



## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

### Zielsetzung

Indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT) zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Rezeptor- und Kanalproteine an transitorisch transfizierten Kulturzellen (HEK293-Zellen).

Für die im Folgenden beschriebene Methode liegen eigene Erfahrungen mit den in Tabelle 1 aufgeführten Membranrezeptoren und Kanalproteinen vor.

**Tabelle 1** Expression von Rezeptor- und Kanalproteinen in HEK293 Zellen mit Hilfe des pcDNA 3.1/ CT-GFP-TOPO®-Vektors (Invitrogen)

Rezeptor	Gen	Masse [kDa]	Proteinname
<a href="#">Lrp4</a>	<i>LRP4</i>	212	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4
<a href="#">MuSK</a>	<i>MUSK</i>	97	Muscle, skeletal receptor tyrosine-protein kinase
<a href="#">Cav1.1</a>	<i>CACNA1S</i>	212	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit $\alpha$ -1S
<a href="#">Cav1.2</a>	<i>CACNA1C</i>	249	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit $\alpha$ -1C
<a href="#">GlyR-<math>\alpha</math>1</a>	<i>GLRA1</i>	48	Glycine receptor subunit $\alpha$ -1
<a href="#">GABA<sub>B</sub>R1</a>	<i>GABBR1</i>	108	Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1
<a href="#">GABA<sub>B</sub>R2</a>	<i>GABBR2</i>	106	Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2
<a href="#">mGluR1</a>	<i>GRM1</i>	132	Metabotropic glutamate receptor 1
<a href="#">mGluR5</a>	<i>GRM5</i>	133	Metabotropic glutamate receptor 5
<a href="#">Kv1.4</a>	<i>KCNA4</i>	73	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 4
<a href="#">Kir2.1</a>	<i>KCNJ2</i>	48	Inward rectifier potassium channel 2
<a href="#">Kir2.6</a>	<i>KCNJ18</i>	49	Inward rectifier potassium channel 18
<a href="#">Kir4.1</a>	<i>KCNJ10</i>	43	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 10

### Testprinzip

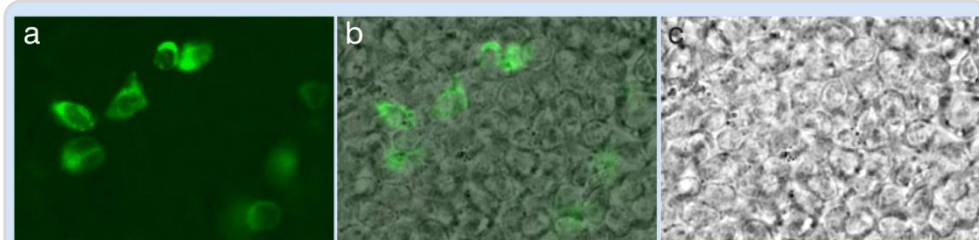
Als Antigen dienen transitorisch transfizierte HEK293-Zellen (Human Embryonic Kidney Cells), die das der Fragestellung entsprechende Rezeptor- oder Kanalprotein auf der Zytoplasmamembran exprimieren. Die Transfektion erfolgt mit Klonierungsvektoren, die das vollständige Rezeptor- oder Kanalprotein oder Fragmente desselben in Form eines Fusionsproteins mit einem C-terminalen grün fluoreszierenden Protein (GFP) exprimieren. Bei der hier beschriebenen Methode wurde der Vektor pcDNA 3.1/ CT-GFP-TOPO® (Invitrogen) verwendet, der die kodierende Sequenz eines grün fluoreszierenden Proteins (GFP) von 239 Aminosäuren Länge mit einer maximalen Anregung bei 395 nm und 478 nm und einer maximalen Emission bei 507 nm enthält. Dieses GFP-Protein wird nur in Anwesenheit der korrekt orientierten cDNA des gewünschten Proteins exprimiert. Erfolgreich transfizierte Zellen lassen sich daher leicht anhand der durch das Fusionsprotein vermittelten Grünfluoreszenz fluoreszenzmikroskopisch identifizieren (Abbildung 1).

