

FI-Praktikum Teil Stassen, 26.02.- 01.03.2018

Montag, 26.02.: Vorbesprechung (9:00 – 11:00)

**Dienstag
27.02.**

PCR ansetzen (Genotypisierung)

Mastzell-Stimulation

Zellen zählen und aktivieren:

∅, LPS, Iono, Iono+LPS für ELISA + Western Blot

∅, LPS, Iono, Iono+LPS für qRT-PCR

Beladung von Mastzellen mit IgE

Mastzelltransfektion (Elektroporation)

Pause

PCR: DNA-Elektrophorese

IL-9 ELISA

Platten mit Erst-

Antikörper beschichten

RNA-Isolierung, cDNA-Synthese (für qRT-PCR)

Transfizierte Mastzellen aktivieren (∅, LPS, Iono, Iono+LPS)

Mittwoch

ELISA:

Überstände → Zweitantikörper → Strept.-HPO → Substrat → Messung

Western:

Proteinextrakte und Proteinbestimmung → Berechnungen → Elektrophorese → Blot → Blockieren → Anti-p38

qRT-PCR:

→ PCR

Reporter-genassay:

Zellextrakte machen und einfrieren

**Donnerstag
01.03.**

9:00 Uhr: **Degranulationstest** (IgE Kreuzvernetzung)

→ **qRT-PCR:** Auswertung

→ **Western:** Sekundärantikörper / Substrat

→ **ELISA:** Auswertung

→ **Reporter-genassay:** Luciferasemessung

Pause

Vorlesung: Allergien

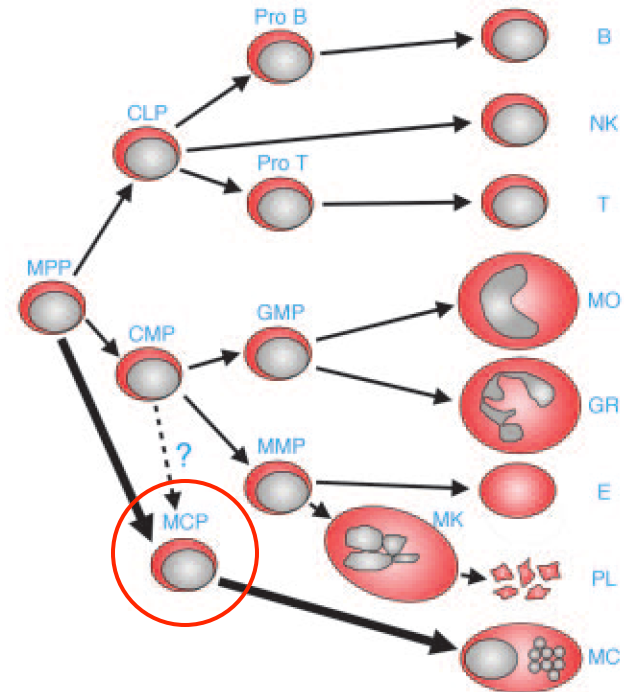
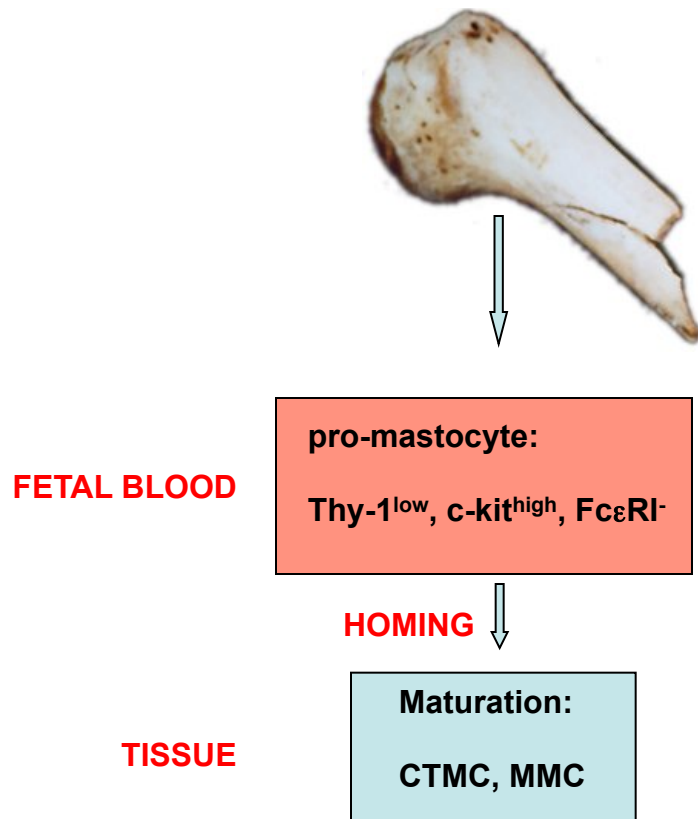
Vorbesprechung des praktischen Teils

- ▶ Entwicklung von Mastzellen, Mastzellsubtypen und Mastzellaktivierung**
- ▶ Degranulationstest und Nachweis der β -Hexosaminidase**
- ▶ Prinzip des Sandwich – ELISA zum Nachweis von IL-9**
- ▶ Prinzip des Western – Blots zum Nachweis der MAP-Kinase p38**
- ▶ Rekombinationen in B- u. T-Zellen, Rekombinase und „ recombination activating gene“**
- ▶ PCR zum Nachweis eines „RAG-2 knock out“**
- ▶ qRT-PCR zur relativen Quantifizierung der IL-6 mRNA Expression in aktivierten Mastzellen**
- ▶ Reportergenassay zur Messung der NF- κ B Aktivität**

Mast cells are derived from mast cell-committed progenitors in the marrow and mature in the tissues

Mast cell-committed progenitor (MCP) in the marrow:

$\text{Lyn}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{Ly6c}^- \text{Fc}\epsilon\text{RI}\alpha^- \text{CD27}^- \beta 7^+ \text{T1/ST2}^+$



MPP = Multipotential progenitor

CMP = Common myeloid progenitor

MCP = Mast cell-committed progenitor

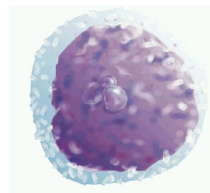
Characteristics of predominant murine and human mast cell subsets

	Biogenic amine	Protease	Proteoglycan	Location
mouse				
Mucosal (MMC)	Histamine Serotonin	MMCP-1,-2	Chondroitin sulfate	intestinal lamina propria, lung
Connective tissue (CTMC)	Histamine Serotonin	MMCP-3,-4,-5,-6 Carboxypeptidase	Heparin (a)	peritoneal cavity, skin
human^(b)				
MC_T	Histamine	Tryptase	Chondroitin sulfate Heparin	lung, intestinal mucosa, nasal mucosa
MC_{TC}	Histamine	Tryptase Chymase Carboxypeptidase Cathepsin G	chondroitin sulfate Heparin	intestinal submucosa skin

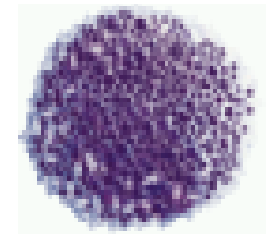
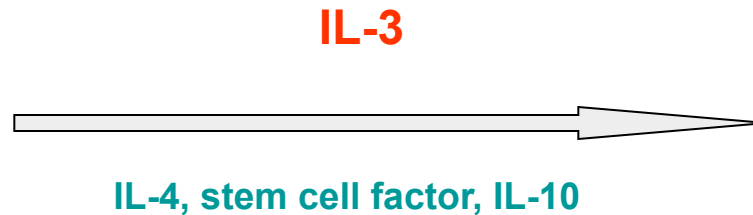
(a) Staining with safranin reflects the presence of heparin in secretory granules.

(b) MC_T corresponds most closely to murine mucosal mast cells (MMC), MC_{TC} to connective tissue mast cells (CTMC).

The tools to study mast cells:
Murine bone marrow-derived mast cells (BMMC) as
model *in vitro*



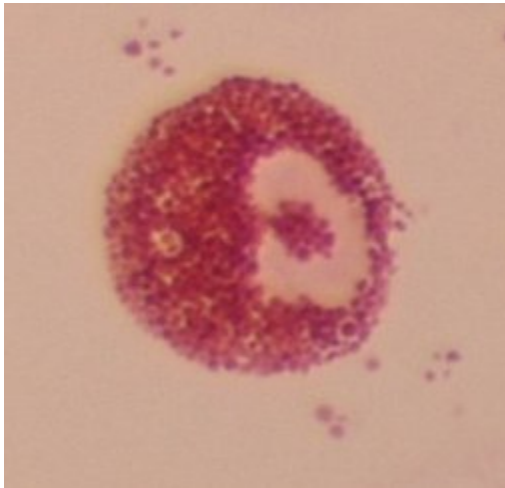
Bone marrow progenitor



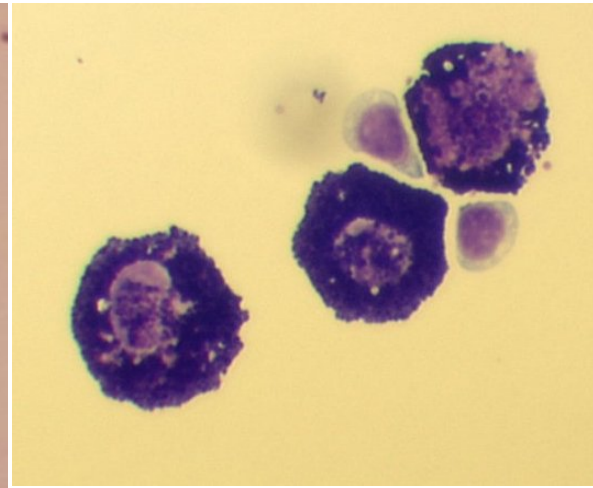
„mucosal“ mast cell

$\text{Fc}_\epsilon\text{RI}^+$, c-kit^+ , CD13^+

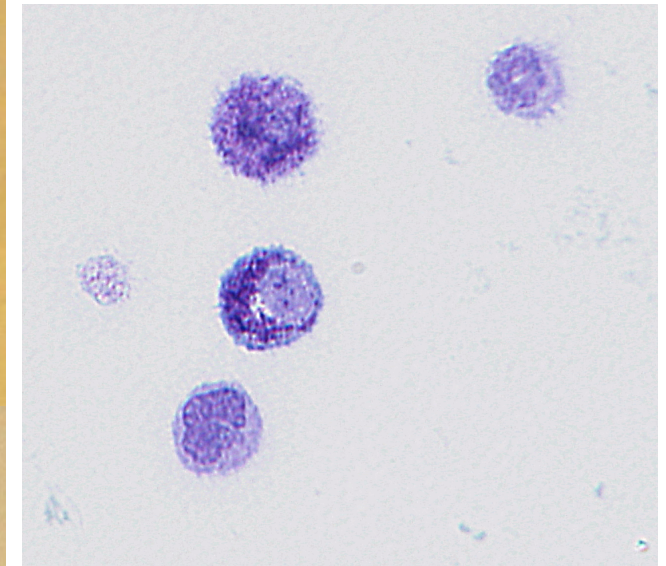
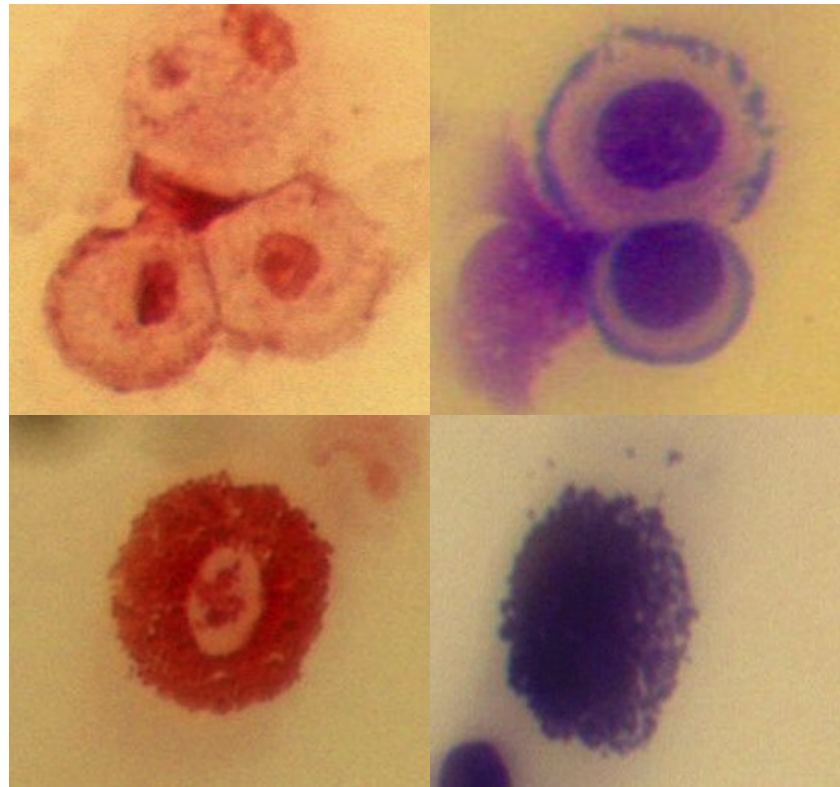
Peritoneal **CTMC** (Safranin)



CTMC (May-Giemsa-Grünwald)

