

IMMUNOLOGISCHER KURS MIT PRAKTISCHEN ÜBUNGEN FÜR Biomedizin / Biomed. Chemie / Biologie

Exp. Teil 26.02.-01.03.2018 (M. Stassen; stassenm@uni-mainz.de; 06131-176188)

Inhalt:

Übersicht	2
Aktivierung von Mastzellen durch den Calcium-Ionophor Ionomycin	3
Nachweis des Cytokins Interleukin-9 in Zellkulturüberständen aktivierter Mastzellen mittels ELISA	4
Westernblot zum Nachweis der MAP-Kinase p38 in Mastzellen	6
Nachweis der Degranulation aktivierter Mastzellen	9
Genotypisierung von Mäusen mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)	10
Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) zur relativen Quantifizierung der IL-6mRNA Expression in aktivierten Mastzellen	12
→ RNA-Extraktion	12
→ Reverse Transkription	13
→ Real-Time PCR	13
→ Auswertung	14
Reportergenassay zur Bestimmung der NF- κ B Aktivität in Mastzellen	16
Anhang:	
Prinzip der dualen Luciferasemessung	18
Zeitplan der Versuchsdurchführungen	19

Übersicht:

Während dieses Teils des Kurses lernen Sie wichtige Techniken kennen: Western-Blot, Enzyme-linked immunosorbend assay (ELISA), konventionelle Polymerase Kettenreaktion (PCR), die Technik der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) zur Bestimmung der mRNA Expression des Cytokins IL-6 sowie einen Reportergenassay zur Analyse der NF- κ B Aktivierung.

Am ersten Kurstag findet eine Besprechung der geplanten Experimente statt.

Am zweiten Kurstag erhalten Sie von uns Mastzellen, welche, abgesehen von den PCR-Untersuchungen, als Ausgangsmaterial aller Experimente dienen. Diese Zellen sind sog. „bone marrow-derived mast cells“ (BMMC), die durch 3-4 wöchige Kultur von Knochenmarkzellen in Gegenwart wichtiger Wachstumsfaktoren (IL-3, SCF, IL-4) aus ihren Vorläufern generiert wurden.

Ein Teil dieser Mastzellen wird vormittags mittels Calcium-Ionophor bis zum nächsten Tag stimuliert und dient am dritten Kurstag als Untersuchungsmaterial. Der **ÜBERSTAND** der stimulierten Zellen wird mit Hilfe der **ELISA**-Technik auf das Vorhandensein des Cytokins **Interleukin-9** (IL-9) getestet, welches von aktivierten Mastzellen produziert und ausgeschleust wird. Die **ZELLEN** selbst werden nach Entfernung des Zellkulturüberstandes lysiert und die zellulären Proteine mittels **Western Blot** auf die Expression der **MAP-Kinase p38** untersucht.

Parallel werden am Vormittag des zweiten Kurstages Mastzellen aktiviert, um am Nachmittag des gleichen Tages als Ausgangsmaterial einer RNA- Präparation zu dienen. Einen Tag darauf erfolgt die sog. Reverse Transkription, also das Umschreiben von mRNA in cDNA. Die cDNA wird für die quantitative **Real-Time PCR** benötigt. Die Auswertung dieser Analyse erfolgt am dritten Kurstag.

Weiterhin werden am zweiten Kurstag Mastzellen in Kulturmedium gegeben, welches IgE enthält. Dort werden sie etwa 48h belassen und dienen dann als Ausgangsmaterial des **Degranulationstests**, der am vierten Kurstag durchgeführt wird.

Am zweiten Kurstag werden vormittags auch Mastzellen mit Plasmiden transfiziert, welche die Messung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren der NF- κ B Familie erlauben. Die **Transfektion** der Zellen erfolgt am Vormittag mittels **Elektroporation**. Danach werden die Zellen ruhen gelassen (etwa 50% der Zellen überleben die Prozedur nicht!) und am Nachmittag aktiviert. Am dritten Kurstag werden aus den so behandelten Zellen Extrakte hergestellt und tiefgefroren bis zum vierten Kurstag aufbewahrt, an dem die Luciferaseaktivität der einzelnen Proben ermittelt wird.

Eine zeitliche Übersicht findet sich am Ende dieses Skriptes.

Bitte Kittel mitbringen!

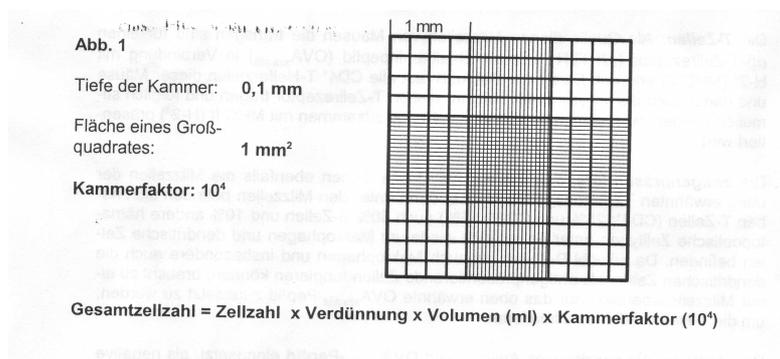
Aktivierung von Mastzellen durch den Calcium-Ionophor Ionomycin

Allgemein:

Die Stimulation der Mastzellen erfolgt im Praktikum über den Ca^{2+} - Ionophor Ionomycin. Die Behandlung der Zellen mit Ionomycin erhöht die Calcium-Konzentration im Cytoplasma und ahmt somit das natürlicherweise von kreuzvernetzten $\text{Fc}\epsilon$ -Rezeptoren ausgelöste Aktivierungssignal nach. Als Co-Stimulus wird bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, eingesetzt.