Zum Nachweis von Autoantikörpern in humanen Proben (Serum, Liquor) werden die auf Deckgläsern kultivierten, transfizierten HEK293-Zellen mit geeigneten Verdünnungen des Untersuchungsmaterials in Kulturmedium inkubiert. Eventuell vorhandene Autoantikörper binden sich an die auf der Zellmembran exprimierten Rezeptorproteine. Nach Entfernung überschüssiger, unspezifischer Immunglobuline durch mehrfaches Waschen der Zellen werden diese mit Para-



## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

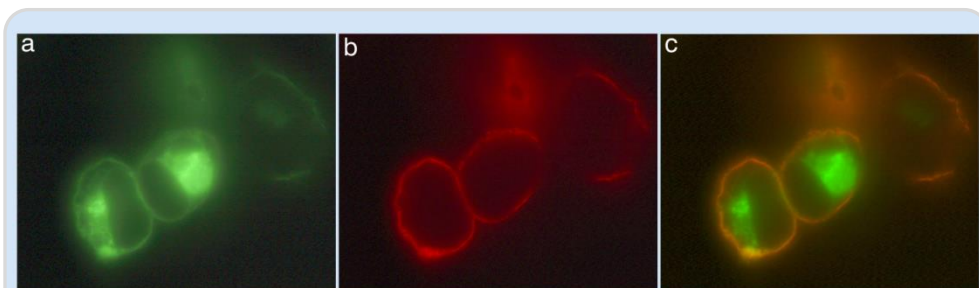
formaldehyd fixiert und anschließend mit einem gegen humane Immunglobuline gerichteten, in der Regel rot fluoreszierendem Sekundärantikörper inkubiert. Bei den eigenen Untersuchungen wurde Alexa-Fluor 658 (Invitrogen) verwendet.



**Abbildung 1** Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis grün fluoreszierender HEK293-Zellen einer Deckglaskultur. Die HEK293-Zellen wurden mit dem Vektor pcDNA 3.1/ CT-GFP-TOPO<sup>®</sup> transfiziert, der die codierende Sequenz des Glycinrezeptors  $\alpha 1$  enthält. **a:** Durch die Expression des grün fluoreszierenden Fusionsproteins lassen sich die erfolgreich transfizierten und die das Rezeptorprotein exprimierenden Zellen leicht identifizieren. **b:** Überlagerung der Bildausschnitte a und b. **c:** Darstellung des gleichen Bildausschnittes mittels Phasenkontrast zeigt eine vollständige Konfluenz der Kulturzellen.

Objektiv-Vergrößerung: 40-fach.

Sofern in dem Untersuchungsmaterial Autoantikörper vorliegen, die sich gegen die auf den vitalen Zellen exprimierten Rezeptor- oder Kanalproteine richten, können diese durch den rot fluoreszierenden Sekundärantikörper mikroskopisch sichtbar gemacht werden. Es resultiert eine Rotfluoreszenz der Zellmembran nur der transfizierten, grün fluoreszierenden Zellen (Abbildung 2). Die Auswertung der Fluoreszenz erfolgt mit Fluoreszenzmikroskopen, die mit Filtersätzen für Rot- und Grünfluoreszenz ausgerüstet sind. Da die Zellen während der Inkubation mit dem Primärantikörper, d. h. mit der humanen Probe, noch vital sind und Antikörper die Membran vitaler Zellen nicht permeieren, werden intrazytoplasmatisch gelegene Anteile der Fusionsproteine (z. B. im Golgi-Apparat) nicht mit den konjugierten Sekundärantikörpern angefärbt (Abbildung 2).



**Abbildung 2** Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Antikörpern gegen den metabotropen GABA-Rezeptor GABA<sub>B</sub>R2 mit Deckglaskulturen transfizierter HEK293-Zellen. Die Transfektion erfolgte mit dem GFP exprimierenden Vektor pcDNA 3.1/ CT-GFP-TOPO<sup>®</sup>, der die codierende Sequenz für das vollständige Rezeptorprotein enthält. Die Immunreaktion erfolgte an noch vitalen, nicht fixierten und nicht permeabilisierten Zellen.