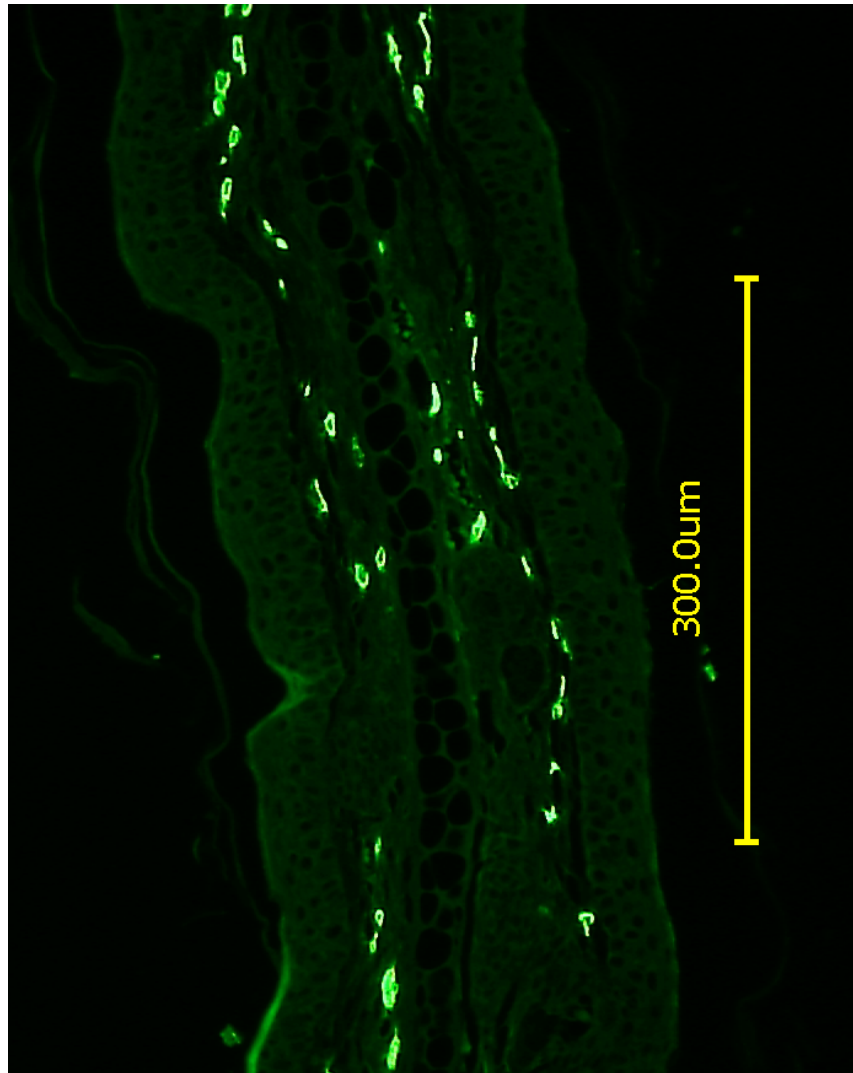


Dermal
CTMC

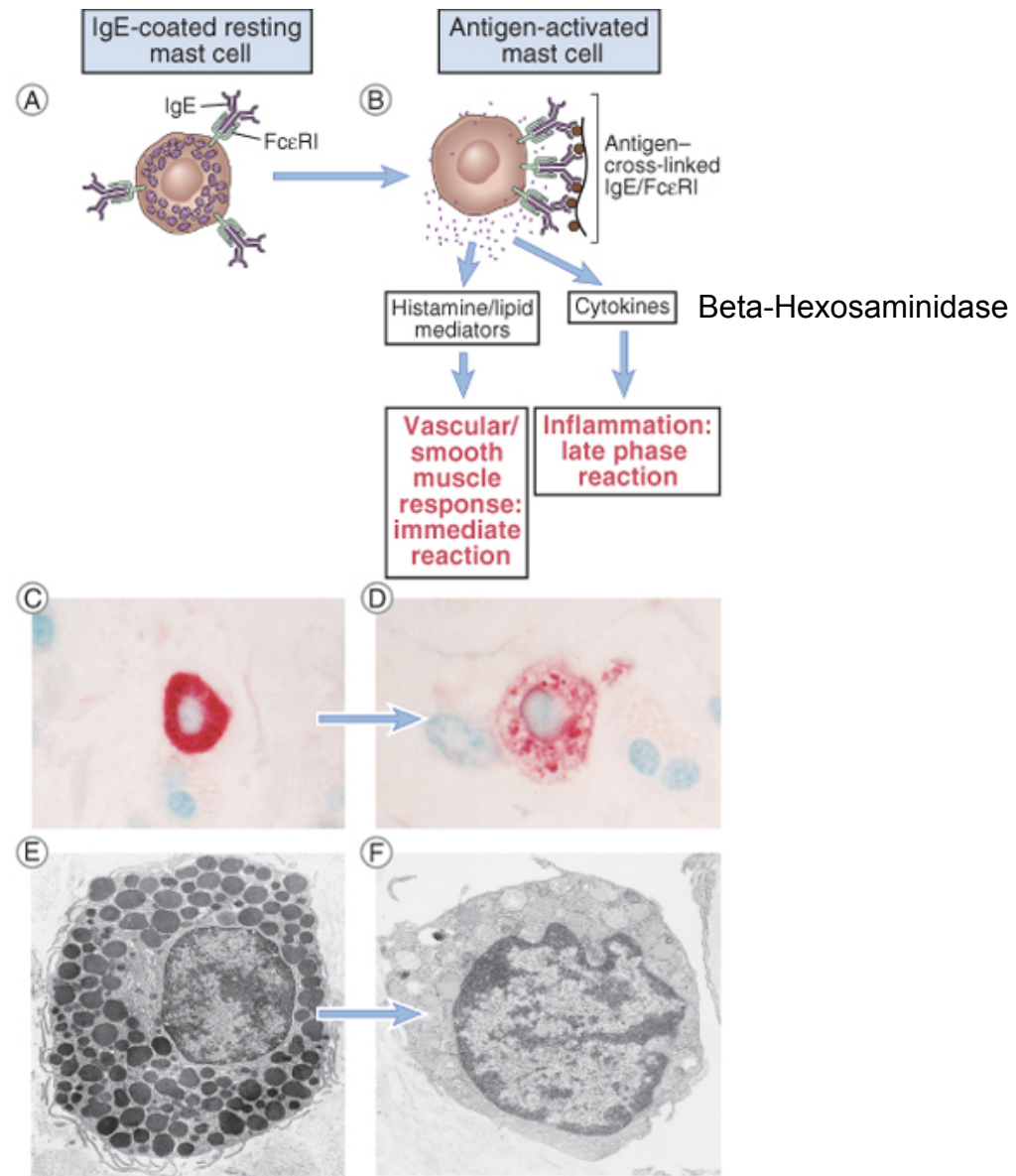


BMMC (May-Giemsa-Grünwald)

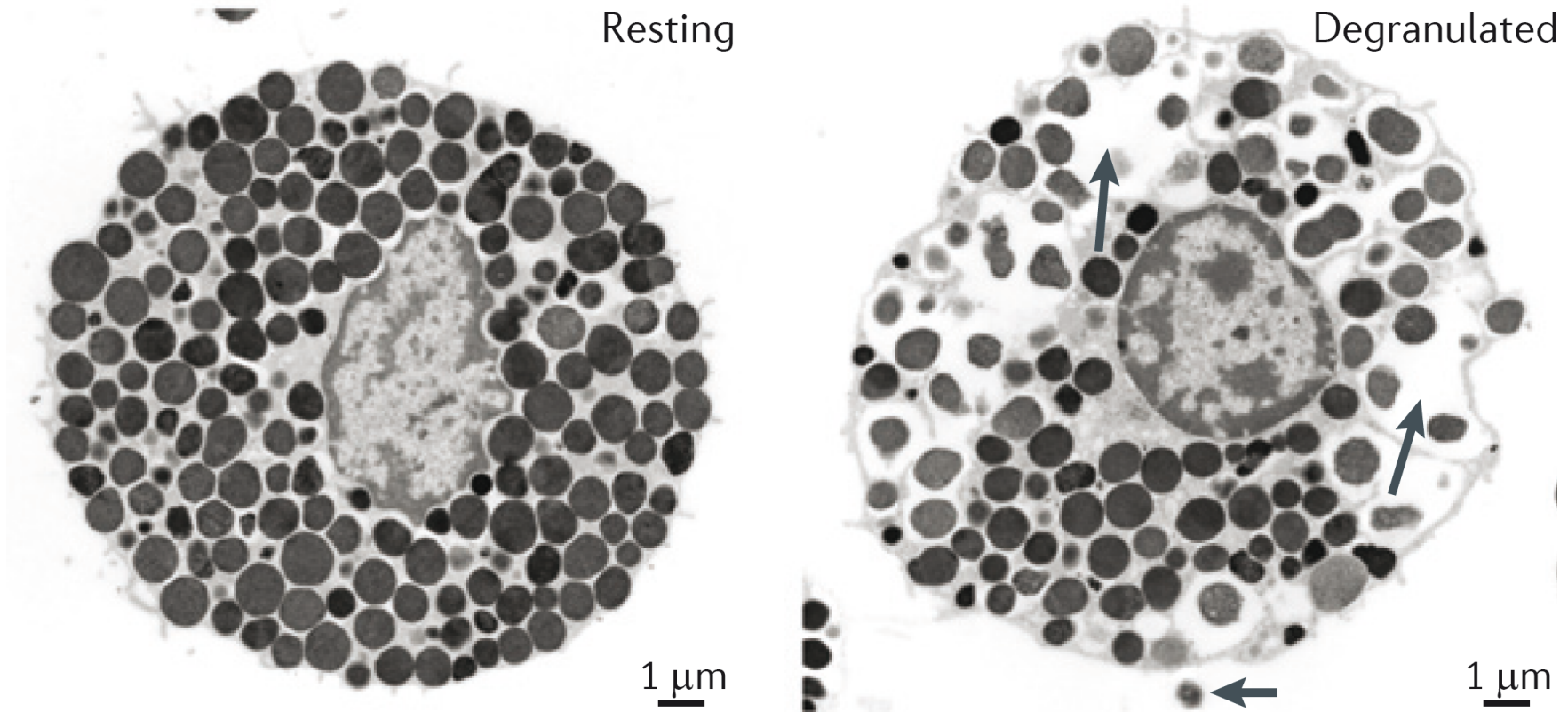
Avidin-Alexa-488 Färbung eines Ohrschnittes



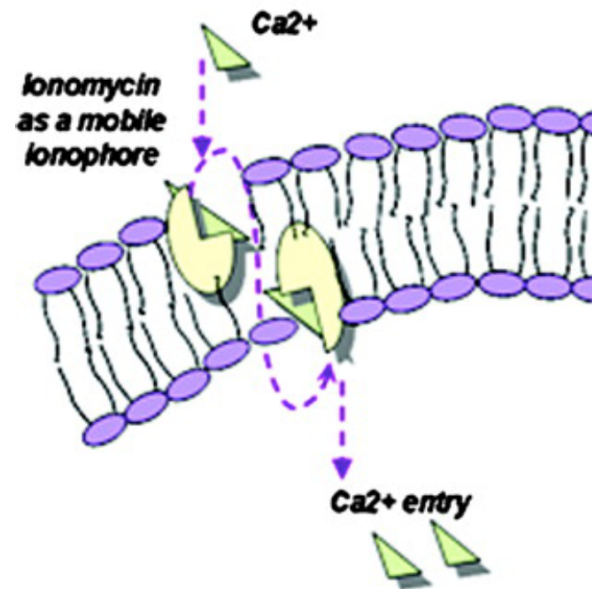
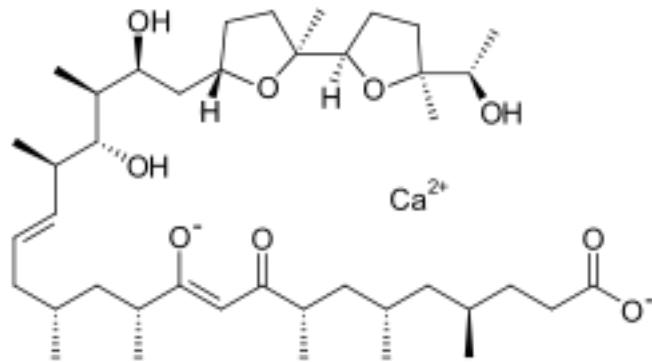
Mastzell-Degranulation

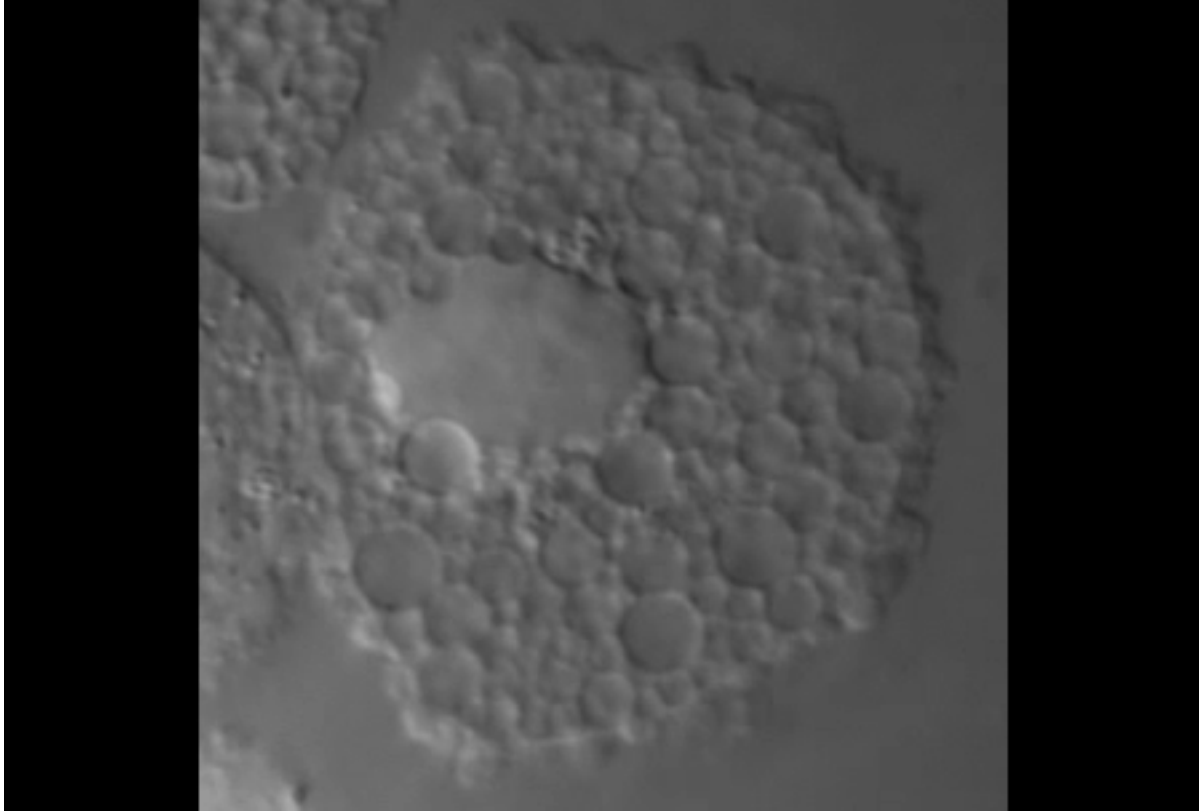


Anaphylaktische Degranulation: Durch Fusion von Granula bilden sich Kanäle Membranfreie Granulamatrix wird exocytiert

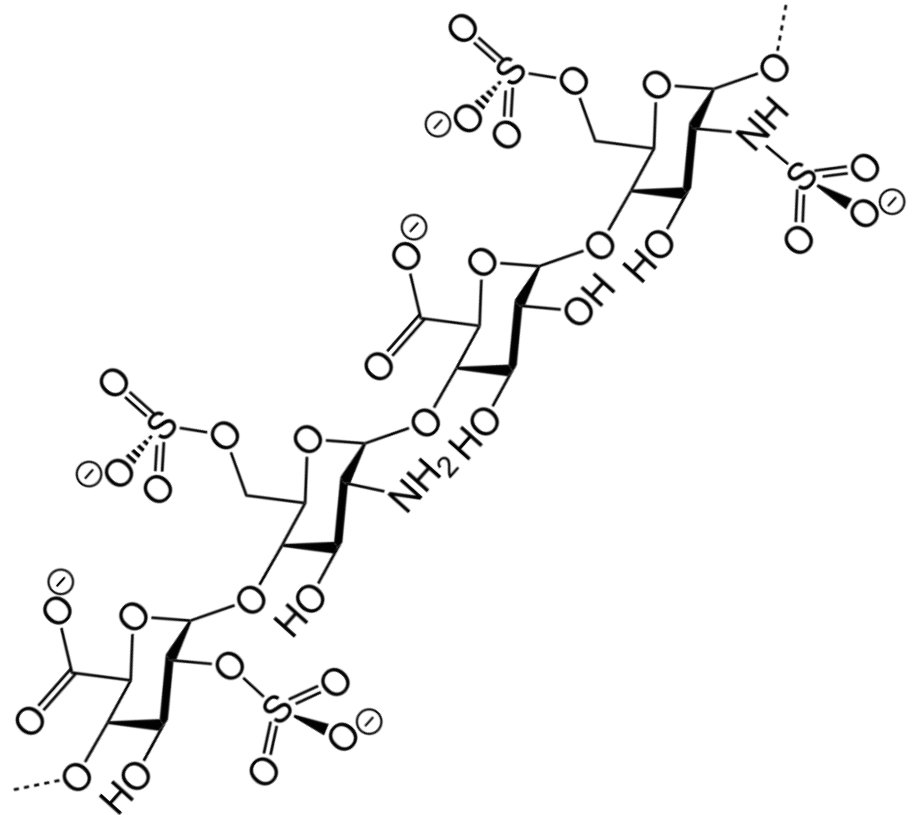
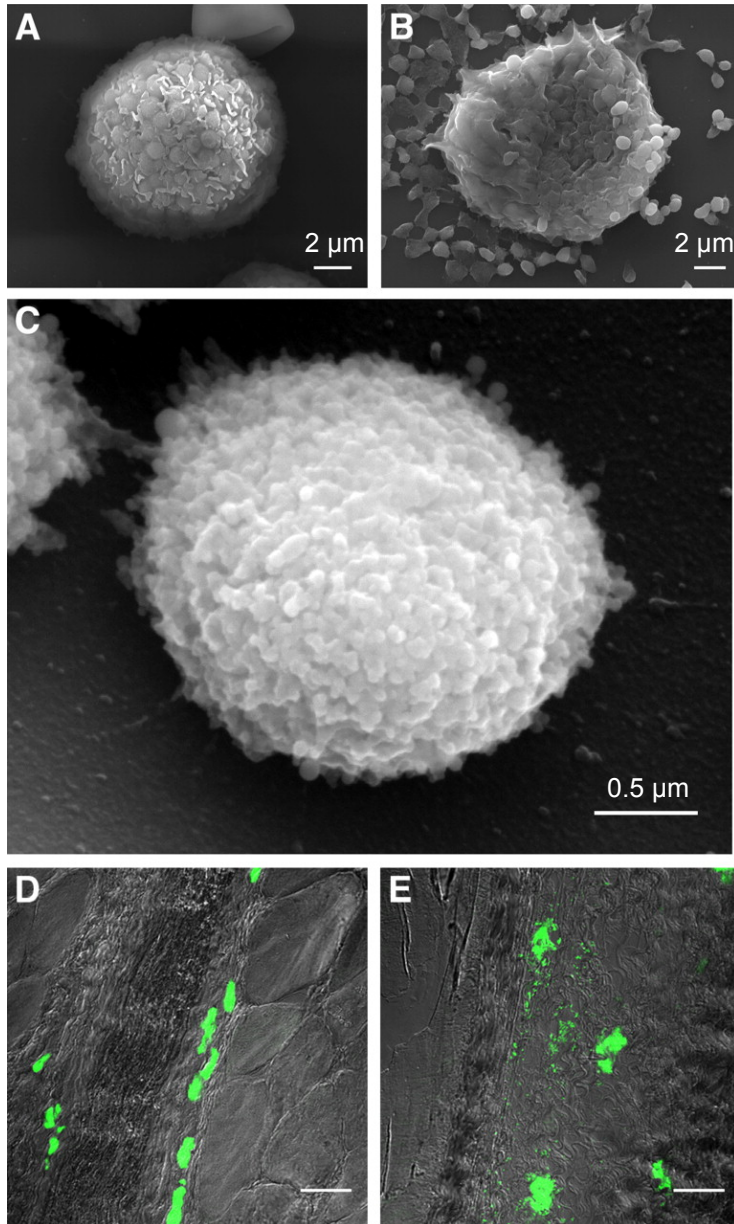