Zellzählung: (alle Arbeitsschritte erfolgen STERIL !!!)

- Zellen werden aus der 24 well Platte geerntet, d.h. suspendiert und in ein steriles 50ml Röhrchen überführt!
- $10\mu\text{l}$ der Zellsuspension werden 1:10 in Trypanblau verdünnt. (d.h. + $90\mu\text{l}$)
- $10\mu\text{l}$ dieser Verdünnung werden zwischen das Deckgläschen und die Neubauer-Zählkammer pipettiert!
- Die Zellzahl wird in einem der 4 großen Außenquadrate (bestehend aus 16 Einzelquadraten) einer Neubauer-Zählkammer bestimmt! (gezählt werden nur lebende Zellen, d.h. Zellen die Trypanblau aufgenommen haben und sich somit blau färben werden **NICHT** mitgezählt !!!)
- Die Zellzahl wird anhand der unten angegebenen (s. Abb.) Formel bestimmt!



Ansätze: Folgende Ansätze zur Mastzellstimulation werden im Praktikum durchgeführt:

1. unstimuliert
2. $1\mu\text{M}$ Ionomycin
3. LPS [200ng/ml]
4. $1\mu\text{M}$ Ionomycin + LPS [200ng/ml]

Die Zellen werden nach dem Zählen abzentrifugiert, der Überstand verworfen (Anweisungen des Betreuers beachten).

Die Zellen werden in Testmedium resuspendiert, so daß eine Zellzahl von 4×10^6 Zellen / ml erreicht wird. Jeweils 0,5 ml hiervon werden in 4 Wells einer 24 Well-Platte vorgelegt. Die anderen Substanzen werden in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml in Testmedium zugegeben. Die Stimulation erfolgt für 24h.

Nach Stimulationsende werden die Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert (5min; 4000RPM in Tischzentrifuge). Die Überstände

werden abgenommen und für den Sandwich- ELISA auf IL-9 verwendet. Die Zellpellets werden lysiert (s. Protokoll Western Blot) und die Lysate für den Western- Blot eingesetzt.

Stimulation: **Ionomycin:** Arbeitslösung ist 50 μ M => es soll 1 μ M Ionomycin eingesetzt werden.

LPS: Arbeitslösung 50 μ g/ml => 200ng/ml werden eingesetzt.

Testmedium: Iscove`s modifiziertes Dulbecco`s medium (IMDM) + 1% Glutamin + 1% Natrium-Pyruvat + 10% fötales Kälberserum (FCS)

Nachweis des Cytokins Interleukin-9 in Zellkulturüberständen aktivierter Mastzellen mittels ELISA

1. Beschichten: 1° Antikörper 1:1000 in „Coatingbuffer“ lösen => 5 μ l zu 5ml pro Platte => je 50 μ l Lösung pro well pipettieren (darauf achten, daß sich die Lösung im well gleichmäßig verteilt!).

=> bei 4°C über Nacht inkubieren!

1° Antikörper IL-9 spez. 229,4 [3mg/ml] Stammlösung in NaHCO₃ + 0,02% NaAcid

Coatingbuffer: 0,1M Na₂HPO₄ pH: 9,2

2. Waschen: Platte kräftig ausschütten und ausklopfen. Waschpuffer gleichmäßig in wells füllen => ausschütten und ausklopfen; Vorgang 3x durchführen!

Waschpuffer: 1x PBS mit 0,1% Tween20 (Detergenz)

(Achtung: wells dürfen nicht überlaufen !)

(Platte mit Antikörper darf nicht austrocknen => Nächsten Reaktionsschritt jedes Mal vor dem Waschen vorbereiten und zügig arbeiten.)

3. Blockieren: Zugabe von 50 μ l „Blockpuffer“ pro well => 30min 37°C !!!
deckt unspezifische Bindungsstellen ab!

10x PBS: phosphate buffered saline (1,4M NaCl; 0,1M NaH₂PO₄ pH:6,6)

Blockpuffer: 1x PBS mit 0,1% BSA (Rinderserumalbumin)

KEIN WASCHSCHRITT!!