**a:** Intrinsische Grünfluoreszenz dreier transfizierter HEK293-Zellen. Neben der Membranfluoreszenz findet sich auch eine Grünfluoreszenz von Fusionsproteinanteilen im Zytoplasma. **b:** Die an der Zellmembran gebundenen Autoantikörper gegen den GABA<sub>B</sub>R2-Rezeptor wurden mit einem Alexa Fluor 568-markierten Antikörper gegen human-IgG nachgewiesen. Es findet sich nur eine Membranfluoreszenz der Zellen. Die intrazytoplasmatischen Proteinanteile bleiben ungefärbt, da der Autoantikörper während der Reaktion mit den Antigenen auf der Membran vitaler Zellen die Zellmembran nicht penetrieren kann. **c:** Überlagerung von a und b. Die gelbgefärbten Strukturen kennzeichnen die Bindungsstellen des humanen Autoantikörpers.

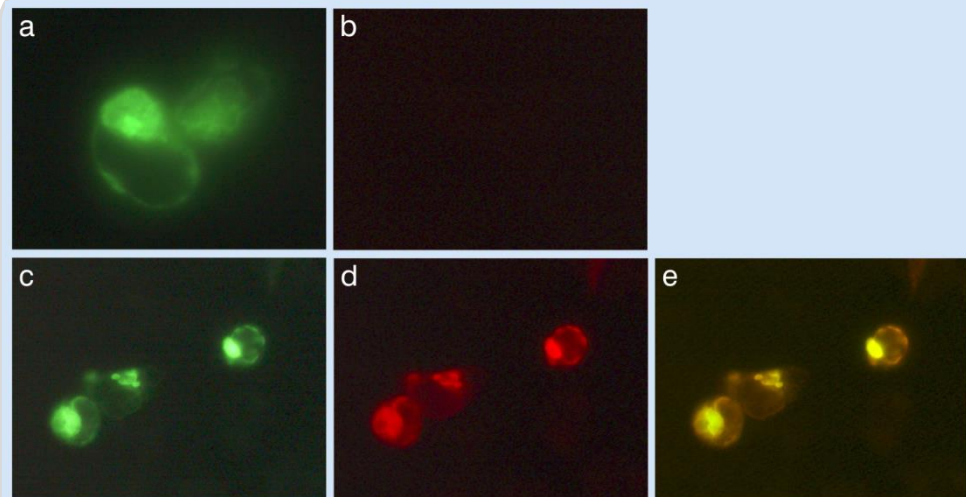
Objektiv-Vergrößerung: 100-fach

Der Vorteil dieser Methode liegt darin begründet, dass sich die Membranproteine auf den vitalen Zellen in ihrer natürlichen Konformation befinden und dass in der Regel nur Autoantikörper gegen auch *in vivo* akzessible Konformationsepitope nachgewiesen werden, die möglicherweise auch *in vivo* eine pathogene Rolle spielen.



## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

Zur Darstellung intrazytoplasmatisch gelegener Antigene müssen die Zellen vor der Inkubation mit dem Primärantikörper fixiert (z. B. mit Paraformaldehyd) und permeabilisiert (z. B. mit Triton X-100) werden. Dies wird notwendig, wenn z. B. Fusionsproteine immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden sollen, die keine intrinsische Fluoreszenzeigenschaften besitzen. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen zerstört allerdings die natürliche Konformation der Rezeptor- und Kanalproteine auf der Zellmembran.