Ionomycin (aus *Streptomyces conglobatus*) ist ein mobiler Träger („Ionophor“) zum Transport von Ca^{2+} und anderer bivalenter Ionen über biologische Membranen

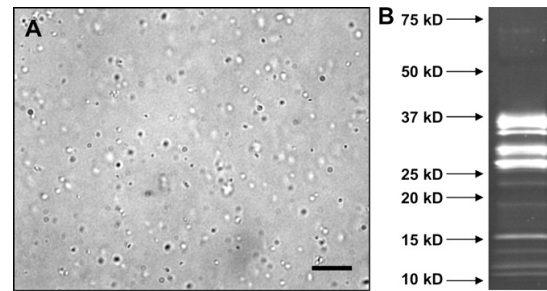




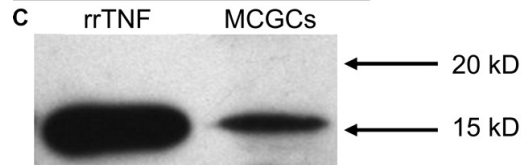
Aktivierte Mastzellen sezernieren heparinhaltige, membranlose und unlösliche Partikel



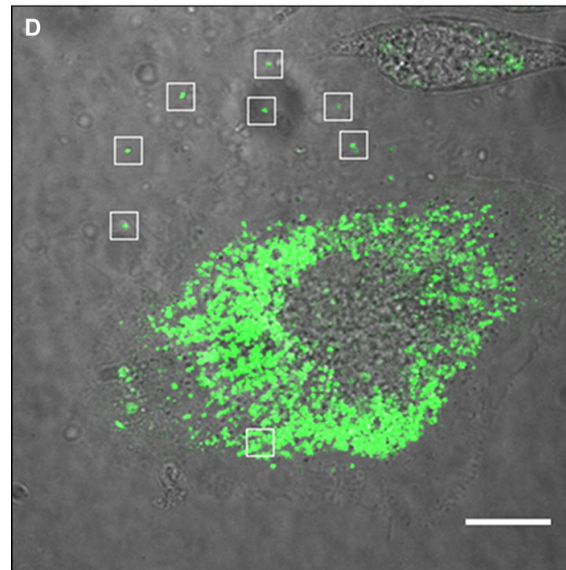
Von Mastzellen sezernierte Partikel enthalten TNF



Gereinigte Partikel



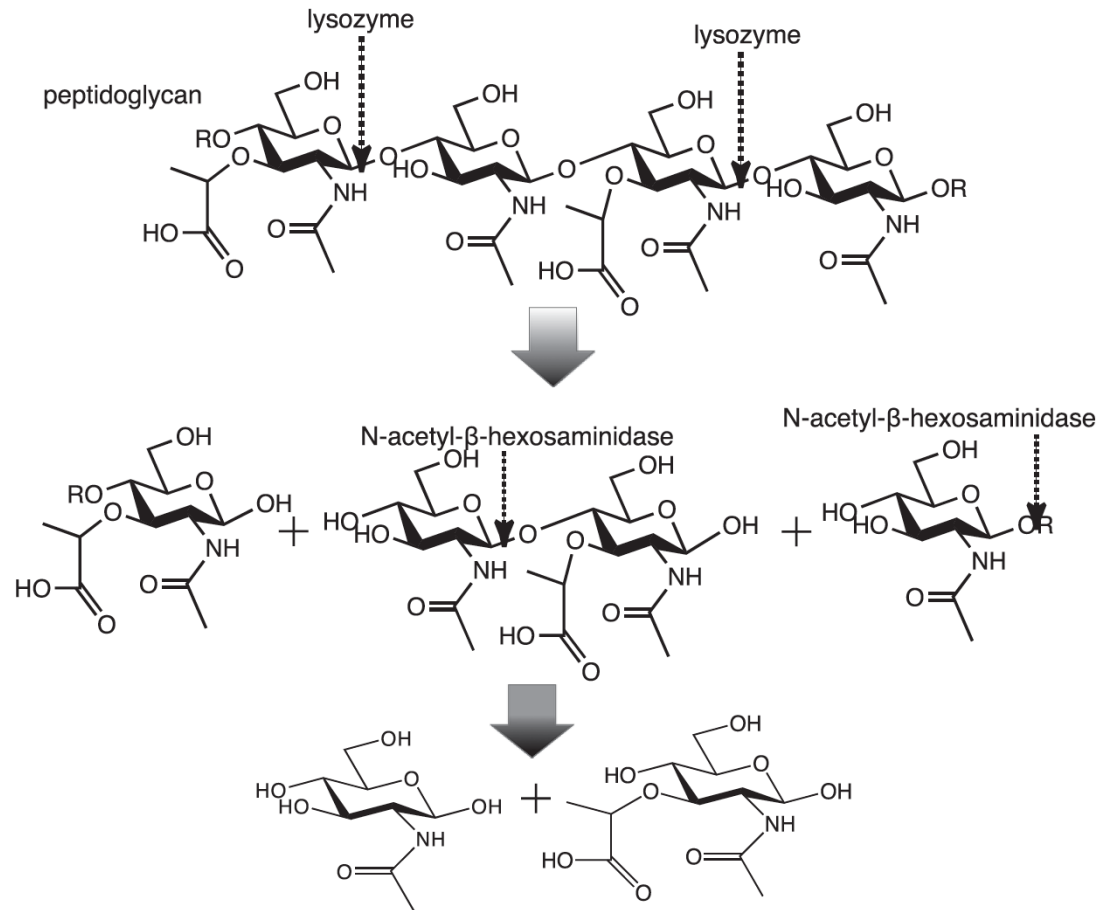
TNF Nachweis im Western Blot



Expression eines TNF-GFP
Fusionsproteins

Eigenschaften der beta-Hexosaminidase

FIGURE 7. Proposed scheme of the cleavage of PGN by lysozyme and β -hexosaminidase. Lysozyme first nicks the endogenous β -1,4 bond between *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid. At this stage, β -hexosaminidase cannot attack the β -1,4 bond because it is an exo-type enzyme. Next, the generated disaccharide consisting of *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine is digested by β -hexosaminidase. As a consequence, these monomeric sugars are generated and PGN is completely digested.



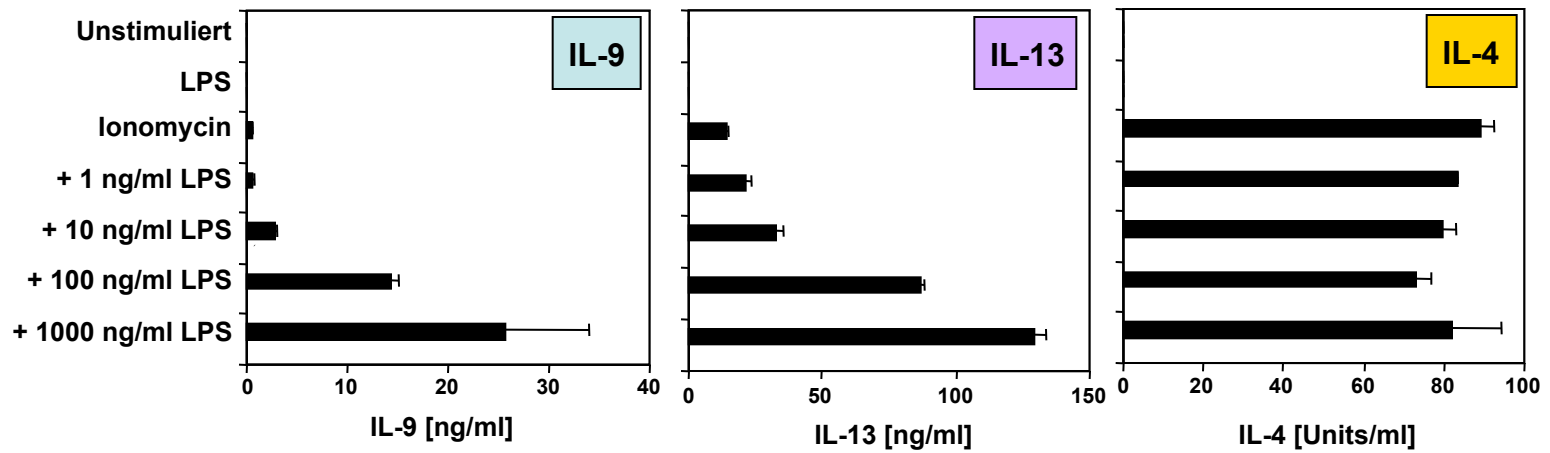
Farbreaktion in vitro:

p-Nitrophenyl-Acetyl-D-Glucosamin

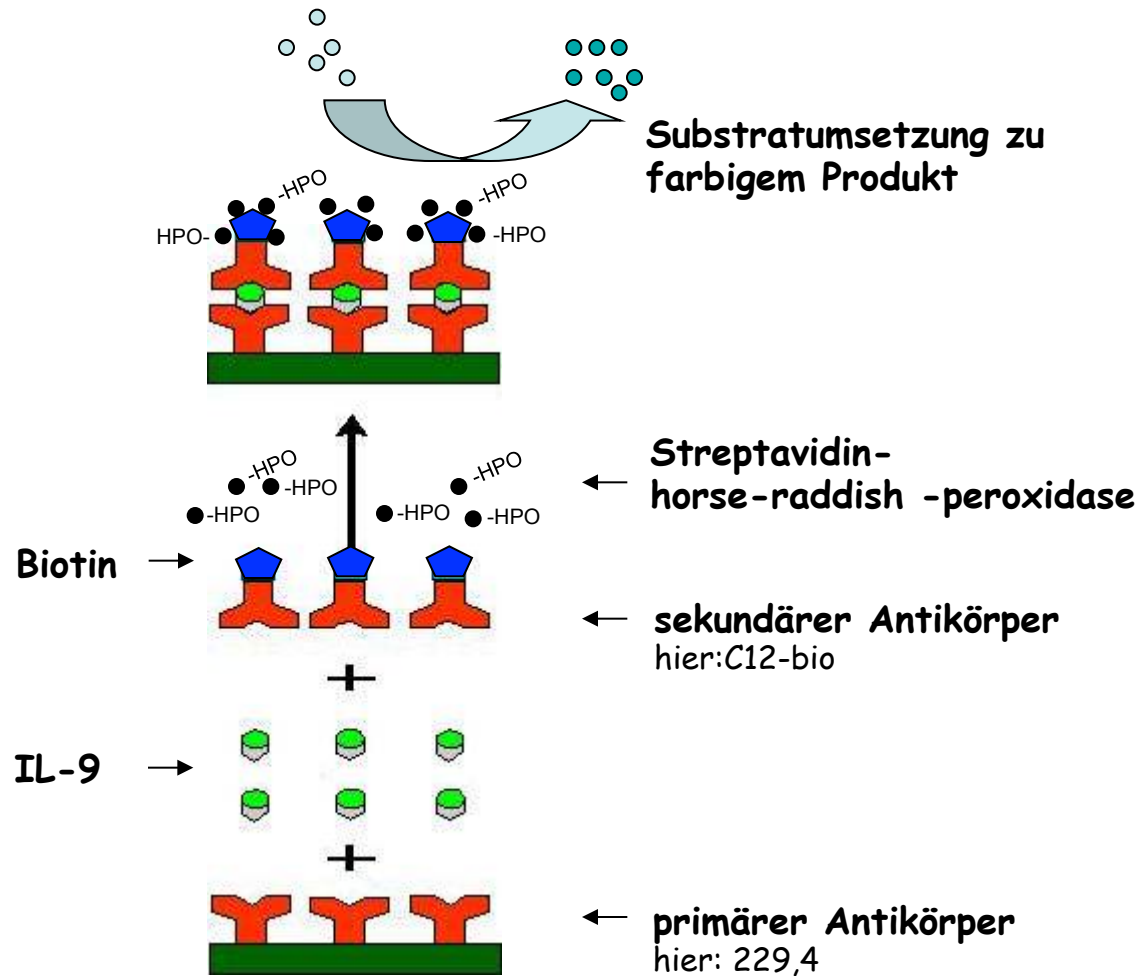


N-Acetyl-D-Glucosamin + p-Nitrophenol

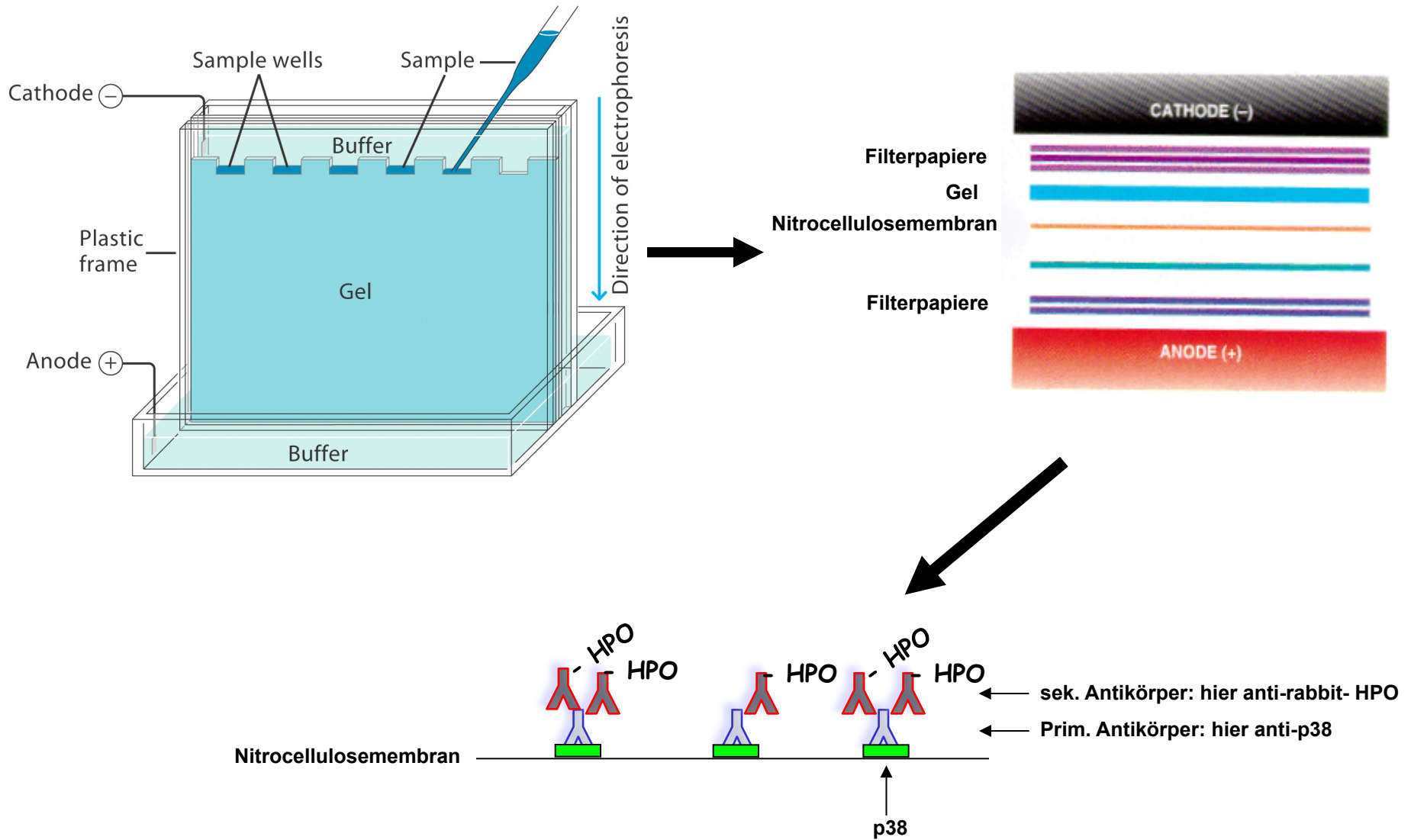
Mastzell-spezifische Regulation der Produktion von Th2-Cytokinen: **LPS** als Ko-Stimulus