4. Titrieren:

- Platte(n) beschriften: für IL-9-Standard, Negativkontrolle und pro Testprobe eine Reihe einplanen!
- 50 μ l der Kulturüberstände und des IL-9-Standards werden jeweils zu den 50 μ l Blockpuffer in das erste well jeder Reihe geben!
- Nach resuspendieren werden je 50 μ l in das nächste well der Reihe überführt, wieder suspendiert und in das nächste well überführt ... usw.. (d.h.:1:2 seriell verdünnt)!;
- Aus dem jeweils letzten well werden 50 μ l entnommen und verworfen (Endvolumen pro well sind 50 μ l)
- Als Negativkontrolle dient eine Reihe mit Blockpuffer.
- 1h inkubieren.

IL-9-Standard: IL-9 [20ng/ml] Stammlösung in Testmedium => Konz. im ersten well beträgt 10ng/ml.

5. Waschen: Platte kräftig ausschütten und ausklopfen. Waschpuffer gleichmäßig in wells füllen => ausschütten und ausklopfen; Vorgang 3x durchführen.

6. Detektion: 2° Antikörper (biotinyliert) 1:1000 in Blockpuffer aufnehmen => 5µl zu 5ml pro Platte => je 50µl pro Well pipettieren => 1h inkubieren.

2° Antikörper IL-9 spez. biotinyliert C12 bio [1mg/ml]; Stammlösung in NaHCO₃+ 0,02% NaAcid.

7. Waschen: Platte kräftig ausschütten und ausklopfen. Waschpuffer gleichmäßig in wells füllen => ausschütten und ausklopfen; Vorgang 3x durchführen.

8. Enzym anfügen: SA-HPO (1:10 Vorverdünnung) 1:1000 in Blockpuffer lösen => 5µl zu 5ml pro Platte => je 50µl pro well pipettieren => max. 30min inkubieren.
SA-HPO: Streptavidine-horse raddish peroxidase; 1:10 Vorverdünnung in Blockpuffer.
Die Meerrettich- Peroxidase wird über die Streptavidin- Biotin- Bindung mit dem Antikörper verknüpft.

9. Waschen: Platte kräftig ausschütten und ausklopfen. Waschpuffer gleichmäßig in wells füllen => ausschütten und ausklopfen; Vorgang 3x durchführen.

10. Substrat hinzufügen: ABTS in Citratpuffer lösen: 1mg/ml => 5mg zu 5ml pro Platte. Dazu 30% H₂O₂ 1: 4000 einsetzen => 1,25µl zu 5ml pro Platte => je 50µl pro well pipettieren => 10-15min bei Raumtemperatur inkubieren, dabei Färbung verfolgen.
Citratpuffer: 40mM Citrat + 60mM Na₂HPO₄
ABTS: 2,2-Azino-bis(3-Ethylbenz-Thiazoline-6-sulfonic acid) (reizend => sauber arbeiten)

11. Extinktionen im ELISA- Reader messen (414nm) :

1. Stock (**nur eine Person pro Gruppe**)

12. Auswertung :

- Die Extinktionen der IL-9-Standard Verdünnungen (Y-Achse) werden gegen die bekannten IL-9-Standard Konzentrationen (in ng/ml) aufgetragen. (Achtung: Verdünnungen einberechnen!!!)
- Die Extinktionen der jeweiligen Proben werden anhand des linearen Bereiches der erstellten IL-9-Standard Kurve in Konzentrationen (ng/ml) umgerechnet! (**Achtung: Verdünnungsstufen müssen eingerechnet werden**)

Westernblot zum Nachweis der MAP-Kinase p38 in Mastzellen

Herstellung der Proteinextrakte

Die abzentrifugierten Zellen (s. Protokoll Mastzellstimulation; 2×10^6 Zellen pro Ansatz) werden in $500 \mu\text{l}$ PBS gewaschen und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen anschließend in $70 \mu\text{l}$ SDS-Lysepuffer aufgenommen und gut gevortext. Die Suspension wird anschließend 3min im Heizblock bei $95-100^\circ\text{C}$ erhitzt und mehrmals mit einer Spritze durch eine Kanüle gezogen! Entstandener Schaum wird durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 3 min entfernt.

SDS-Lysepuffer:

50mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane pH6,8; 4 M Harnstoff; 1% SDS; 15% Glycerin

Proteinbestimmung:

Die Proteinbestimmung wird mit Hilfe des DC Protein Assay Kit der Fa. BioRad durchgeführt. Das Kit enthält

Reagent A: alkalische Kupfertartrat-Lösung

Reagent B: Folin-Lösung

Reagent S: SDS-Lösung

Die Proteinbestimmung basiert auf der Methode von Lowry, bei welcher Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung in Gegenwart von Protein zu Cu^+ -Ionen reduziert werden, die Folin-Reagenz in einer komplizierten Reaktion zu einem blauen Farbstoff umsetzen, der bei **690 nm** gemessen wird.