**Abbildung 3** Demeaskierung von in vitro nicht akzessiblen Epitopepn durch Zellfixierung und -Permeabilisierung der Membran. HEK-293-Zellen transfiziert mit dem GFP exprimierenden Vektor pcDNA 3.1/ CT-GFP-TOPO<sup>®</sup>, der die kodierende Sequenz für das gesamte Low density lipoprotein receptor-related protein-4 (Lrp4) enthält wurden vor und nach Denaturierung durch Paraformaldehydfixierung und Behandlung mit Triton X-100 mit einem polyklonalen Antikörper gegen Lrp4 vom Kaninchen (Sigma) inkubiert. Der Antikörper wurde gegen ein sythetisches Peptid erzeugt, das ein Sequenzfragment unmittelbar vor der Transmembranregion von Lrp4 umfasst.

**a, b:** Untersuchung von vitalen, nicht fixierten Zellen. Erste Inkubation mit anti-Lrp4 vom Kaninchen, zweite Inkubation mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 568-markiertem anti-Kaninchen IgG. **a:** Intrinsische Fluoreszenz der transfizierten HEK293-Zellen. **b:** Nach Inkubation der vitalen Lrp4-transfizierten HEK293-Zellen mit anti-Lrp4 und anti-Kaninchen-IgG findet sich keine Färbung der Antigen-exprimierenden Zellen.

**c - e:** Untersuchung an Paraforaldehyd und Triton X-100 vorbehandelten HEK293-Zellen. **c:** Intrinsische Grünfluoreszenz der transfizierten, Lrp4 exprimierenden Zellen. **d:** Nach Inkubation mit anti-Lrp4 von Kaninchen findet sich jetzt eine deutliche Fluoreszenz der Zellmembran und der intrazytoplasmatischen Lrp4-Anteile. Offensichtlich wurde durch die Fixierung und Triton-Behandlung die Konformation des Lrp4 so verändert, dass der Antikörper jetzt den kryptischen Sequenzanteil erkennen kann. **e:** Überlagerung von c und d.

Objektivvergrößerung: a, b: 100-fach; c - d: 40-fach.

Es muss damit gerechnet werden, dass bei dieser Methode unter Umständen monoklonale oder polyklonale Antikörper gegen Rezeptor- oder Kanalproteine, die durch Immunisierung mit denaturierten Proteinen und synthetischen Peptiden gewonnen wurden, nicht mit auf vitalen Zellen exprimierten Konformationsepitopen reagieren (Abbildung 3), ebenso nicht humane Antikörper, die sich gegen kryptische oder denaturierte Peptidfragmente richten. Es ist daher möglich, dass mit Assays, in denen denaturierte Antigene zum Nachweis der Autoantikörper eingesetzt werden (z. B. Elisa, Westernblot, RIA), diskrepante Resultate erhalten werden.



## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

### Durchführung

- ▶ **HEK293-Zellen** - Lagerung und Kultivierung
- ▶ **Deckglaskulturen** - mit HEK293-Zellen für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen
- ▶ **Transfektion** - von Deckglaskulturen der HEK293-Zellen mit Plasmid-DNA
- ▶ **IIF-Test** - Reagenzien und vorbereitende Arbeitsschritte
- ▶ **Testablauf** - IIFT mit nicht permeabilisierten und permeabilisierten HEK293-Zellen

### HEK293-Zellen

Permanente Lagerung der HEK293-Zellen (ATCC® CRL.1573™) über flüssigem Stickstoff, in 1 mL Kryogegefäßen in RMPI-Medium 1640, Dimethylsulfoxid (DMSO), fetalem Kälberserum (FCS) (80 : 40 : 10 [Vol : Vol : Vol]). Der Inhalt eines Kryogegefäßes entspricht der halben Zellzahl einer nahezu konfluent bewachsenen 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (ca. 10<sup>7</sup> Zellen). Die Zellen werden bei 37 °C aufgetaut, in 10 mL Kulturmedium überführt, zur Entfernung von DMSO bei 600xg zentrifugiert und dann zur Kultivierung in frischem Medium aufgenommen. Die Kultivierung erfolgt nach den üblichen Kriterien der Zellkulturtechnik in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>.

#### ▶ Kulturmedien und Reagenzien

##### ▶ Medium I

Für die permanente Kultivierung der HEK293-Zellen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10% FCS, je 100 U/mL Penicillin G und Streptomycin.