Sandwich-ELISA („Enzyme-linked immunosorbend assay“)



Western Blot: Übersichtsschema



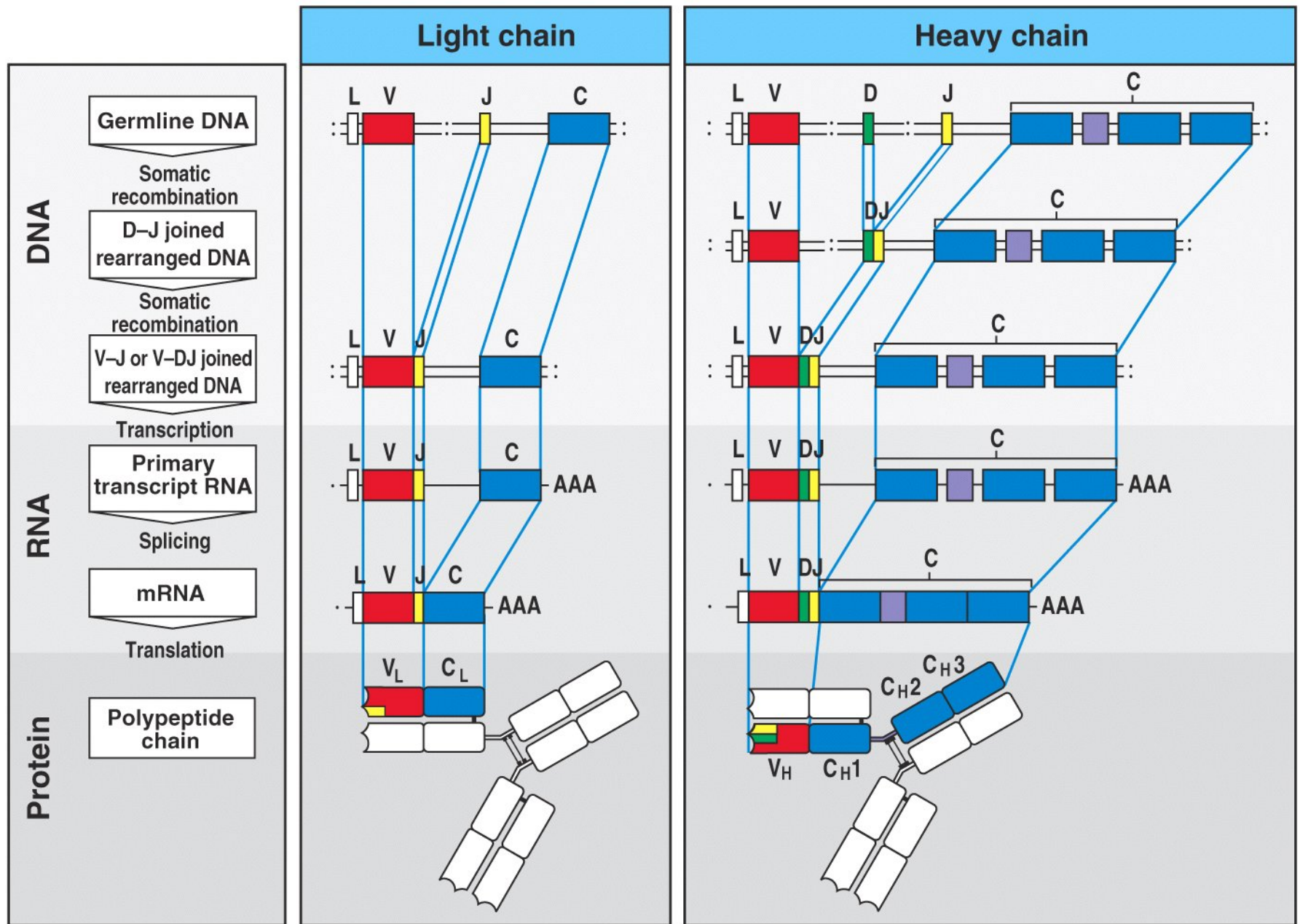


Figure 4-2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

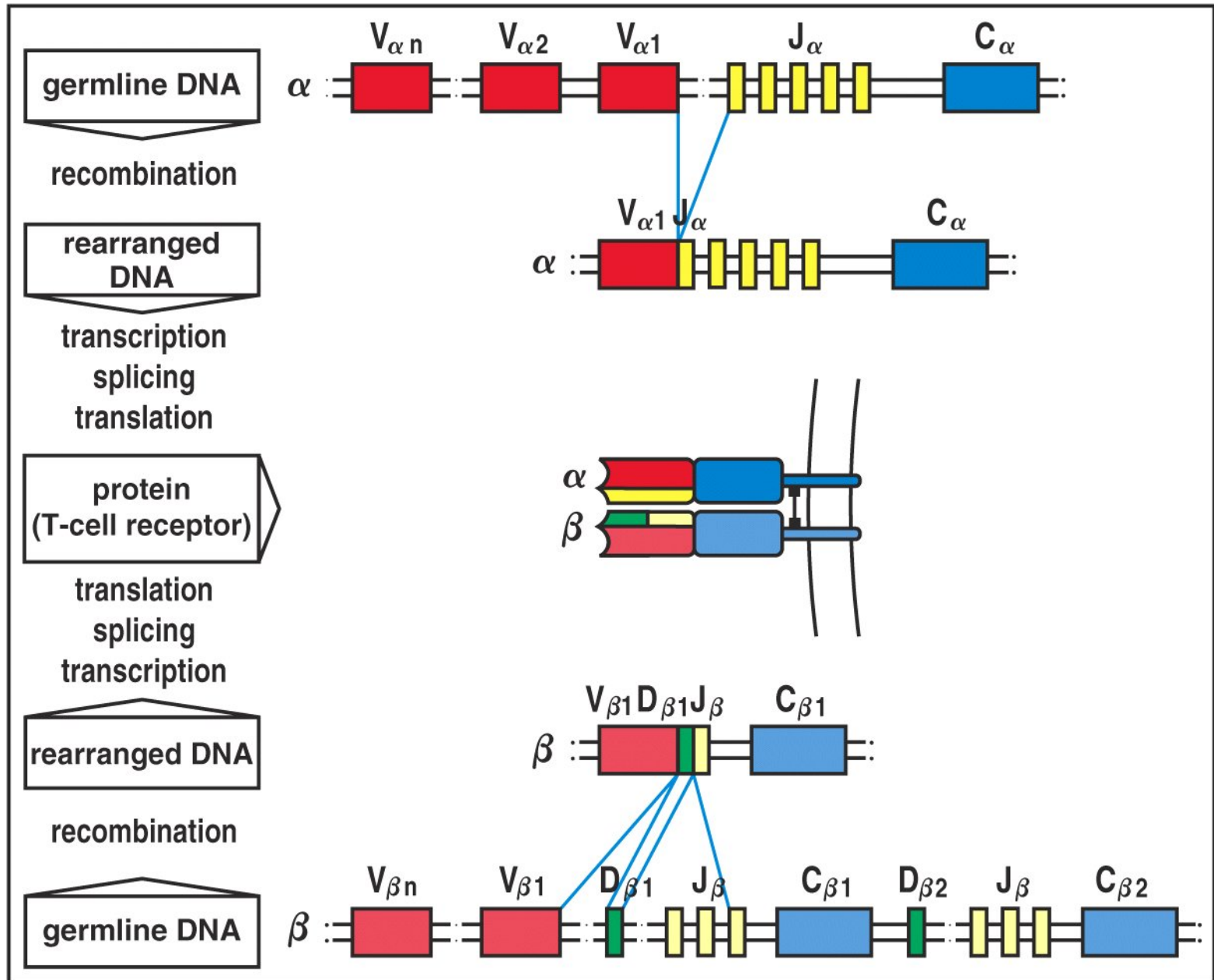
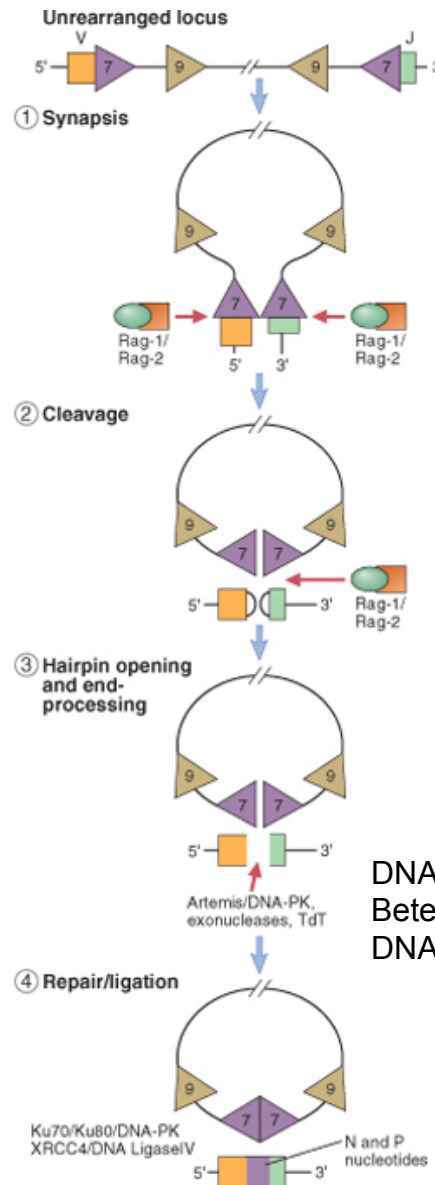


Figure 4-12 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

„recombination-activating gene“ 1 and 2 (Rag-1, Rag-2) bilden die V(D)J Rekombinase



DNA-PK: DNA-abhängige Proteinkinase
Beteiligt an Reparatur des Doppelstrangbruchs
DNA-PK Defekt führt zu einer Form von *SCID*

PCR-Nachweis der RAG-2 Defizienz (knock out)

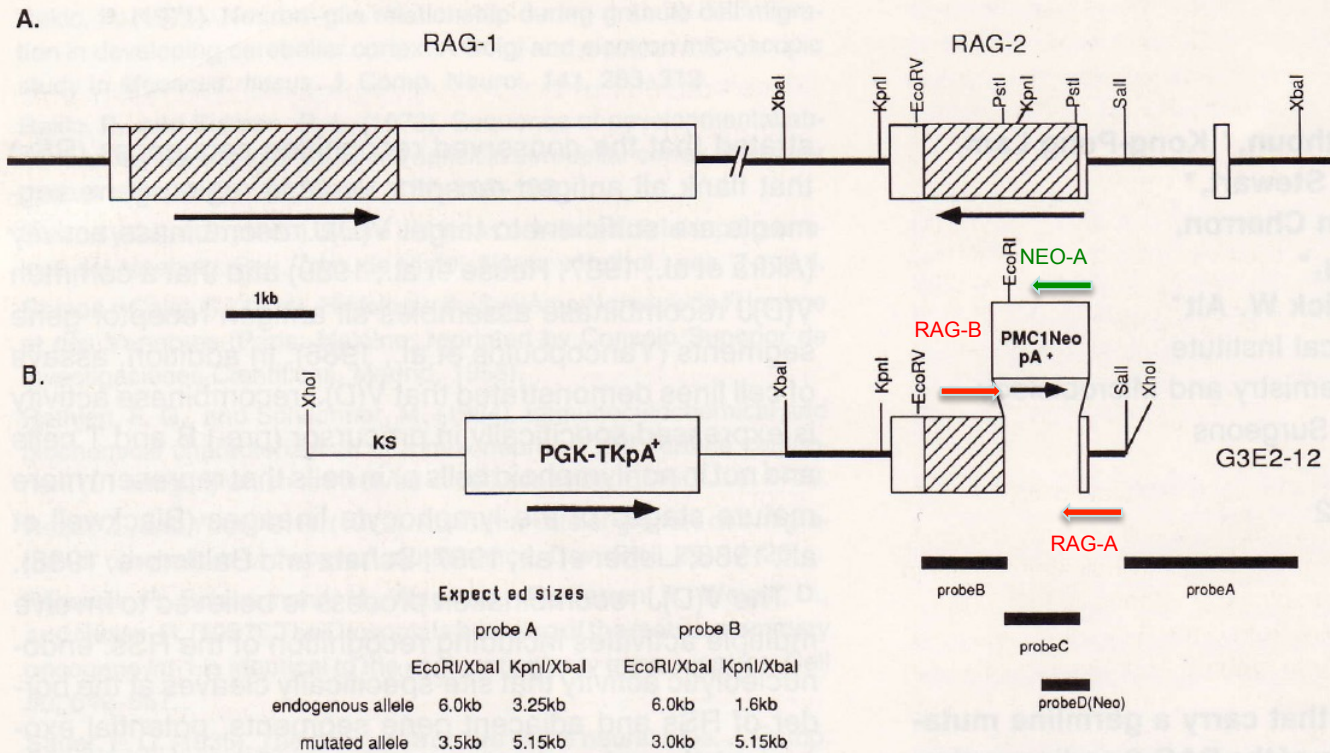


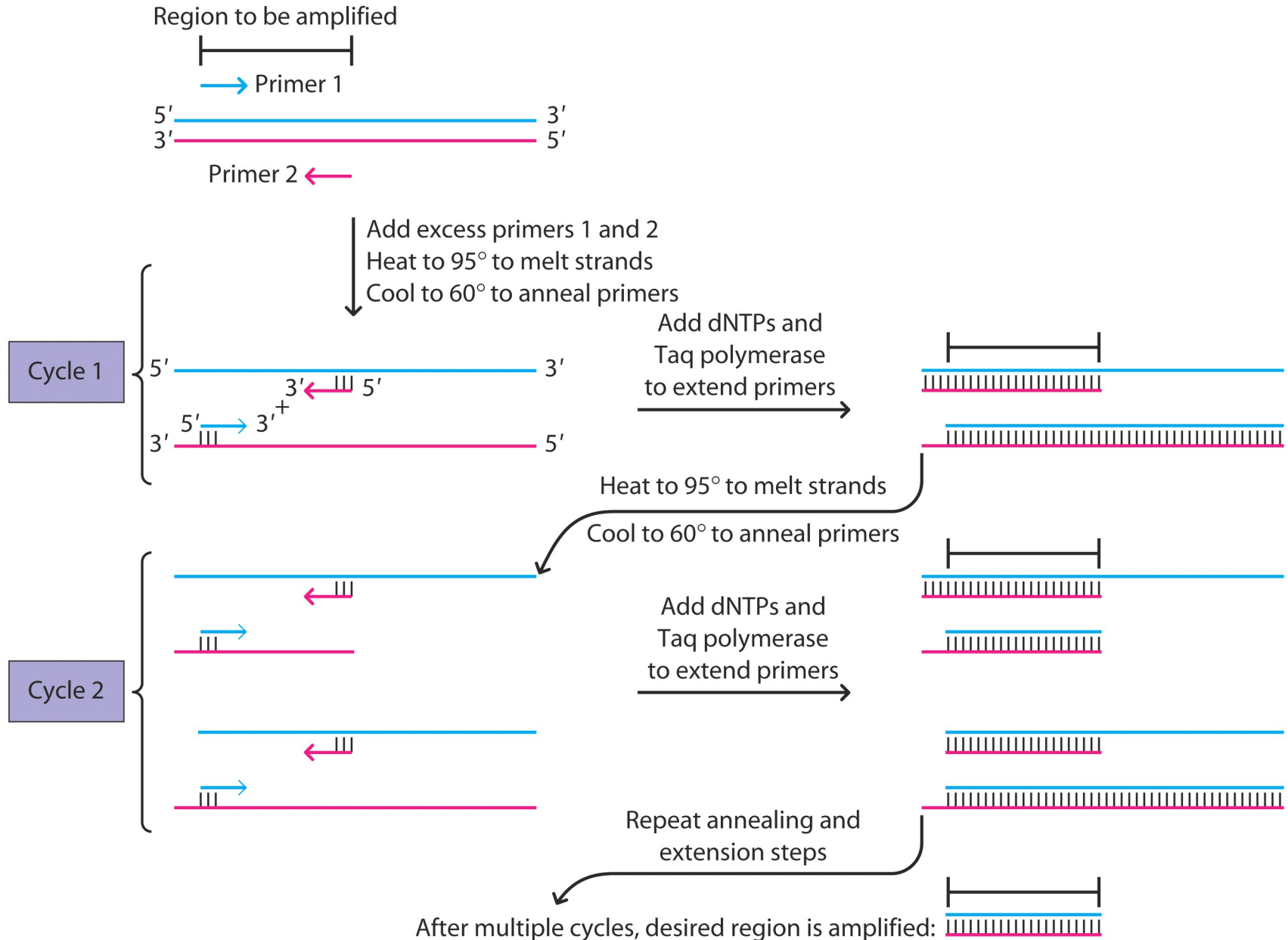
Figure 1. The Endogenous RAG Locus and the Targeting Construct for Homologous Recombination

(A) Partial restriction endonuclease map of the RAG-2 locus. Bold lines represent introns, open boxes show exons of RAG genes, and hatched boxes indicate coding regions of these genes. Arrows represent transcriptional orientation of the RAG genes.