Verdünnungen des BSA-Standards herstellen: BSA Stocklösung [10mg/ml]

- In das erste well einer 96well Platte (A1) werden zu $30 \mu\text{l}$ SDS-Lysepuffer $20 \mu\text{l}$ der BSA-Stocklösung gegeben. (entspricht $200 \mu\text{g}$ BSA).
- In die folgenden 5 wells (A2-A6) werden $25 \mu\text{l}$ SDS-Lysepuffer vorgelegt.
- Ausgehend von well A1 wird der Standard in den folgenden 5 wells 1:2 seriell verdünnt. D.h. $25 \mu\text{l}$ aus A1 in A2 – suspendieren – $25 \mu\text{l}$ aus A2 in A3 ...usw....

Herstellen des Substrates:

- $10 \mu\text{l}$ Reagent S werden zu $500 \mu\text{l}$ Reagent A pipettiert! = A´
- $25 \mu\text{l}$ des hergestellten Reagents A´ werden in die wells C1-C6, E1-E4 und F1-F4 vorgelegt!
- $5 \mu\text{l}$ der jeweiligen BSA-Verdünnung werden in die vorgelegten $25 \mu\text{l}$ in Reihe C pipettiert, d.h. $5 \mu\text{l}$ aus A1 in C1 – aus A2 in C2 usw...(In C1 befinden sich jetzt $20 \mu\text{g}$ BSA, in C2 $10 \mu\text{g}$ usw...)
- Je $5 \mu\text{l}$ der Zellysate werden zu den $25 \mu\text{l}$ A´ in Reihe E und Reihe F pipettiert = Doppelbestimmung!
- $200 \mu\text{l}$ Reagent B werden in die zu messenden wells gegeben und gut suspendiert!
- Die Messung erfolgt photometrisch im 1. Stock (**nur eine Person pro Gruppe!**)

Auswertung:

- Die Auswertung erfolgt auf Millimeterpapier anhand des BSA-Standards:
- Auf Millimeterpapier wird die bekannte BSA-Konzentration (X-Achse) gegen die OD aufgetragen. Anhand dieser Eichgeraden kann nun die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden!

Vorbereiten der Proben für anschließende Gelelektrophorese

Die Proben werden in SDS-Lysepuffer so verdünnt, dass vergleichbare Proteinkonzentrationen aufgetragen werden können. Dazu werden von jeder Probe 40µg (anhand der oben bestimmten Proben-Konzentrationen) auf ein Volumen von 40µl mit SDS-Lysepuffer gebracht (Endkonzentration 1µg/µl).

Anschließend wird zu den Proben jeweils 1µl „Loading-buffer“ (Bromphenolblau und beta-Mercaptoethanol) gegeben und 3 min im Heizblock bei 95-100°C gekocht!

Elektrophorese (SDS-PAGE nach Laemmli)

Es werden Fertiggele verwendet, die einen Acrylamid-Gradienten von 4% bis 20% aufweisen, was die Trennung hoher und niedriger Molekülmassen auf einem einzigen Gel erlaubt (Mini-PROTEAN TGX Gele von BioRad).

Beim Zusammenbau der Gelkammer muß zunächst der Kamm aus den Fertiggele gezogen und die Versiegelung am unteren Ende des Gels entfernt werden.

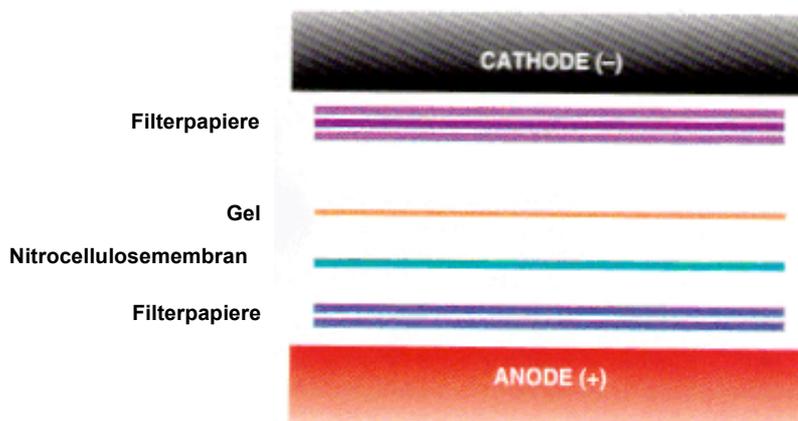
Beladen der Gele:

- In die erste Tasche des Gels (links) werden 5µl „prestained marker“ pipettiert!
- Eine Tasche wird frei gelassen und in die Folgenden werden 20µl der jeweiligen Proben pipettiert:
 1. unstimuliert
 2. + 1 µM Ionomycin
 3. + 200ng/ml LPS
 4. + 1µM Ionomycin + 200ng/ml LPS
- Die Elektrophorese findet bei konstant 10-15 mA pro Gel für 1-1,5 h statt; die Spannung wird hierbei nicht begrenzt.

Blotten: „geblottet“ wird im Semi-Dry-Verfahren im "Trans-Blot Turbo Blotting System" von BioRad.