##### ▶ Medium II

Für die Herstellung des Transfektionsreagenz und kurzzeitige Kultivierung nach Transfektion.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) *ohne* FCS und *ohne* Antibiotika.

##### ▶ Medium III

Für die Kultivierung von transfizierten HEK293-Zellen.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS *ohne* Antibiotika.

##### ▶ EDTA-PBS

Zum Ablösen der am Boden der Kulturflaschen adhärenen HEK293-Zellen.

3 mM EDTA in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 8,0 (siehe Anhang).

Die permanente Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgt in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit 19 mL Medium I bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Erreicht die Zelldichte eine Konfluenz von >75 %, werden die am Boden haftenden Zellen mit 3 mM EDTA-PBS abgelöst und in frischem Medium I bis zur Transfektion weiter kultiviert.

Zum Ablösen der Zellen wird das in der Kulturflasche befindliche Kulturmedium vollständig abgesaugt. Zu den am Boden haftenden Zellen werden 2,0 mL 3 mM EDTA-PBS (Raumtemperatur) zugegeben und durch Schwenken gleichmäßig über den Zellrasen verteilt. Anschließend werden 1,5 mL des EDTA-PBS abgesaugt und verworfen. In der Kulturflasche verbleiben 0,5 mL PBS-EDTA. Zur vollständigen Ablösung der Zellen werden die Kulturflaschen noch 5 - 10 Minuten bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> gehalten.

Den abgelösten Zellen werden 19 mL frisches Kulturmediums (Medium I, 37 °C) zugegeben. Nach gutem Mischen zur Auflösung von größeren Zellverbänden wird diese Zellsuspension (19 mL) auf 3 Kulturflaschen (je 6 mL) verteilt. Jedem Aliquot der Zellsuspension werden 13 mL Medium I (37 °C) zugegeben: ergibt 19 mL Kulturmedium mit einem Drittel der ursprünglichen Zelldichte pro Kulturflasche.



## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

### Deckglaskultur

Für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen werden die HEK293-Zellen auf 15 mm<sup>2</sup> großen Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern (zwecks besserer Zellhaftung) kultiviert. Anzucht, Transfektion und immunologische Untersuchungen erfolgen in Zellkulturplatten mit 12 Kavitäten (12-Well Platten; Grundfläche der Kavitäten: 4 cm<sup>2</sup>).

#### ► Herstellung Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser

- Unter der Sterilbank Deckgläser (15 mm<sup>2</sup>) in Aceton und 100 % Ethanol säubern, kurz abflammen, abkühlen lassen, in Poly-L-Lysin-Lösung (siehe Anhang) schwenken, auf sterilem Verbandmull oder sterilem Karton trocknen lassen.
- Nach vollständigem Trocknen (ca. 30 Minuten) Deckgläser flach in die Kavitäten der 12-Well Kulturplatten legen. Deckgläser müssen plan dem Boden aufliegen, dürfen keine Risse oder sonstigen Beschädigungen aufweisen.
- Deckgläser mit 1 mL Kulturmedium (Medium I) überschichten und 12 - 24 Stunden bei 37 °C bis zum Einbringen der HEK293-Zellen vorinkubieren.
- Kulturmedium unmittelbar vor Einbringung der für die Transfektion vorgesehenen HEK293-Zellen von den Deckgläsern absaugen.

### Transfektion

HEK293-Zellen werden 24 Stunden vor der geplanten Transfektion in frischem Medium I (37 °C) wie oben beschrieben aufgenommen, in die mit sterilen Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern bestückten sterilen 12-Well-Kulturplatten überführt und bei 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Grundfläche einer Kavität beträgt 4 cm<sup>2</sup>. Eingefüllt werden pro Kavität 1 mL der Zellsuspension (Füllhöhe 0,25 cm). Die Zelldichte soll bis zum Beginn der Transfektion einer Zellkonfluenz von 50 % entsprechen. Dies wird in der Regel innerhalb von 24 Stunden erreicht.