(B) Design of the RAG-2 targeting construct, G3E2-12. This vector was constructed as described in the Experimental Procedures. The PstI-PstI portion of the RAG-2 coding region was replaced with a 1.1 kb PMC1neo/poly(A)⁺ fragment (PMC1Neo pA⁺). Thin lines represent plasmid sequences of KS pBluescript. Arrows indicate the transcriptional orientation of the HSV-tk and neo genes. Probes used in this study are shown under the targeting construct: probe A, SalI-XbaI 5' RAG-2 fragment; probe B, EcoRV-PstI RAG-2 fragment; probe C, PstI-PstI RAG-2 fragment; probe D, PstI-BamHI neo gene fragment from PMC1neo/poly(A)⁺. The expected sizes of restriction fragments detected by probes A and B are shown.

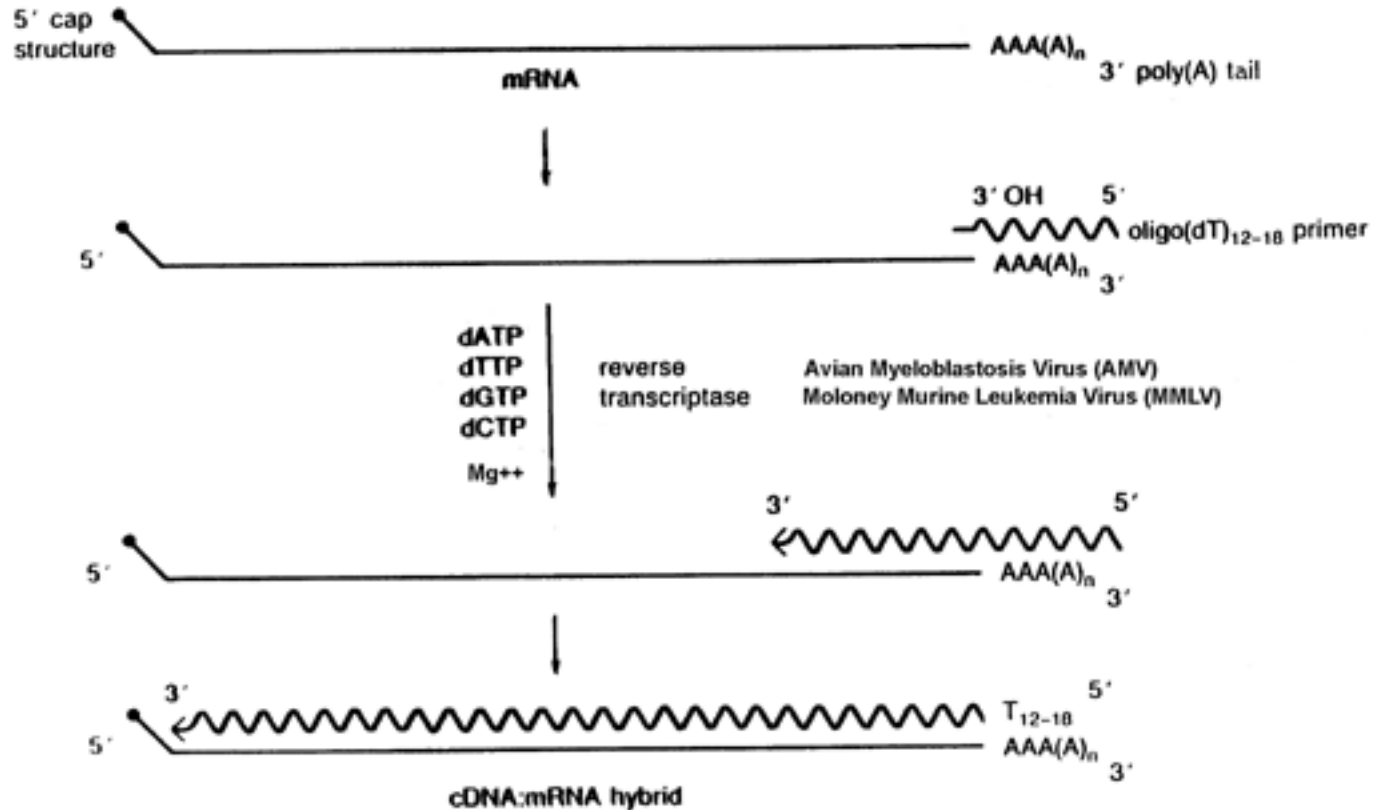
PGK-TKpA⁺ : Phosphoglyceratkinase-Promoter steuert Expression der Herpes Simplex Virus Thymidinkinase

Prinzip der Polymerase Kettenreaktion



RT-PCR: Nachweis von mRNA nach Umschrift in cDNA („copy“)

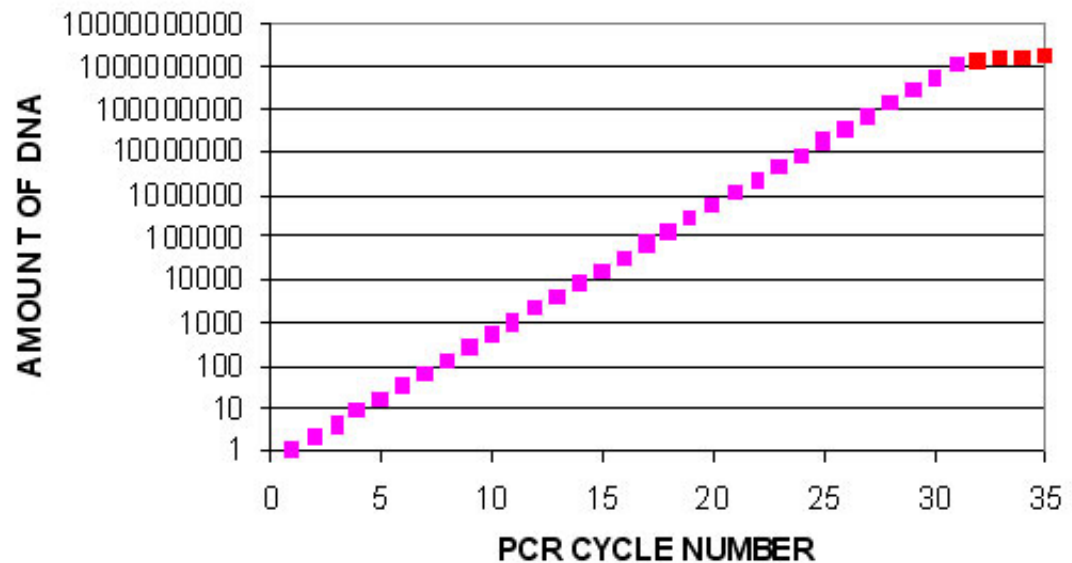
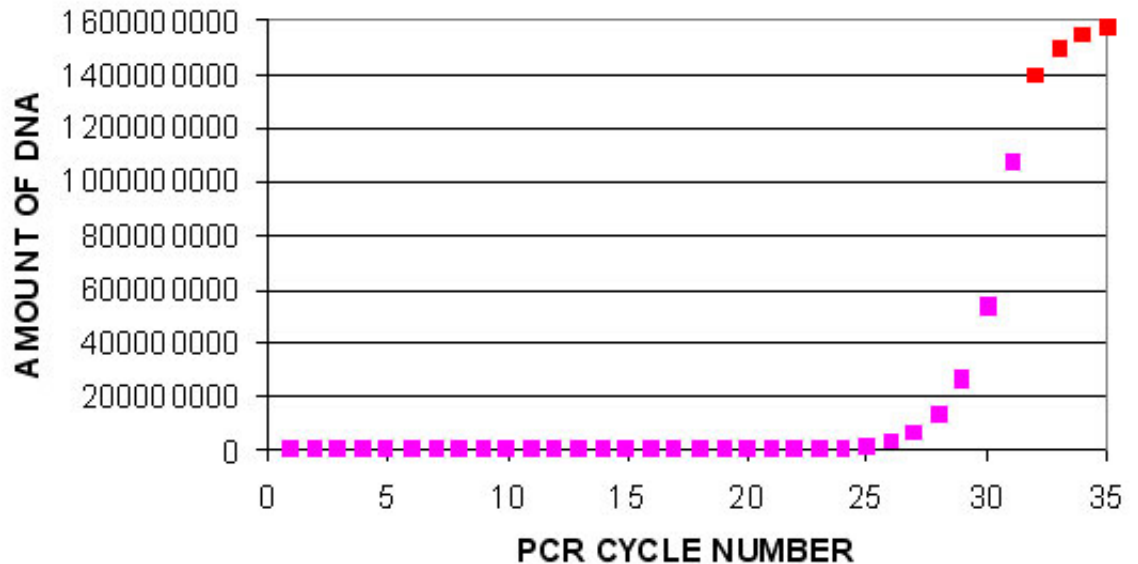
Traditional cDNA synthesis



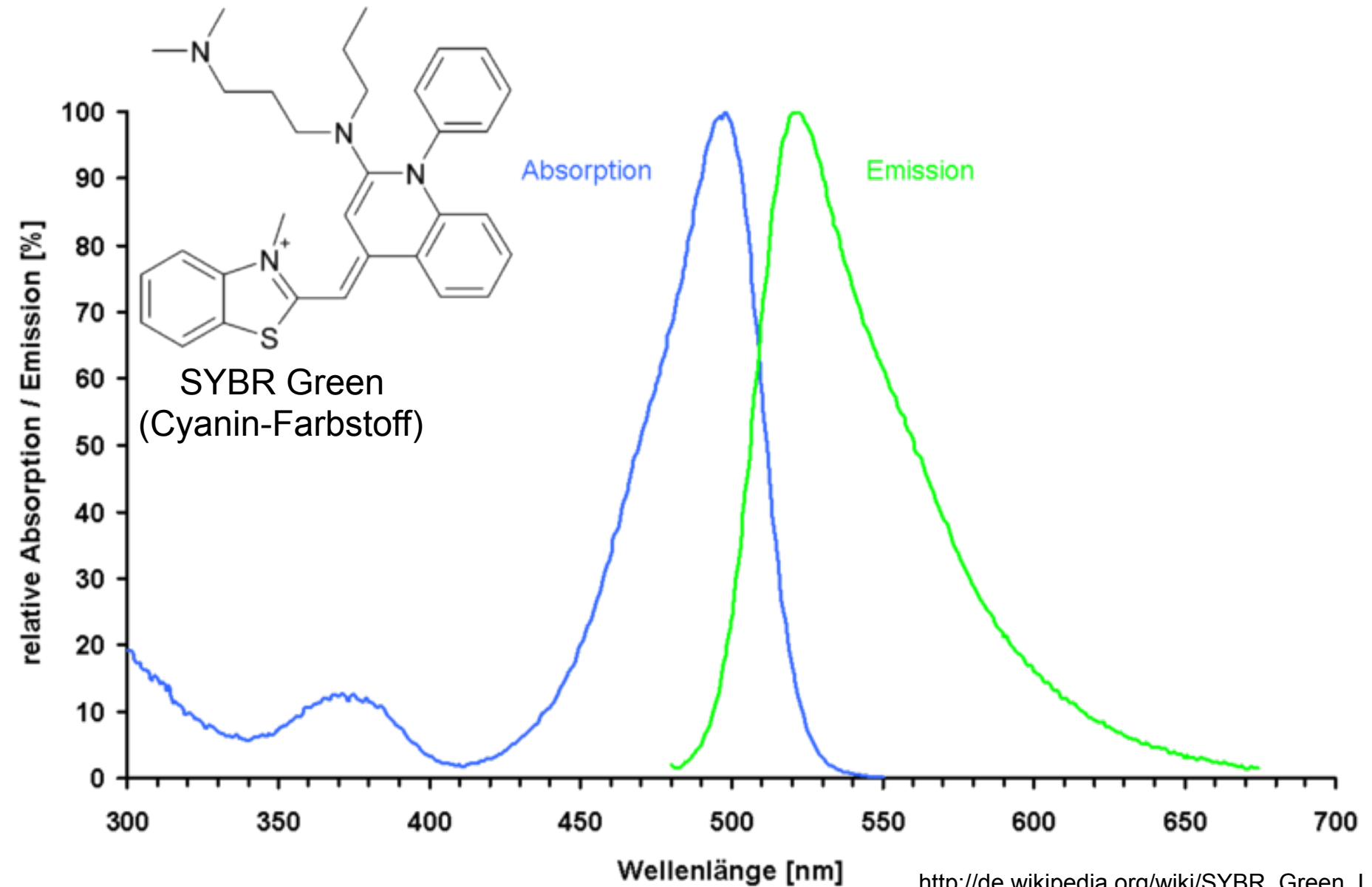
Synthesis of the first strand of cDNA using an oligo(dT) primer and reverse transcriptase.