- Plastikplatten vorsichtig entfernen (**Vorsicht: Gel zerreißt leicht !**)
- Das Gel wird für 5 min in 20 ml Blotpuffer gelegt:

Blotpuffer:
5,28g Tris-base; 200 ml EtOH; 2,03g Glycin; 3,75 ml 10%ige SDS-Lösung ad 1l dH₂O.
- Blot wie folgt in der Transferschublade zusammensetzen:
auch Filterpapiere und Nitrocellulose zuvor in Blotpuffer legen!!!



- Das Gerät wird auf 25V und 1A für 30 min eingestellt (Betreuer).

- Nitrocellulosemembran aus Semi-Dry-Blot entnehmen. (**Vorsicht: Filter und Membran können am Deckel des Gerätes hängen bleiben !!!**)
- Die Nitrocellulosemembranen werden für 30 min in Roti-Block Puffer (zuvor 1:10 in Wasser verdünnt) geblockt um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden.
- Die Membranen werden in 10ml TBST+1%BSA aufgenommen und der primäre Antikörper, anti-p38 wird in einer Verdünnung von 1:2500 zugegeben. Inkubation bei RT über Nacht!
- Die Membranen werden 3 mal für je 5 min in TBST gewaschen!
- Die Membranen werden in 10ml TBST+1%BSA aufgenommen und der sekundäre Antikörper, α -rabbit-HPO wird in einer Verdünnung von 1:2000 zugegeben. Inkubation für 1h!
- Die Membranen werden 3 mal für je 5 min in TBST gewaschen!
- Die Detektion der an die Membran gebundenen Antikörper erfolgt durch Diaminobenzidin (DAB), welches durch die, an den sekundären Antikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase (HPO) umgesetzt wird und zu einer Farbreaktion führt!
- 25mg DAB werden in 50 ml 0,1M Imidazol, pH 7, gelöst.
- Zugabe von 125 μ l 1M CoCl_2 und 20 μ l 30%iges H_2O_2 . Rasche Farbreaktion !
- Abgießen der Substratlösung und waschen des Blottes mit Wasser.
- Substratlösung wird gesammelt und vor Entsorgung mit Hypochlorid oder Kaliumpermanganat oxidiert !

Nachweis der Degranulation IgE/anti-IgE aktivierter Mastzellen

Zur Durchführung des Experimentes müssen „bone marrow-derived mast cells“ (BMMC) *in vitro* mit IgE beladen werden. Die Bindung von IgE an den hochaffinen IgE-Rezeptor verstärkt in positiver Rückkoppelung die Expression des Rezeptors, aus diesem Grund werden die verwendeten BMMC zunächst für etwa 48 h in Gegenwart von anti-DNP IgE kultiviert.

In vivo findet die Kreuzvernetzung von allergenspezifischem membranständigem IgE durch Bindung des entsprechenden multivalenten Allergens statt. Im Labor kann die Kreuzvernetzung auch durch Behandlung IgE-beladener Mastzellen mit dem Antigen DNP-HSA (dinitrophenyliertes humanes Serumalbumin) erreicht werden. Dies führt zur raschen Aktivierung der Mastzellen innerhalb weniger Minuten, was zur Freisetzung gespeicherter Zellinhaltsstoffe führt (Histamin, verschiedene Proteasen etc). Das Enzym β -Hexosaminidase, dessen Aktivität sich durch eine Farbreaktion leicht nachweisen läßt, wird hierbei ebenfalls sezerniert. Durch Vergleich der Enzymaktivitäten in Zellkulturüberstand und innerhalb der Zelle kann nach der Aktivierung auf das Ausmaß der Degranulation geschlossen werden. Prinzipiell läßt sich die Degranulation auch durch Ionomycin auslösen, die IgE-vermittelte Degranulation ist jedoch i. d. Regel weitaus stärker und kann bis 90% erreichen, während die Ionomycin-vermittelte Degranulation 30% selten übertrifft.

Benötigte Reagenzien (werden gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt):

IgE anti-DNP (2 mg/ml)

DNP-HSA (1 μ g/ml)

LPS (50 μ g/ml)

Mastzellfütter: Iscove's Medium zuzüglich 10% FCS, 200 ng SCF, 50 U/ml IL-4, 20 U/ml IL-3 Tyrode Lösung (CaCl₂x2H₂O: 0,265g/l; MgCl₂x6H₂O: 0,214g/l; KCl:0,2g/l; NaHCO₃: 1g/l; NaCl: 8g/l; NaH₂PO₄: 0,05g/l; Glucose: 1g/l) mit 5% FCS

0,5% Triton X-100 in Wasser

0,2M Glycin, pH 10,7 in Wasser

Substratlösung: p-Nitrophenyl-N-Acetyl- β -D-Glucosamin: 1,3mg/ml in 0,1M Na-Citrat, pH 4,5

Durchführung:

- 5x10⁶ Zellen werden in 5 ml Mastzellfütter mit 2 μ g/ml IgE (Verdünnung 1/1000; 5 μ l der IgE-Stocklösung) in ein Well einer 6-Well Kulturplatte gegeben und bei 37°C inkubiert (von Di. bis Do.).