#### ► Transfektionsreagenz

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgt mit einer Suspension von

- Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 Reagent (Invitrogen) und der
- cDNA des zu untersuchenden Proteins, kloniert in pcDNA 3.1/CT-GFP-TOPO<sup>®</sup>-Vektor (Stratagene).

Zur Herstellung des gebrauchsfertigen Transfektionsreagenz wird Kulturmedium *ohne* Antibiotika- und FCS-Zusatz (Medium II, reduziertes Kulturmedium) verwendet. Die Verdünnungen von Lipofectamine und cDNA sind in Tabelle 3 angegebene. Das DNA / Lipofectamine - Verhältnis beträgt 1 : 2,5 [Gew / Vol]. Bei unzureichender Transfektionsrate kann das Mengenverhältnis den Angaben des Herstellers entsprechend modifiziert werden. Alle Arbeitsschritte erfolgen unter der Sterilbank mit sterilen Gefäßen und Pipetten.

Für je eine Deckglaskultur, d. h. für eine Kavität der 12-Well-Kulturplatte, werden je 1,6 µg Plasmid-DNA und je 4 µL Lipofectamine benötigt (Tabelle 2).

- Die benötigte Menge Plasmid-DNA wird bei Raumtemperatur in der in der Tabelle 2 angegebenen Menge von Medium II gelöst.
- Die benötigte Menge Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (vor Entnahme vorsichtig mischen) in der angegebenen Menge Medium II bei Raumtemperatur lösen und 5 Minuten bei Raumtemperatur halten.
- Die Plasmid-DNA-Lösung der Lipofectamine-Lösung zugeben und vorsichtig mischen. Die Suspension (es bilden sich DNA-enhaltende Lipofectamine-Mizellen) 20 Minuten bei Raumtemperatur halten und gelegentlich vorsichtig von Hand mischen.



## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

- ▶ Kurz vor Beendigung der 20-minütigen Inkubation der DNA-Lipofectamine-Suspension das in den Kavitäten der Kulturplatten enthaltene alte Kulturmedium sorgfältig steril absaugen (Quetschpipette, Wasserstrahlpumpe etc.).
- ▶ Zugabe von je 200  $\mu\text{L}$  der Plasmid-DNA-Lipofectamine-Suspension in jede Kavität der Kulturplatte (Entspricht einer Füllhöhe von 0,5 mm). Nach Füllung aller Kavitäten die Platte vorsichtig schwenken um die Suspension gleichmäßig zu verteilen und
- ▶ ohne Verzögerung in jede Kavität 1mL vorgewärmtes Medium II (37 °C) pipettieren. Anschließend vorsichtig mischen. Kulturplatten abdecken und die Zellen bei 37 °C in 5 %  $\text{CO}_2$  5 Stunden inkubieren.
- ▶ Nach 5 Stunden Inkubation das Transfektionsmedium absaugen und durch 1 mL frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium *ohne* Antibiotika aber *mit* FCS (Medium III) ersetzen.
- ▶ Weitere 19 Stunden bei 37 °C in 5 %  $\text{CO}_2$  kultivieren (insgesamt ca. 24 Stunden) bis die gewünschte Zelldichte erreicht wurde.
- ▶ Überprüfen der Transfektionsrate: Ein Deckglas entnehmen, 3-mal in PBS abspülen und mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen Objektträger mit Eindeckmedium auflegen. Überprüfung mittels Aufsicht-Fluoreszenz mit einem für FITC geeigneten Filtersatz.

**Tabelle 2** Transformationsreagenz, benötigte Reagenzmengen (Plasmid-DNA und Lipofectamin® 2000) für Deckglaskulturen in 12-Well-Kulturplatten.