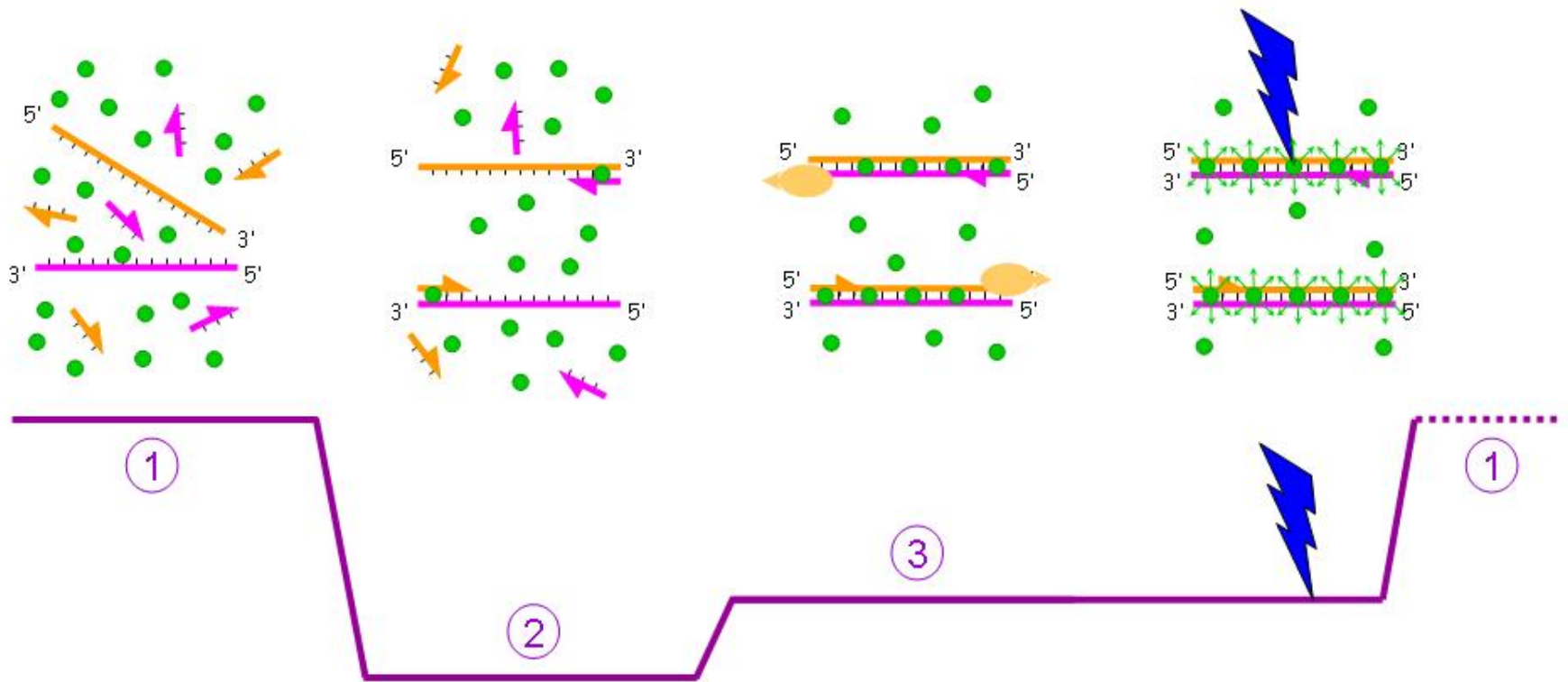
$$\text{DNA-Menge} = \text{Ausgangsmenge} \times (\text{Effizienz} + 1)^{\text{Zykluszahl}}$$

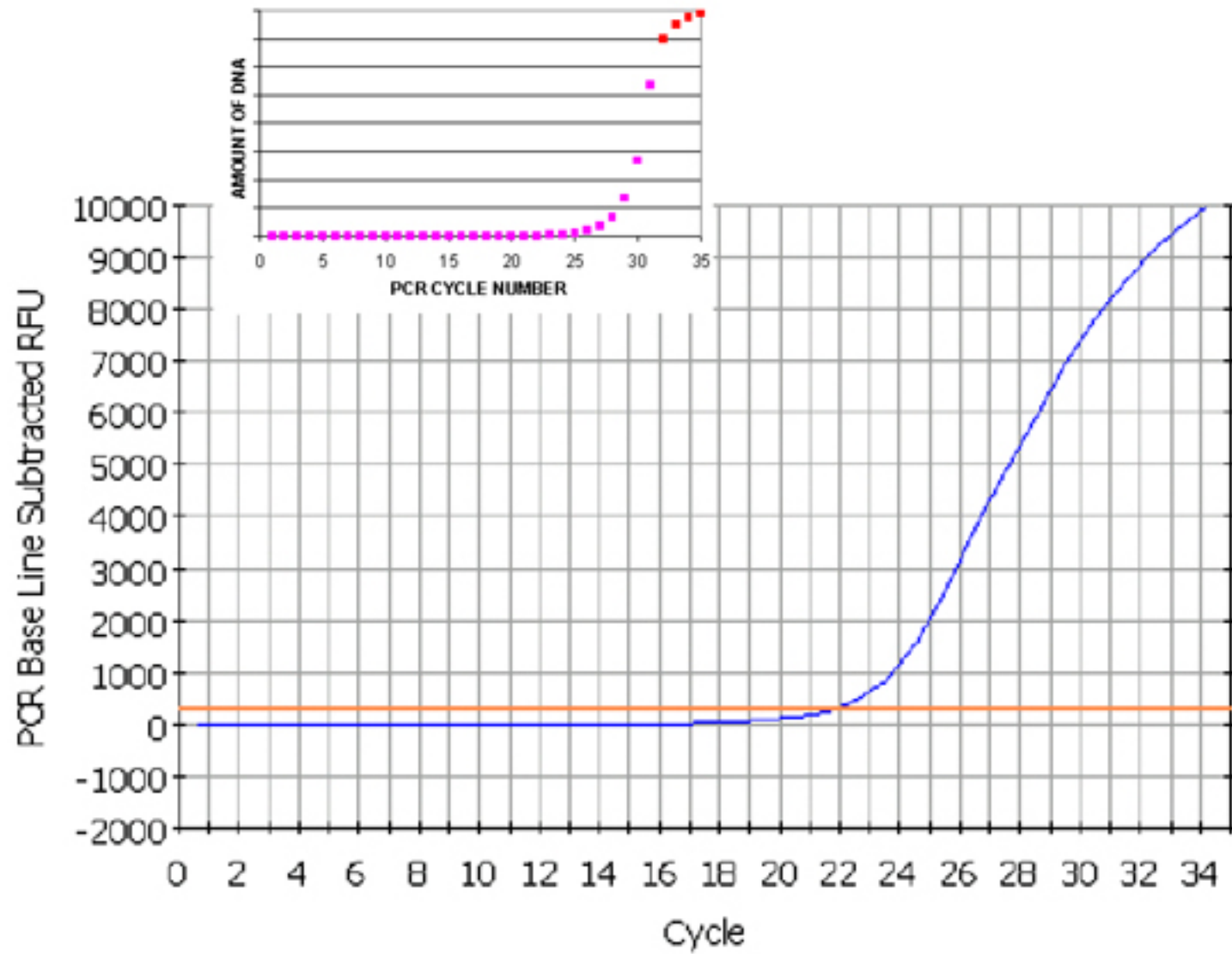
CYCLE NUMBER	AMOUNT OF DNA
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1,024
11	2,048
12	4,096
13	8,192
14	16,384
15	32,768
16	65,536
17	131,072
18	262,144
19	524,288
20	1,048,576
21	2,097,152
22	4,194,304
23	8,388,608
24	16,777,216
25	33,554,432
26	67,108,864
27	134,217,728
28	268,435,456
29	536,870,912
30	1,073,741,824
31	1,400,000,000
32	1,500,000,000
33	1,550,000,000
34	1,580,000,000

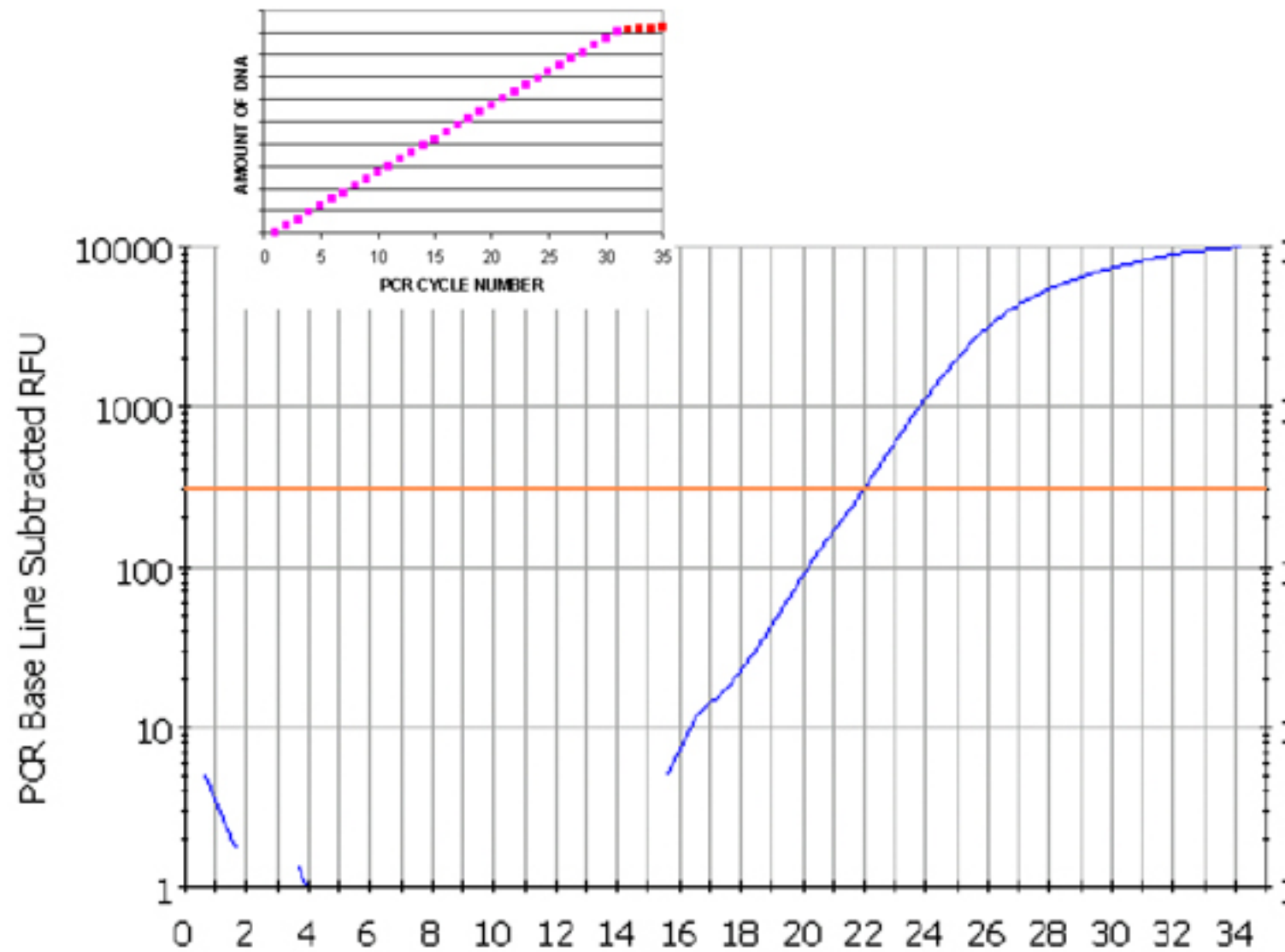


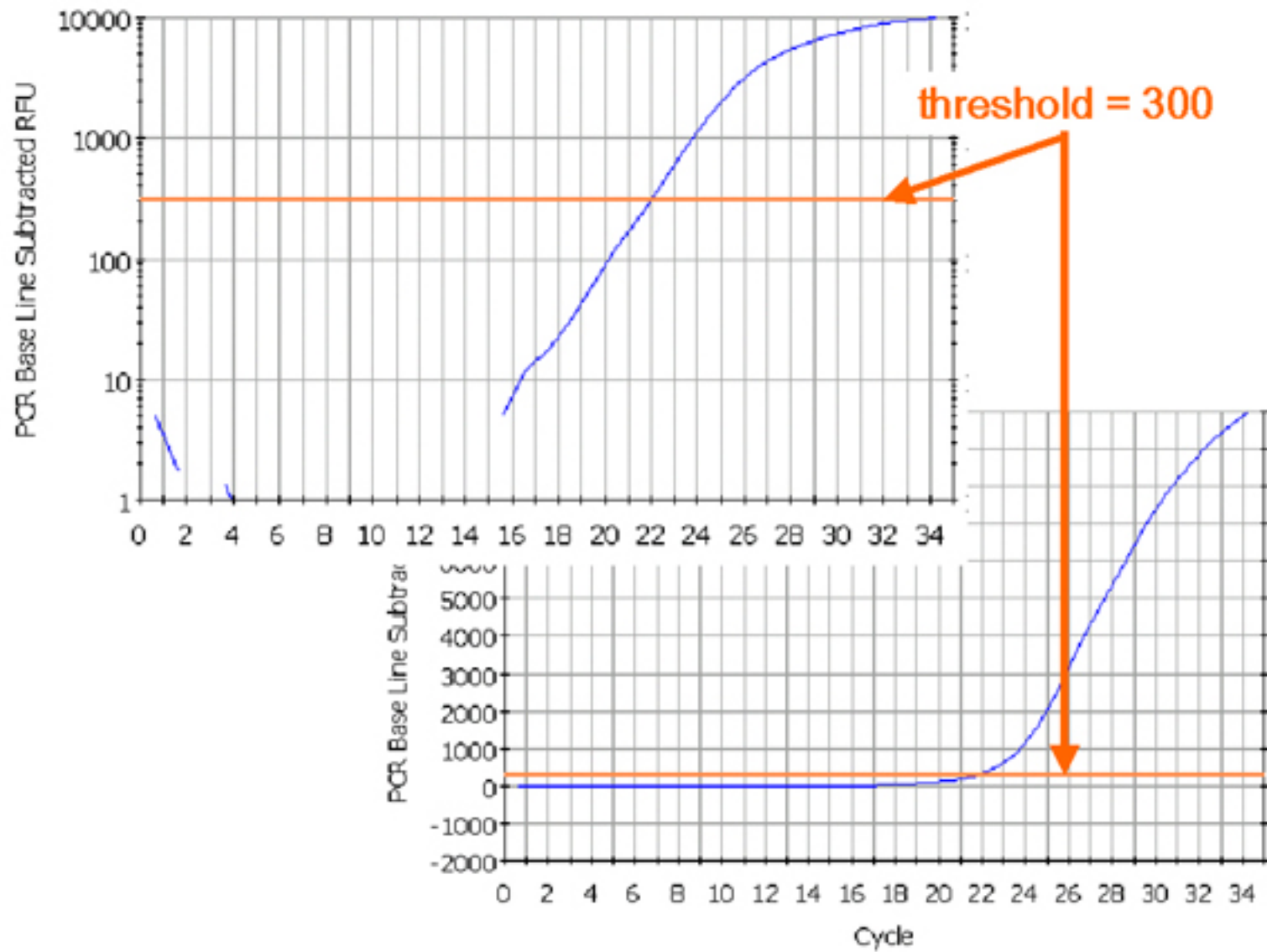
SYBR Green bildet dsDNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexe

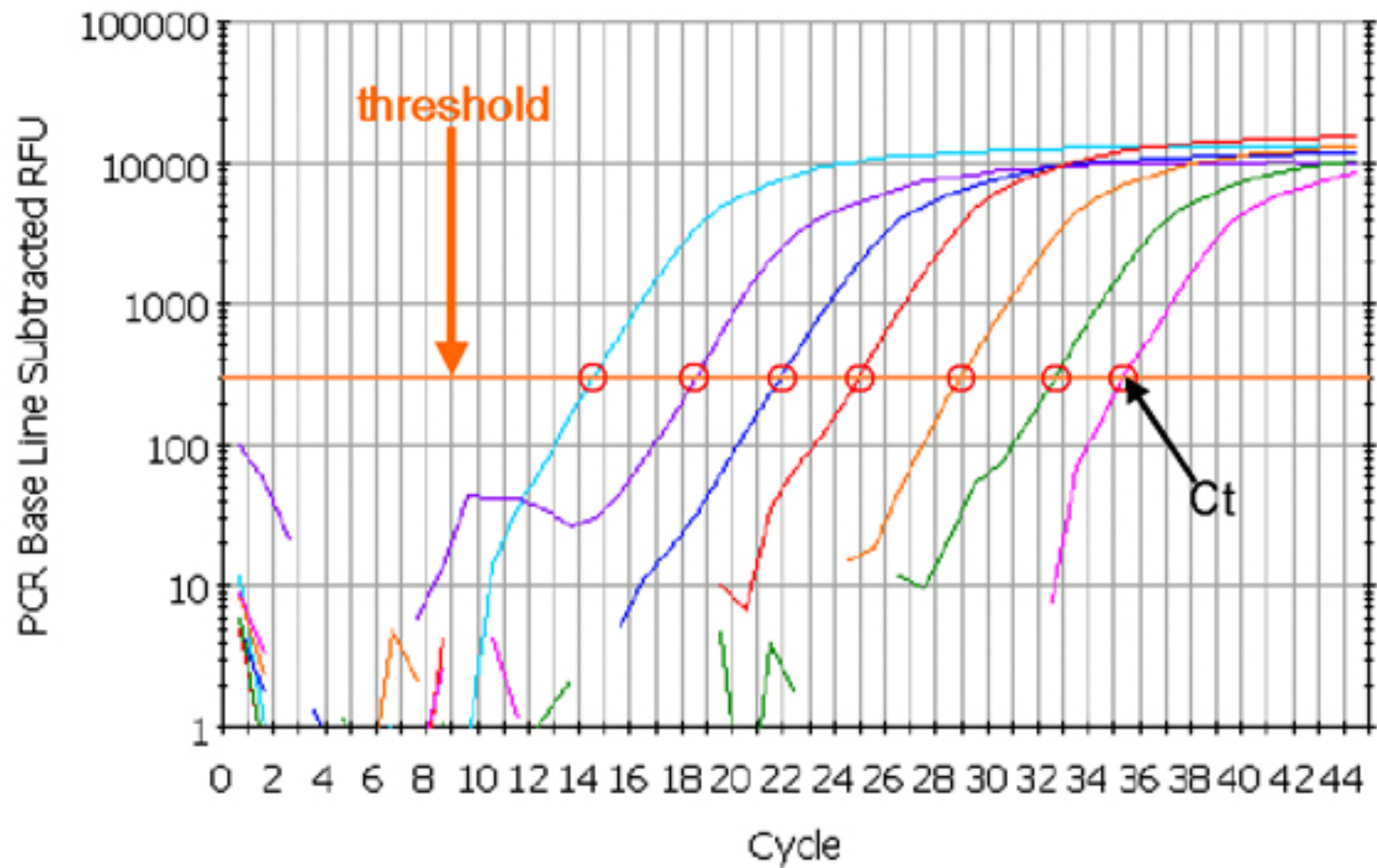






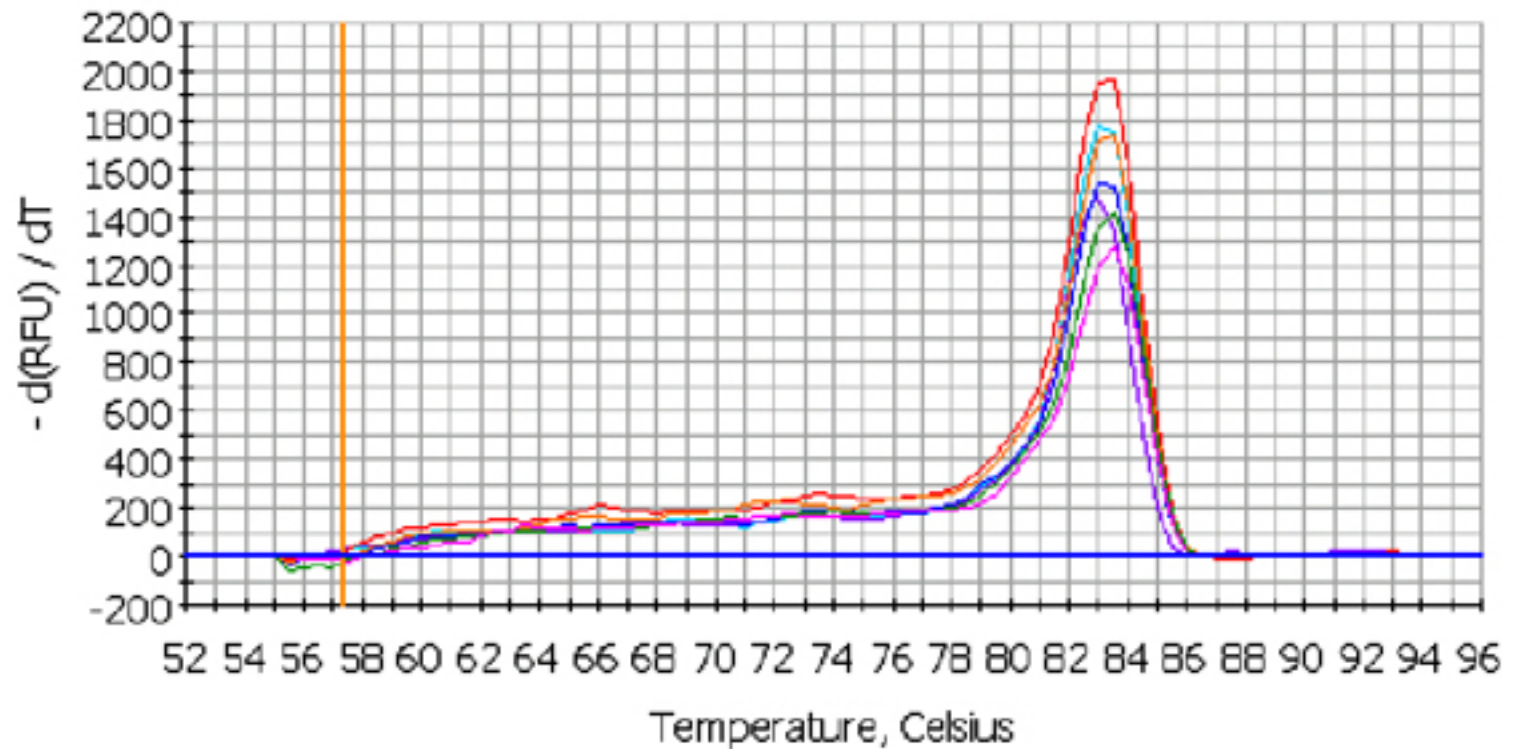




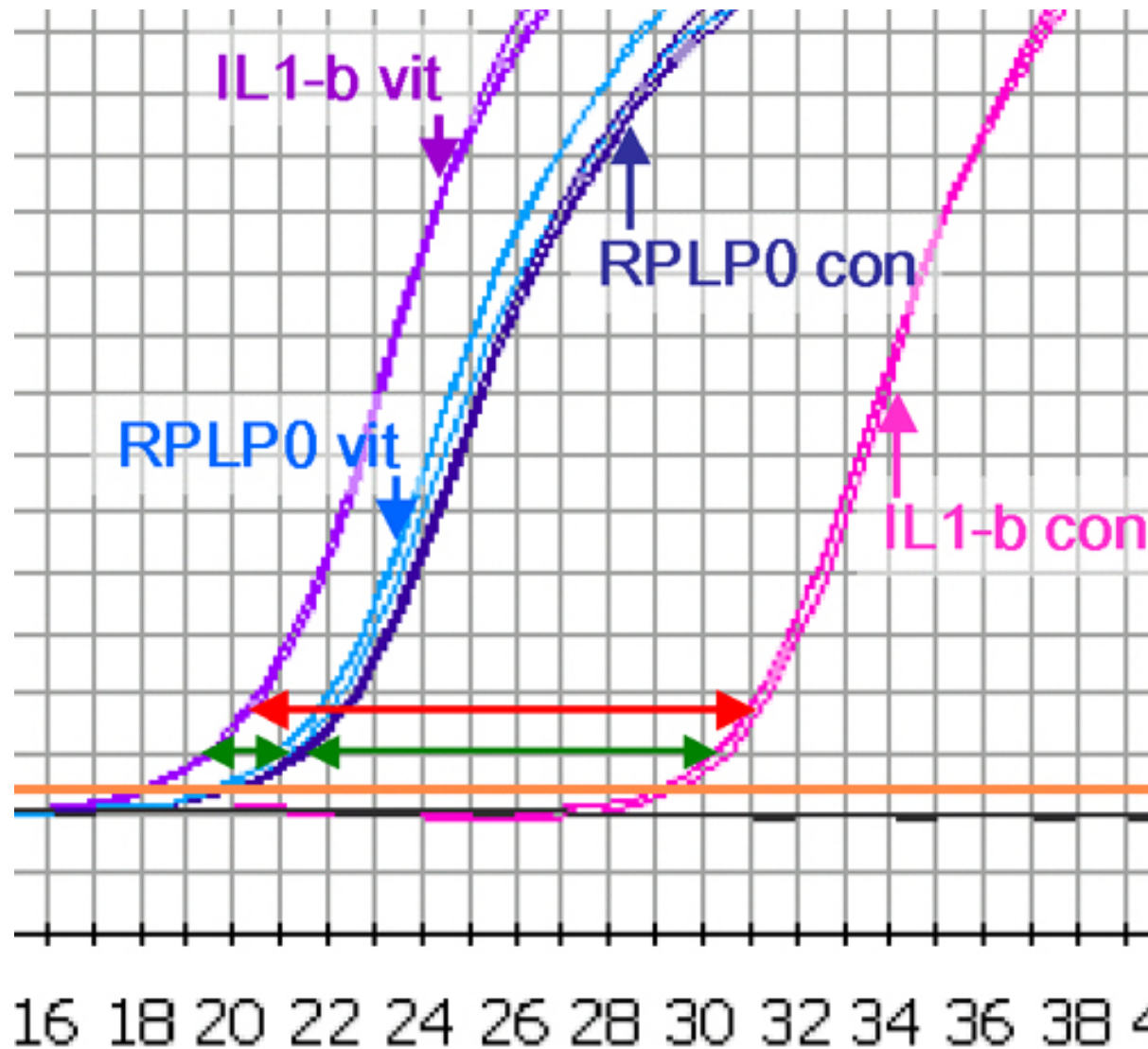


SERIES OF 10-FOLD DILUTIONS

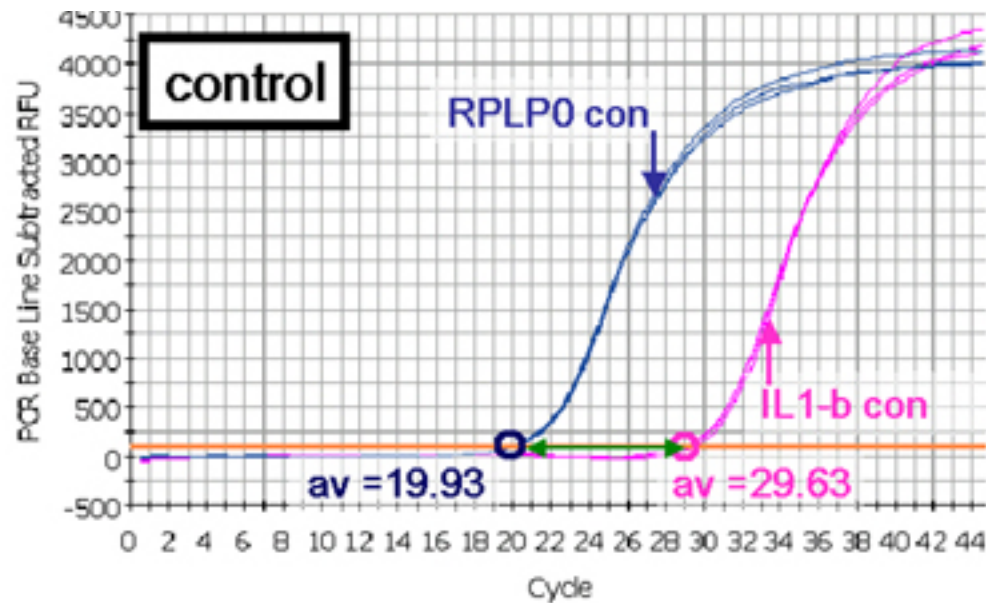
Die Ermittlung der „Schmelzkurve“ des gebildeten PCR-Produktes ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal !



Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

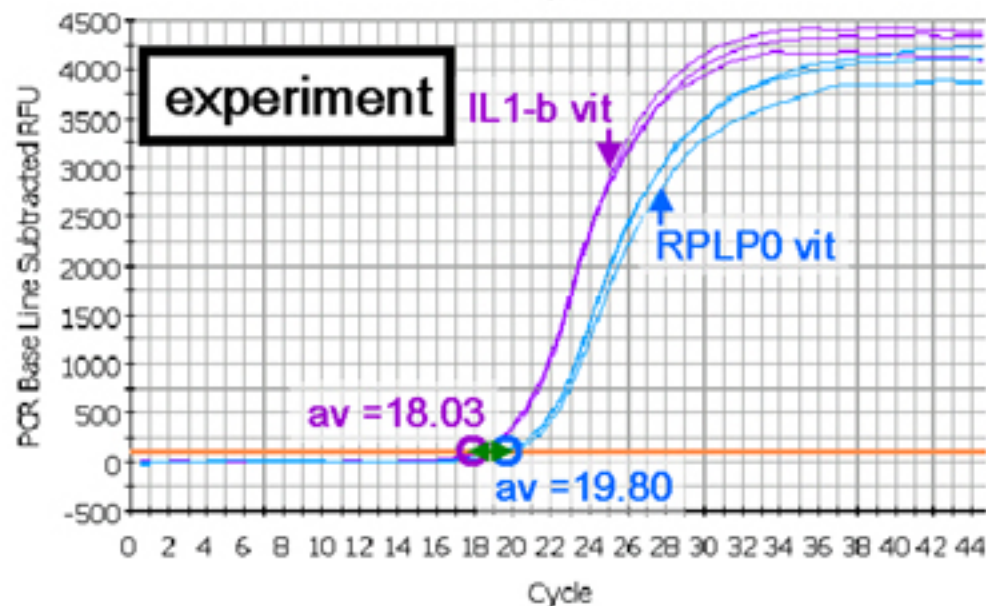


Bildung der $\Delta\text{Ct} = \text{target} - \text{reference}$ für beide Ansätze (vit und con)



$$\Delta Ct = \text{target} - \text{ref}$$

$$\Delta Ct = 9.70$$



$$\Delta Ct = \text{target} - \text{ref}$$

$$\Delta Ct = -1.7$$

$$\text{Difference} = \Delta Ct - \Delta Ct$$

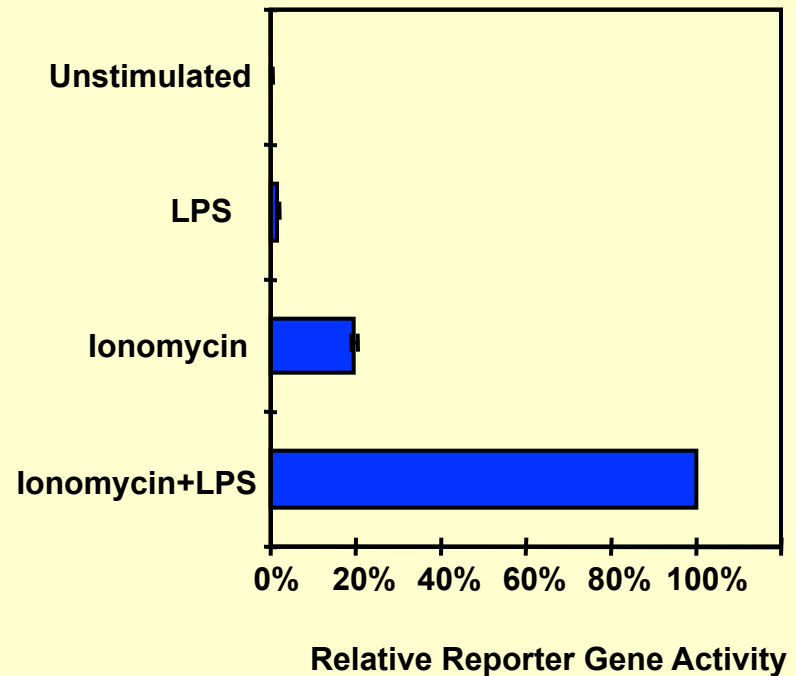
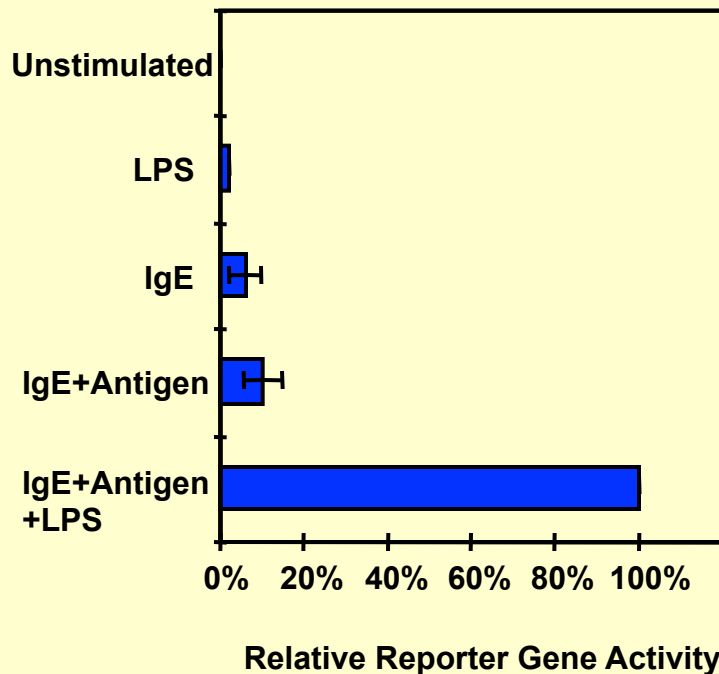
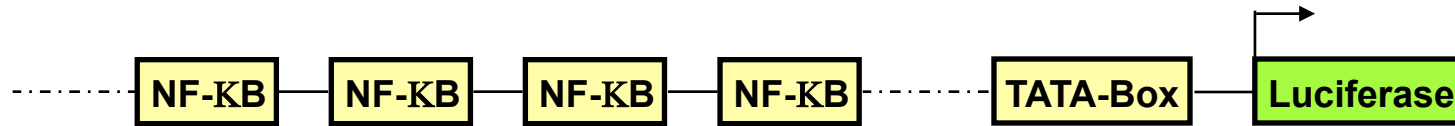
$$= \Delta \Delta Ct$$

