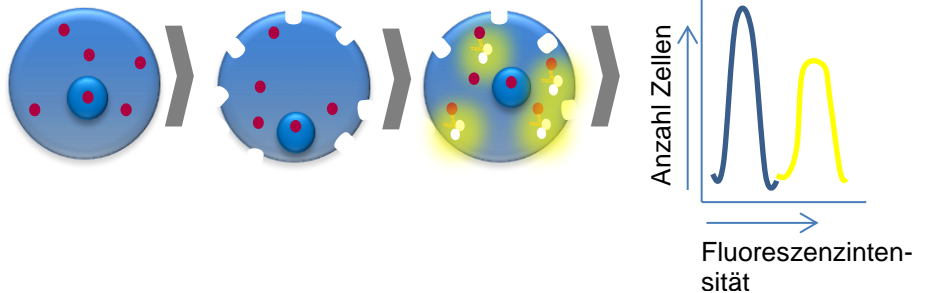


Applikation Durchflusszytometrie

Detektion von phosphorylierten Proteinen

Die (De-)Phosphorylierung von Proteinen findet im Zusammenhang mit der Aktivierung oder Inhibierung von Kinase-Signalwegen statt. Herkömmlich werden diese sogenannten Phosphoproteine mittels Western Blot nachgewiesen. Diese Technik ist zeitaufwändig, umfasst viele Schritte und ist nicht immer reproduzierbar. Inzwischen gibt es zahlreiche Antikörper, die gegen die meist bekannten Phosphoproteine gerichtet sind und durchflusszytometrisch Anwendung finden. Der Vorteil gegenüber dem Western Blot Verfahren ist, dass einzelne Zellen bzw. Subpopulationen von heterogenen Proben durch parallele Phänotypisierung untersucht werden können. Die Präparation erfolgt in nachfolgend schematisch dargestellten Schritten:

1. Fixierung der Probe, um den Phosphorylierungszustand zu konservieren,
2. Permeabilisierung der Zellmembran
3. Zugabe der monoklonalen, Fluoreszenzgekoppelten Antikörper
4. Messung am Durchflusszytometer



Bei der Wahl der Fixier- und Permeabilisierungslösung müssen folgende Aspekte berücksichtigt werden: 1. Die Fixierung muss schnell und effektiv erfolgen, um den aktuellen Phosphorylierungszustand einzufrieren, sollte aber das Epitop nicht stark verändern und 2. Die Permeabilisierung muss die Diffusion der AK in die Zelle hinein und ein Binden an naive oder denaturierte Proteine erlauben.

Protokoll (nach Krutziak *et al.*, 2003)

1. Fixierung in 1,5% FA für 10 min bei RT, anschließend pelletieren.
2. Unter Vortexen Zugabe von eiskaltem MetOH (500 μ L für 1×10^6 Zellen), anschl. Inkubation bei 4° C für mind. 10 min.
3. (Die Zellen können bei -20° C für längere Zeit in MetOH gelagert werden.)
4. Zellen zweimal mit serumhaltigem PBS waschen.
5. Inkubation mit den AK.
6. Zellen zweimal mit serumhaltigem PBS waschen.
7. Messen.

Hinweise

- Alternativ kann statt MetOH auch EtOH plus Aceton eingesetzt werden.
- 0,1 % - 0,5 % TritonX-100 oder 0,1 % - 0,5 % Saponin als Permeabilisierungslösung möglich nach Fixierung mit FA.
- Bei Verwendung von Saponin zwingend Saponin-haltigen Wasch- und Färbepuffer verwenden, da die Desintegration der Membran durch Saponin reversibel ist.
- Unbedingt die Herstellerangaben und -protokolle beachten!

Liste an phospho-spezifischen AK

Nachfolgend sind einige Targets genannt, für die viele Hersteller phospho-spezifische Antikörper anbieten. Die Liste ist nicht vollständig.

AKT (pS473)	p38 MAPK (pT180/Y182)
ATM (pS1981)	p53 (pS37)
BCR (pY177)	p53-acK382
BLNK (pY84)	p120 Catenin (pS288)
BP1-4E (pT36/45)	Phosphotyrosin (pY20)
BTK/ITK (p(Y551/511))	PLC-γ2
CD195 (pS139)	Rb (pS780)
CrkL (pY207)	RCRy(t)
CREB (pS133) / ATF1 (pS63)	S6 (pS235/236/240)
EGFR (pY845)	SLP-76 (pY128)
Erk1/2 (pT202/204)	Smad1 (pS462/465)
FAK (pS910)	Smad2 (pS465/467)
H2A.X (pS139)	Smad3 (pS423/425)
GSK-3b (pS9)	Smad8 (pS465/467)
H3 (pS10,28)	SRC (pY418)
H3.1 (pS28)	Stat1 (pS727/Y701)
H3.3 (pS31)	Stat3 (pY705)
IκBa (pS32/36)	Stat4 (pY639)
IRF-7 (pS477/479)	Stat5 (pY694)
LAT (pY171)	Stat6 (pY641)
LCK (p(Y505))	SYK (pY348)
MCL-1 (pS159)	WIP (pS488)
mTor (pS2448)	ZAP70/SYK (pY319/352)
NFκB p65 (pS529)	ZAP 70 (pY292)

Hersteller von phospho-spezifischen AK

BD Biosciences

https://www.bdbiosciences.com/br/research/phosflow_old/index.jsp

BioLegend

<https://www.biolegend.com/phospho>

ThermoFisher

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/flow-cytometry/antibodies-for-flow-cytometry/phospho-specific-antibodies-flow-cytometry.html>

Miltenyi Biotec

[https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/mac3-flow-cytometry/antibodies/primary-antibodies.html#productsa126896d-6143-4348-8f21-4e26e17cf0e5=\[%22application_cellanalysis-Cellsignaling%22,%22application_cellanalysis-Intracellularstaining%22\]](https://www.miltenyibiotec.com/DE-en/products/mac3-flow-cytometry/antibodies/primary-antibodies.html#productsa126896d-6143-4348-8f21-4e26e17cf0e5=[%22application_cellanalysis-Cellsignaling%22,%22application_cellanalysis-Intracellularstaining%22])