Kulturplatte	Plasmid-DNA		Lipofectamine-Lösung		Transfektionsreagenz
	DNA [ $\mu\text{g}$ ]	Medium II [ $\mu\text{L}$ ]	Lipofectamin [ $\mu\text{L}$ ]	Medium II [ $\mu\text{L}$ ]	
Kavitäten					Endvolumen [ $\mu\text{L}$ ]
1	1,6	100	4	100	200
2	3,2	200	8	200	400
3	4,8	300	12	300	600
4	6,4	400	16	400	800
5	8,0	500	20	500	1.000
6	9,6	600	24	600	1.200
7	11,2	700	28	700	1.400
8	12,8	800	32	800	1.600
9	14,4	900	36	900	1.800
10	16,0	1.000	40	1.000	2.000
11	17,6	1.100	44	1.100	2.200
12	19,2	1.200	48	1.200	2.400



## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

### IIF-Test

Die Untersuchungen können in der Regel 18 - 24 Stunden nach Transfektion erfolgen.

#### ► Reagenzien und vorbereitende Arbeiten

- DMEM-HEPES-BSA: DMEM mit 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) und 1 % BSA
- DMEM-HEPES: DMEM mit 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)
- 3 % Paraformaldehyd in PBS (frisch herstellen)
- 0,1 % Triton X100 in PBS
- PBS, phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
- Fluorochrommarkierte Konjugate: z. B. Alexa Fluor® 568 (A21090 molecular probes, life technologies, 4 mole dye/mole). Verdünnung der Konjugate siehe unten.
- Eindeckmedium (PBS : Glycerin 1 : 9 [Vol : Vol])
- DAPI (40,60-diamidino-2-phenylindole dichloride): DAPI-Lösung 500 ng/mL (alternativ 300 ng/mL): Stammlösung: 1 mg/mL auf 1:100 verdünnen ergibt 10 µg/mL davon 150 µL [10 µg/mL] + 2850 µL Aqua bidest, ergibt 500 ng/mL.
- Verdünnen der Patienten- und Kontrollseren in DMEM-HEPES-BSA-Puffer. Ausgangsverdünnung für Patientenseren beträgt in der Regel 1: 20 (25 µL Serum und 475 µL Puffer). In die Kavitäten der Zellkulturplatten werden je 500 µL der Serumverdünnungen eingefüllt. Verdünnungen der Kontrollseren sind individuell zu ermitteln.
- Verdünnen der Konjugate in DMEM-HEPES-BSA-Puffer. Es empfiehlt sich die Verwendung von Alexa Fluor® 568 markierten Sekundärantikörpern. Die geeigneten Konjugatverdünnungen werden durch Schachbretttitration ermittelt. Als Faustregel für anti-Human-IgG, konjugiert mit Alexa Fluor® 568 (Invitrogen, Molecular Probes), kann eine Verdünnung von 1: 500 - 1:750 gelten. Die Kavitäten der Kulturplatten werden mit je 500 µL der Konjugatverdünnungen befüllt (6 mL Konjugatverdünnung für 12 Deckglaskulturen). Die Auswahl der zu verwendenden Konjugate ist abhängig von der fluoreszenzoptischen Ausstattung der verwendeten Mikroskope.
- Säubern von Objektträgern mit 100 % Ethanol und beschriften. Sie dienen als Unterlage für die Deckglaskulturen.

### Testablauf

► **Nicht permeabilisierte Zellen.** Alle Reaktionsschritte erfolgen bei Raumtemperatur mit auf Raumtemperatur äquilibrierten Reagenzien.

1. Absaugen des alten Kulturmediums.
2. 2-mal waschen mit je 1 mL DMEM-HEPES-BSA.
3. 60 Minuten inkubieren mit je 500 µL der Patienten- oder Kontrollserumverdünnungen.
4. 3-mal waschen mit je 1 mL DMEM-HEPES und sofort danach.
5. 15 Minuten fixieren mit 1 mL 3% Paraformaldehyd.
6. 3-mal waschen mit je 1 mL PBS.
7. 45 Minuten inkubieren mit je 500 µL der entsprechenden Konjugatverdünnungen.
8. 3-mal waschen mit je 1 mL PBS.



## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

9. 15 - 20  $\mu$ L Eindeckmedium auf die gereinigten und beschrifteten Objektträger tropfen
10. Deckglas vorsichtig aus der Kavität entnehmen und mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf dem Objektträger positionieren.
11. Präparate bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt bei 4 °C lagern.

### **DAPI-Färbung der Zellkerne**

Die Gegenfärbung mit DAPI erfolgt nach Reaktionsschritt 8.

- 8a. je 500  $\mu$ L DAPI-Lösung zugegeben und 10 Minuten inkubieren.
- 8b. 3-mal waschen mit je 1 mL PBS

### **► Protokoll für permeabilisierte und denaturierte Zellen**

Die Permeabilisierung der Zellmembran mit Triton X-100 und die Denaturierung und Fixierung der Proteine durch Paraformaldehyd kann je nach Fragestellung entweder zu Beginn des indirekten Immunfluoreszenztests oder während des Testablaufs (siehe oben) vor der Inkubation der Zellpräparate mit den fluorochrommarkierten Konjugaten erfolgen. Sie dienen der Freilegung solcher Epitope, die auf vitalen Zellen konformationsbedingt nicht für Antikörper akzessibel sind.

1. Absaugen des alten Kulturmediums.
2. 3-mal waschen mit je 1 mL DMEM-HEPES.
3. 15 Minuten fixieren mit 1 mL 3% Paraformaldehyd.
4. 3-mal waschen mit je 1 mL PBS.
5. 5 Minuten permeabilisieren mit 1 mL 0,1 % Triton X100-PBS.
6. 2-mal waschen mit je 1 mL PBS.
7. 60 Minuten inkubieren mit je 500  $\mu$ L der Patienten- oder Kontrollserumverdünnungen bei Raumtemperatur.
8. 3-mal waschen mit je 1 mL DMEM-HEPES-BSA-Puffer.
9. 45 Minuten inkubieren mit je 500  $\mu$ L der entsprechenden Konjugatverdünnungen.
10. 3-mal waschen mit je 1 mL PBS.
11. 15 - 20  $\mu$ L Eindeckmedium auf die gereinigten und beschrifteten Objektträger tropfen.
12. Deckglas vorsichtig aus der Kavität entnehmen und mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf dem Objektträger positionieren.
13. Präparate bis zum Mikroskopieren lichtgeschützt bei 4 °C lagern.





## IIFT - Autoantikörper gegen Membranproteine

### Anhang

#### ▶ EDTA-PBS

Die 0,3 mM EDTA-PBS Gebrauchslösung wird wie folgt aus den unten aufgeführten Stammlösungen hergestellt und anschließend autoklaviert.

- ▶ 1000 mL 1x PBS Puffer
- ▶ 6 mL EDTA 0,5 M, pH 8,0

#### Stammlösungen

- ▶ EDTA 0,5 M, pH 8,0 enthält 18,6 g EDTA Dinatrium Salz und 2,3 g NaOH in 100 mL Aqua bidest. pH kontrollieren und gegebenenfalls nachjustieren.
- ▶ 10x PBS Puffer enthält 1,4 M Natriumchlorid (81,82 g), 75 mM Dinatriumhydrogenphosphat p. A. (13,38 g), 20 M Kaliumdihydrogenphosphat p. A. (3,4 g) in 1 Liter Aqua bidest.

Der 1x PBS Puffer wird durch 1 : 10 Verdünnung hergestellt.

#### ▶ Poly-L-Lysin: Poly-L-Lysin Hydrobromid (Sigma P-9155, 5mg).

Inhalt des Fläschchens (5 mg) mit 5 mL sterilem Aqua bidest (Millipore) oder Ampuva lösen und in Portionen zu 500  $\mu$ L in sterilen Mikrotitergefäßen mit Schraubverschluss bei -20 °C lagern (Stammlösung). Die Poly-L-Lysin-Gebrauchslösung enthält 50  $\mu$ g/mL Polylysin. Hierzu werden 500  $\mu$ L Stammlösung in 9,5 mL sterilem Wasser gelöst (steriles Röhrchen verwenden).