$$= 9.70 - (-1.7)$$

$$= 11.40$$

$$\text{Unterschied in der Expression} = 2^{11.4} = 2702$$

LPS coactivates an NF- κ B-dependent reporter gene in mast cells



Prinzip des dualen Reportergenassays

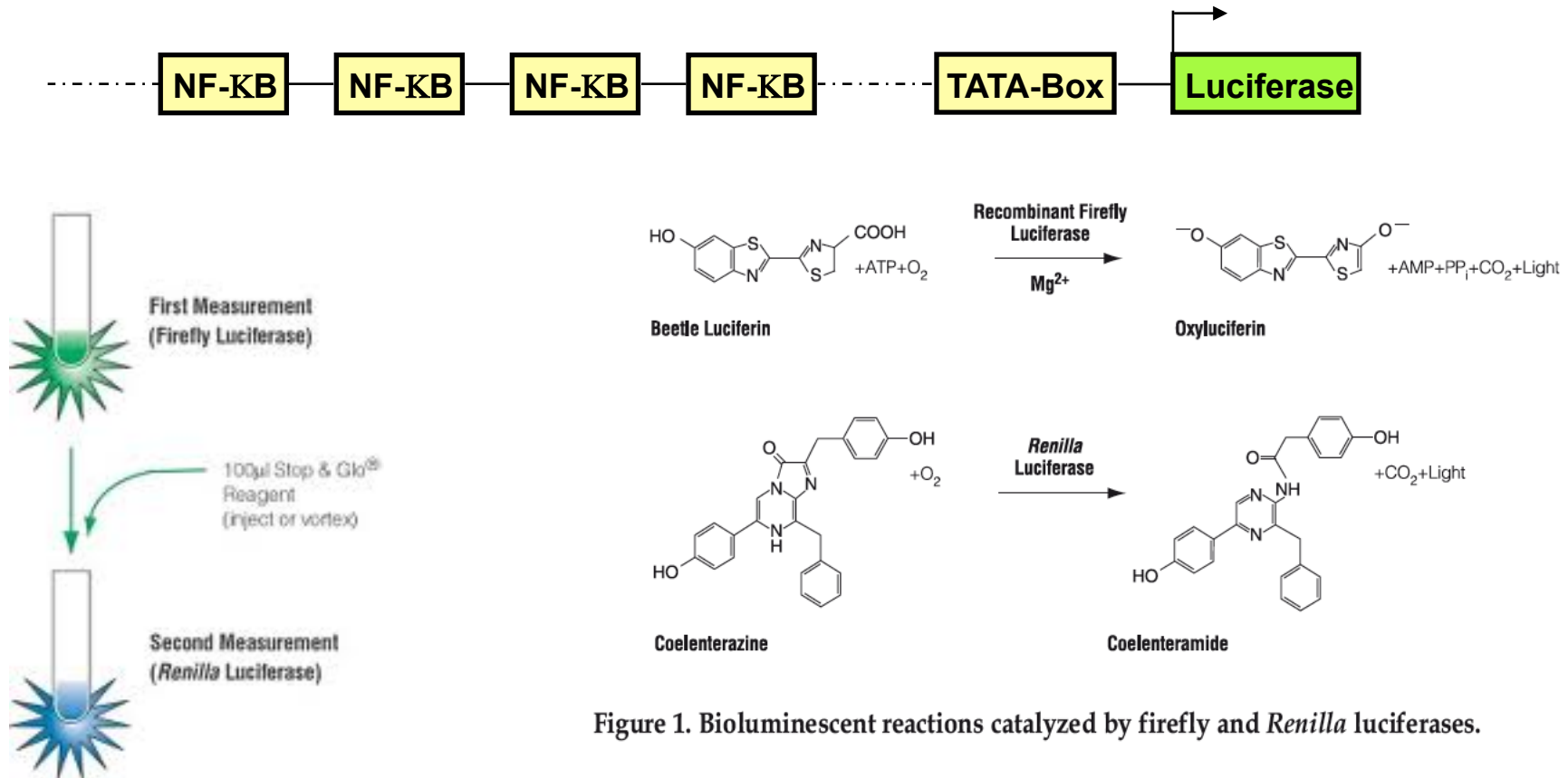
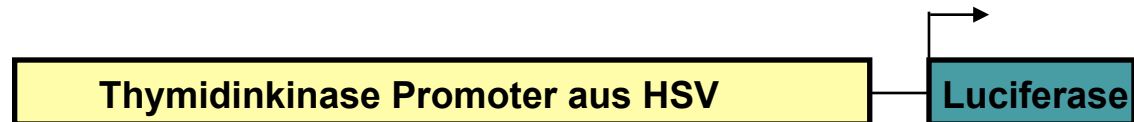
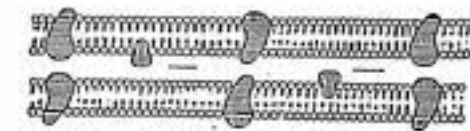


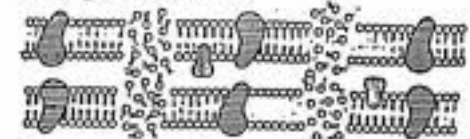
Figure 1. Bioluminescent reactions catalyzed by firefly and *Renilla* luciferases.



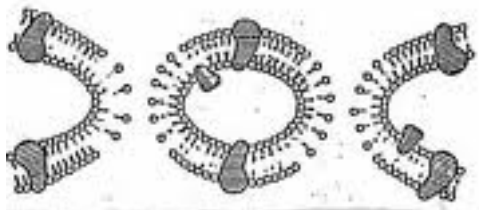
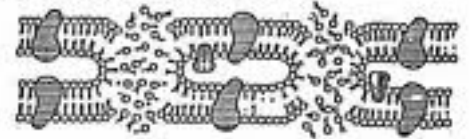
Elektroporation



Voltage Stimulated



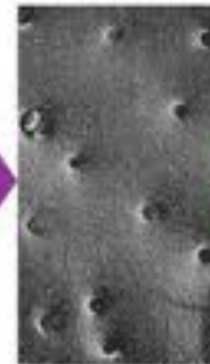
Reconstruction Process



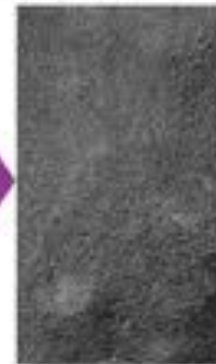
The phenomenon of electroporation



Cell membrane
before pulsing



Cell membrane
during pulsing

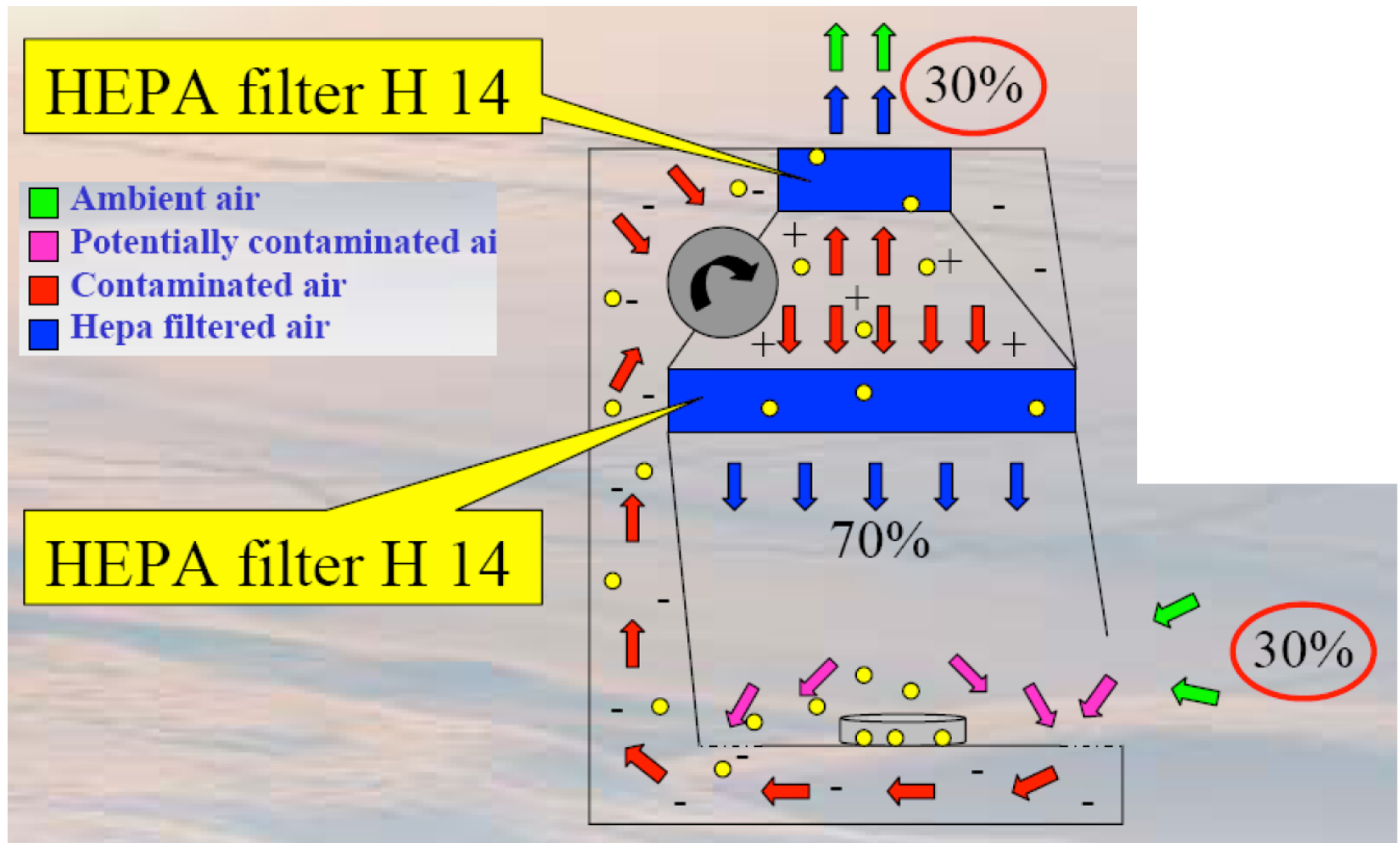


Cell membrane
after pulsing
(cell returns to)

- *Controlled, millisecond electrical pulses induce temporary pores in the cell membrane*
- *Cell membrane reseals and is left unharmed*

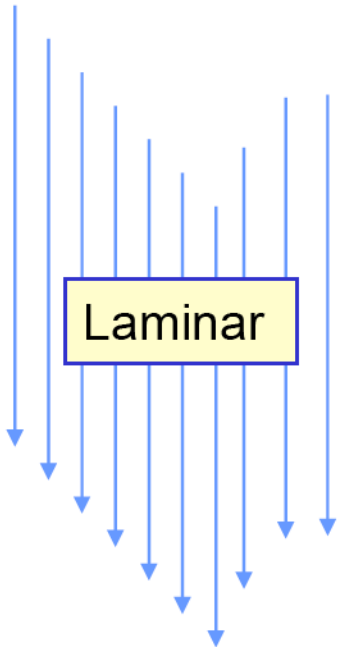


Sicherheitswerkbank Klasse II (2-Filter-System): Lüftungsführung



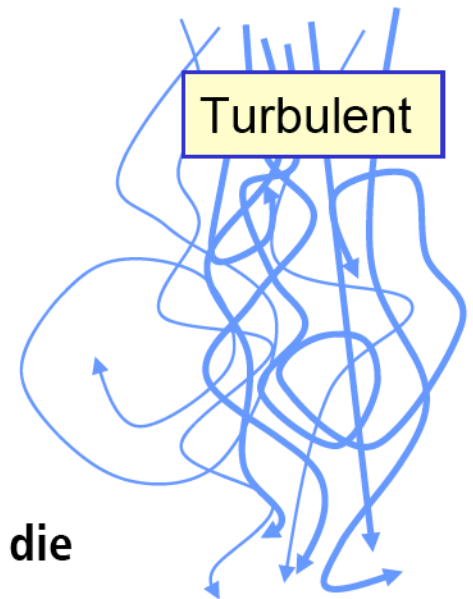
Luftströmung

Kleine Partikel, insbesondere Schwebstoffe, folgen den Strömungslinien, werden von ihnen geleitet.



Die sicherheitstechnische Qualität von Reinstluftgeräten wird in den weitesten Grenzen von der Qualität der "laminaren Luftströmungsparameter" bestimmt.

Ein besonderes Augenmerk ist deshalb auf die Aufrechterhaltung dieser konzipierten Strömungsparameter zu richten, die unter Umständen nur sehr empfindlich einzuhalten sind !



Arbeiten an mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken (MSW)

GEFAHREN FÜR MENSCH UND UMWELT



- Kontamination von Personen, Probengut und Umwelt durch biologische Arbeitsstoffe und Bioaerosole
- Verschleppung biologischer Arbeitsstoffe
- Infektionen durch direkten Kontakt mit biologischen Arbeitsstoffen
- Gefährdung durch Kontamination mit Radionukliden, sofern damit in einer MSW gearbeitet wird
- Die MSW bietet keinen Schutz vor gesundheitsschädlichen Gasen!

VERHALTENSREGELN UND SCHUTZMASSNAHMEN



- Die Kurzbedienungsanleitung muss bekannt und gut sichtbar an der MSW angebracht sein
- Den Arbeitsablauf genau planen
- Persönliche Schutzausrüstung (mindestens Laborkittel, Einmalhandschuhe, ggf. Schutzbrille) benutzen
- Die MSW einige Minuten vor Arbeitsbeginn einschalten, um stabile Strömungsbedingungen zu erhalten; Durchzug im Arbeitsbereich vermeiden, d.h. Türen und Fenster schließen
- Frontscheibe in Arbeitsposition bringen
- Arbeiten nur auf der ausgewiesenen Arbeitsfläche ausführen und diese nicht überfüllen. Die Luftansaugöffnungen müssen frei bleiben. Unnötige Gegenstände aus dem Innenraum entfernen
- Störungen der Luftströmung vermeiden
 - keine schnellen oder hektischen Armbewegungen
 - Einbringung sperriger Geräte möglichst vermeiden
 - Bunsenbrenner nur mit Tippschalter bzw. Näherungssensor verwenden
- Alle Geräte, die in den Innenraum eingebracht werden sollen, vorher reinigen und desinfizieren, nach Gebrauch wiederum desinfizieren und ggf. reinigen
- Regelmäßige Kontrolle der aseptischen Bedingungen innerhalb der MSW (z.B. durch Aufstellen von offenen Petrischalen mit Nährböden)
- Nach Beendigung aller Arbeiten und vor dem Abschalten der MSW alle offenen Gefäße schließen, infektiöse Gegenstände und Materialien in geeigneten geschlossenen Behältnissen unterbringen. Arbeitsflächen desinfizieren und säubern. Auswahl des richtigen Desinfektionsmittels gemäß Hygieneplan beachten. Bildung einer explosionsfähigen Atmosphäre durch alkoholhaltige bzw. brennbare Desinfektionsmittel vermeiden. MSW nach Abschluss der Desinfektion noch einige Minuten eingeschaltet lassen
- nach Arbeitsende Hände desinfizieren, waschen, Hautpflegecreme auftragen