- Ernten der Zellen in 15 ml Falcon Röhrchen, zentrifugieren bei 1500 rpm für 10 min.

- Überstand vorsichtig entfernen und verwerfen. Zellen in 2,5 ml Tyrode Lösung (mit 5% FCS) resuspendieren.

- je 0,5 ml dieser Suspension werden in 4 wells einer 24 Well-Kulturplatte gegeben.

- Zugegeben wird in

Well 1: nichts

Well 2: DNP-HSA auf eine Endkonzentration von 25 ng/ml (1/40 Verdünnung; 12,5 μ l/0,5ml)

Well 3: LPS auf eine Endkonzentration von 200 ng/ml (1/250 Verdünnung; 2 μ l/0,5 ml)

Well 4: DNP-HSA und LPS in den angegebenen Konzentrationen

- Inkubation bei 37°C für 30 min

- Zellen resuspendieren, in 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und zentrifugieren (5min 4000 rpm).

- Überstand abnehmen und in neues 1,5 ml Gefäß überführen.

- Zu den Zellen werden je 0,5 ml 0,5% Triton X-100 gegeben und resuspendiert.

- Die Substratreaktion findet in 96 Well Platten statt:

Wells A1-4: je 20 μ l der einzelnen Überstände

Wells B1-4: je 20 μ l der einzelnen Lysate

C1: 20 μ l Triton X-100

C2: 20 μ l Tyrode Lösung

Zu jedem Well werden 50 μ l der Substratlösung gegeben und 90 min bei 37°C inkubiert

- Zugabe von jeweils 150 μ l Glycinlösung
- Messen der Farbintensität bei 410 nm (Assistent)
- Auswertung: Das Ausmaß der Degranulation in % berechnet sich =

$$\text{Extinktion (Überstand)} / (\text{Extinktion (Überstand)} + \text{Extinktion (Lysat)}) \times 100\%$$

Genotypisierung von Mäusen mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Ziel dieses Experimentes ist es, den knock out des Genes für das „Recombination activating gene 2“ (RAG-2) in Mäusen nachzuweisen. Tiere ohne funktionstüchtiges RAG-2 Gen können keine V(D)J-Rekombinationen bei der Synthese von Antikörpern und T-Zellrezeptoren durchführen und entwickeln folglich keine reifen B- und T-Zellen.

Zur Typisierung wurden jungen Mäusen bereits Ohrbiopsien entnommen (Gewebestückchen mit ca. 2 mm Durchmesser) und mit Proteinase K verdaut. Nach der Proteasebehandlung, die in einem Volumen von 20 μ l stattfand, wurde die Probe auf 500 μ l mit H₂O verdünnt und 5 min gekocht. In dieser Form wird die Lösung als Ausgangsmaterial für die PCR eingesetzt.

Fragestellung:

Bestimmen Sie den Genotyp der Mäuse, die mit X und Y bezeichnet sind. Als Referenzproben dienen DNA-Proben aus einer Wildtyp-Maus sowie einer heterozygoten RAG-2 knock out Maus.

Proben:

1. Wildtyp-Maus
2. Heterozygote RAG-2 knock out Maus
3. X
4. Y

Primersequenzen

RAG-A (antisense): GGG AGG ACA CTC ACT TGC CAG TA

RAG-B (sense): AGT CAG GAG TCT TCA TTT CAC TGA

NEO-A (antisense): CGG CCG GAG AAC CTG CGT GCA A

Alle Primer werden gleichzeitig in die PCR Reaktion eingesetzt („Multiplex PCR“).

Durch die Primer RAG-A und RAG-B wird ein 280 bp großes Fragment aus dem Wildtyp RAG-2 Locus amplifiziert, durch die Kombination RAG-B und NEO-A ein 390 bp großes Fragment des zerstörten Allels.

Ansatz 1x**Mastermix (5Ansätze)**

Zu testende DNA Probe	3 μ l		X
10x Green DreamTaq Puffer	2,5 μ l	→	12,5 μ l
Primer (je 5pmol/ μ l pro Primer):			
NEO-A	1 μ l	→	5 μ l
RAG-A	1 μ l	→	5 μ l
RAG-B	2 μ l	→	10 μ l
dNTP's (10mM)	0,5 μ l	→	2,5 μ l
H ₂ O	14,25 μ l	→	71,25 μ l
Polymerase	0,25 μ l	→	1,25 μ l

Von dem Mastermix werden jeweils 22 μ l in 4 PCR Reaktionsgefäße vorgelegt und 3 μ l der zu testenden DNA Lösung zugegeben.

PCR-Programm:

Initial 95°C für 3 min, dann:

1. 95°C 30 sec
2. 62°C 30 sec
3. 72°C 1 min

Die Schritte 1-3 werden 35x wiederholt.

Nach der PCR werden die Ansätze auf ein 1,5%-Agarosegel aufgetragen (wird zur Verfügung gestellt).

Vorsicht: Gel und Elektrophoresepuffer enthalten den cancerogenen Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Handschuhe).

Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) zur relativen Quantifizierung der IL-6 mRNA Expression in aktivierten Mastzellen

Mastzellen haben die Fähigkeit, eine Vielzahl von Mediatoren und Cytokine freizusetzen. Hierzu zählt beispielsweise Interleukin 6 (IL-6). IL-6 zählt zu den proinflammatorischen, also entzündungsfördernden Cytokinen und ist ein wichtiges Cytokin der angeborenen Immunantwort. IL-6 wird u.a. von Mastzellen sehr früh nach ihrer Aktivierung produziert und besitzt vielfältige biologische Funktionen. So ist es z.B. in der Lage zusammen mit TNFalpha Fieber auszulösen. Auch bei der Beseitigung von manchen bakteriellen Infektionen, z.B. Infektionen mit *Klebsiella pneumoniae*, spielt insbesondere Mastzell-spezifisches IL-6 eine entscheidende Rolle.

Zum quantitativen Nachweis der IL-6 mRNA Expression der Mastzelle soll die Methode der Real Time PCR verwendet werden.

Hierzu werden die Mastzellen wie unten angegeben für 4h stimuliert. Nach Ende der Stimulation werden die jeweiligen Ansätze in 1,5ml Reaktionsgefäße geerntet und abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abgesaugt und die Zellen werden in 1ml Trizol (Invitrogen) aufgenommen und lysiert. Die nachfolgenden Schritte dienen zur Isolation der RNA aus der Probe.

Zur Bestimmung der IL-6 Expression von Mastzellen werden im Praktikum folgende Ansätze durchgeführt (24well Plate):

1. unstimuliert
2. 1µM Ionomycin (Stocklösung: 50µM)
3. LPS [200ng/ml] (Stocklösung: 50µg/ml)
4. 1µM Ionomycin + LPS [200ng/ml]

Pro Ansatz werden 2×10^6 Mastzellen benötigt (siehe Ansatz Seite 3!). Die Stimulation der Zellen erfolgt in einer 24 well Plate in einem Gesamtvolumen von je 1 ml Testmedium über 4h.

Nach Ende der Inkubationszeit werden die Zellen in 1,5ml Reaktionsgefäße geerntet, abzentrifugiert und in Trizol (Invitrogen) aufgenommen, welches zur Extraktion der RNA verwendet wird. Um Kontamination mit RNasen zu vermeiden, werden RNase-freie Spitzen und Reaktionsgefäße verwendet.

RNA- Extraktion:

ACHTUNG: Trizol Reagenz enthält Phenol, welches ätzend und toxisch ist. Es gilt Hautkontakt zu vermeiden. Aus diesem Grund und zur Vermeidung der Kontamination der Proben mit RNase sind unbedingt während der nächsten Arbeitsschritte (neben dem obligatorischen Laborkittel!!) Handschuhe und eine Schutzbrille zu tragen!! Gearbeitet wird unter dem Abzug im Labor.

1. Nach Zugabe von 1ml Trizol zum Zellpellet vorsichtig mit der Pipette resuspendieren bis Lösung homogen ist. Danach Probe für 5s vortexen und für 10-15min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren.
2. Zu jeder Probe werden 200µl Chloroform gegeben und im Anschluß ca. 15s gevortext (Probe wird milchig rosa). Inkubation bei RT für 5-10min.
3. Zentrifugation der Proben für 15min bei 11500UPM bei 4°C im Kühlraum (Benchtop-Zentrifuge).
4. Während der Zentrifugationszeit neue 1,5ml Reaktionsgefäße beschriften.

5. Abnahme der oberen wässrigen Schicht (ca. 500µl; in dieser befindet sich die RNA!!) und Überführung in neue Reaktionsgefäße. Kontakt mit der Interphase ist zu vermeiden. Nach Abnahme der wässrigen Schicht, alte Reaktionsgefäße verschließen und im organischem Abfall entsorgen (samt Reaktionsgefäß!!).
6. Zu den 500µl (RNA-Phase) wird als Trägermolekül 1,5µl Glykogen [20mg/ml] und die Probe kurz gevortext und für 5min bei RT inkubiert.
7. Zugabe von 500µl Isopropanol, gut vortexen.
8. Zentrifugation der Proben für 10min bei 11500UPM bei 4°C (Kühlraum).
9. Überstand abgießen und präzipitierte RNA mit 1ml eiskalten 70% Ethanol in DEPC-H₂O waschen (RNA ist besonders anfällig für Degradation. Die Behandlung des Wassers mit DEPC führt zur Hemmung von RNasen).
10. Zentrifugation der Proben für 10min bei 9200RPM bei 4°C (Kühlraum).
11. Erneutes Waschen der RNA (siehe Punkt 8).
12. Ethanol abgießen und restliche Ethanoltröpfchen vorsichtig mit einer Pipettenspitze an den Rand des Reaktionsgefäßes ziehen. Abwarten bis RNA- Pellet an den Rändern zu trocknen beginnt (Pellet wird „glasig“).
13. Aufnahme der RNA in 11µl DEPC-H₂O und Inkubation bei 55°C für 5min. Anschließend die Proben 2min auf Eis inkubieren und kurz anzentrifugieren.

