die Gelkassette in die Apparatur eingesetzt. Die obere und untere Kammer wird mit Laufpuffer aufgefüllt und die Geltaschen mit einem Gelloader-Tip mit Laufpuffer ausgespült. Nun werden die Geltaschen mit den Proben lt. Auftragsschema befüllt und als Molekulargewichtsstandard je Gel 3 µl eines prestained MW-Standards im Bereich von 10 – 160 kDa eingesetzt. Der Marker ist fertig vorbereitet und muß nur aufgetragen werden.

Tabelle 3 – Auftragsschema für SDS-PAGE

Gel 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1x Probenpuffer	Kontrolle 50 µg Protein	Kontrolle 100 µg Protein	MW-Stand. 3 µl	PB1 50 µg Protein	PB1 100 µg Protein	PB2 100 µg Protein	MC1 50 µg Protein	MC1 100 µg Protein	MC2 100 µg Protein	

Gel 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1x Probenpuffer	Kontrolle 50 µg Protein	Kontrolle 100 µg Protein	PB1 50 µg Protein	PB1 100 µg Protein	PB2 100 µg Protein	MW-Stand. 3 µl	MC1 50 µg Protein	MC1 100 µg Protein	MC2 100 µg Protein	

Zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel wird eine konstante Spannung von 50 V für ca. 20 min angelegt. Die Spannung wird danach auf 100 V erhöht. Die Elektrophorese ist beendet, wenn das Bromphenolblau das untere Ende des Geles erreicht hat

(ca. 1,5 h). 10 min vor dem Ende der Elektrophorese wird mit der Vorbereitung des Blottings begonnen.

### **Western Blotting (Semi-Dry-Methode)**

Pro Gel werden 9 Blatt Filterpapier und ein Blatt Nitrozellulose in der Größe des Gels zurechtgeschnitten und wie unten beschrieben in den kalten Blot-Puffern getränkt. (Nitrozellulose und Filterpapier nur mit Schutzhandschuhen anfassen! Warum?). Beide Blots werden folgendermaßen luftblasenfrei zusammengebaut:

Kathode (-)

- 9 Blatt Filterpapier in Kathodenpuffer
- Gel in Kathodenpuffer
- Nitrozellulosemembran für 5 min in Anodenpuffer II (ohne blaues Schutzpapier; Seite auf der das Gel liegt mit Bleistift markieren/Gruppenbezeichnung und Datum)
- 3 Blatt Filterpapier in Anodenpuffer II
- 6 Blatt Filterpapier in Anodenpuffer I

Anode (+)

Nach dem Schichten auf der Anode werden mit einem Zentrifugenröhrchen eventuell entstandene Luftblasen durch Rollen entfernt. Anschließend wird die Kathodenplatte aufgelegt und die Apparatur mit dem Deckel verschlossen. Der Transfer erfolgt für 30 min bei 160 mA. Nach Beendigung des Transfers wird die Nitrozellulose herausgenommen und zur Überprüfung des Proteintransfers kurz in Ponceau-S-Lösung geschwenkt. Die Färbelösung wird wieder verwendet. Gel und Filter werden verworfen. Der Blot wird mehrere Male mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen, bis der Hintergrund der Membran weiß ist und die Proteinbanden deutlich zum Vorschein kommen. Nach dieser Überprüfung werden die Blots solange mit 1x TBST gewaschen, bis die Proteinbanden wieder entfärbt sind. Die Membranen werden nun in Blockierungslösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Primärantikörper für 15 min. Danach wird die Antikörperlösung zurück in das Schraubröhrchen gegossen und bis zur nächsten Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Die Membran wird zweimal kurz und 5 mal für je 5 min mit 1x TBST gewaschen. Anschliessend erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 15 min. Auch der 2. Antikörper kann mehrfach wiederverwendet werden. Die Membran wird wieder zweimal kurz und 5 mal für je 5 min mit 1x TBST gewaschen.

**Färbereaktion (alkalische Phosphatase) CYP1A2:** Den CYP-1A2 Blot wird vor der Inkubation mit der Färbelösung kurz im alkalischen Phosphatase-Puffer geschwenkt (pH-Angleich). Zu 5 ml Alkalische-Phosphatase-Puffer werden 25 µl NBT Lösung und 18 µl X-Phosphat gegeben, die Nitrozellulose-Membran in der Färbelösung im Dunkeln (Schrank) inkubiert und die Farbentwicklung beobachtet. Zum Stoppen der Reaktion wird der Blot mehrmals mit dest. H<sub>2</sub>O gespült und anschließend auf Papiertüchern getrocknet.

**Chemolumineszenz (Peroxidase) CYP2B1:** Bei Umsetzung des Substrats Luminol durch die Peroxidase wird Chemolumineszenz freigesetzt, die auf einem Film detektiert werden kann. Das ECL („Enhanced Chemoluminescence“) Kit enthält zusätzlich zum Luminol (Lösung 1) noch einen Stabilisator (Lösung 2). Direkt vor der Verwendung werden je 750 µl Lösung 1 und 2 gemischt und für genau eine Minute auf den Blot gegeben. Dann wird das ECL-Gemisch vom Blot abgegossen und überschüssige Flüssigkeit mit einem Tissue-Tuch an einer Ecke vom Blot „abgesaugt“. Der Blot wird dann mit Folie einfach und ohne Faltenbildung eingeschlagen und in eine Filmkassette gelegt.

Mit der so vorbereiteten Filmkassette wird in der Dunkelkammer weitergearbeitet, in der nur das Rotlicht eingeschaltet werden darf. Zunächst werden Entwickler, Fixierer und Wasser in die dafür vorgesehenen Wannen gegossen. Nun wird ein Stück Film passender Größe auf den Blot gelegt und die Filmkassette geschlossen. Nach 25 min wird der Film zunächst in den Entwickler gelegt. Nach kurzer Zeit (je nach Alter des Entwicklers 10 s bis 6 min) sollten die Banden zu sehen sein. Daraufhin wird der Film kurz im Wasser und dann im Fixierer geschwenkt. Als letztes wird der Film in frischem Wasser gespült und an der Luft getrocknet.