Reverse Transkription:

Die Reverse Transkription dient zum Umschreiben von RNA in cDNA. Im Praktikum wird die Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase verwendet (Fermentas). Ausgehend von Hexanucleotiden (N6- Primer) und Oligo-dT- Primern (für PolyA-Priming) synthetisiert dieses Enzym die cDNA. Als Ausgangsmaterial dient die in 11µl DEPC-H₂O gelöste RNA.

Folgender Ansatz pro Probe:

- 4µl 5x Reaction Buffer
- 2µl 10mM dNTP
- 1µl Oligo dT- Primer [100ng/ml]
- 1µl N6-Primer [20ng/ml]
- 1µl M-MuLV
- 11µl Template
- 20µl

Anmerkung: Da jede Gruppe 4 Proben umzuschreiben hat, empfiehlt sich der Ansatz eines **Master-Mixes**, worin alle Reagenzien enthalten sind mit Ausnahme der gelösten RNA.

Die Proben werden für **1h bei 42°C im Wasserbad** inkubiert. Zugabe von 80µl H₂O_{dest.} Die cDNA der einzelnen Proben wird zur Bestimmung der IL-6 Expression in die quantitative Real-Time PCR eingesetzt (qRT-PCR).

Real-Time PCR:

Um eine Kontamination der Proben zu vermeiden, bitte Handschuhe tragen!

Die semiquantitative Real- Time PCR Analyse (qRT- PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren beruhend auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase- Kettenreaktion. Zusätzlich zur konventionellen PCR bietet sie die Möglichkeit der Quantifizierung. Wie der Name Real- Time aussagt, wird bei der im Praktikum verwendeten Methode am Ende eines

jeden Zyklus (also in Echtzeit) eine Quantifizierung durchgeführt. Diese erfolgt durch Fluoreszenzmessungen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der gebildeten PCR-Produkte zu, wodurch eine Quantifizierung möglich wird. Als Fluoreszenzfarbstoff wird EvaGreen (Bio&Sell) verwendet. Im EvaGreen qPCR Mix ist eine „hot-start“ Taq-DNA Polymerase, der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein, $MgCl_2$, und dNTPs bereits enthalten, d.h. zum finalen Reaktionsansatz müssen lediglich noch Primer und cDNA hinzugegeben werden. Details über Technik und Methodik der Real-TimePCR werden während des Kurstages dargestellt.

Im Praktikum wird mittels Real-Time PCR die relative mRNA-Expression von IL-6 in Triplikaten unter Verwendung eines iCyclers (Bio-Rad) bestimmt. Die relative Expression wird auf die Expression des Haushaltgens HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphorybosyltransferase) normalisiert. HPRT ist ein sogenanntes „Housekeeping“-Gen und wird konstitutiv exprimiert und dient somit als „interner Standard“ einer jeden Probe.

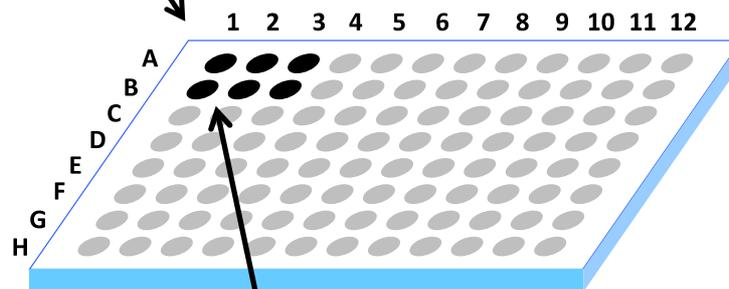
Für die 4 Proben einer jeden Gruppe (jeweils mit Primern für HPRT und IL-6) werden somit insgesamt 24wells einer 96well Platte, welche speziell für die Real-Time PCR verwendet wird, belegt.

Übersicht des Pipettierschemas am Beispiel der unstimulierten Probe:

Probe unstimuliert + *Hprt*- Primer:

Ansatz Real-Time PCR (x3,2):	40 μ l	H ₂ O
	3,2 μ l	Primermix (5pmol/ μ l <i>Hprt</i> for+rev)
	8 μ l	cDNA
	12,8 μ l	EvaGreen qPCR Mix
	64 μ l	Total Volumen

zu je 20 μ l in A1-A3



zu je 20 μ l in B1-B3

Probe unstimuliert + *IL6*- Primer:

Ansatz Real-Time PCR (x3,2):	40 μ l	H ₂ O
	3,2 μ l	Primermix (5pmol/ μ l <i>IL6</i> for+rev)
	8 μ l	cDNA
	12,8 μ l	EvaGreen qPCR Mix
	64 μ l	Total Volumen

In gleicher Weise wird mit den Proben der Ansätze Ionomycin (C1-C3=HPRT-Primer und D1-D3=IL-6 Primer), nur LPS (E und F 1-3) und Ionomycin + LPS (G und H 1-3) verfahren.

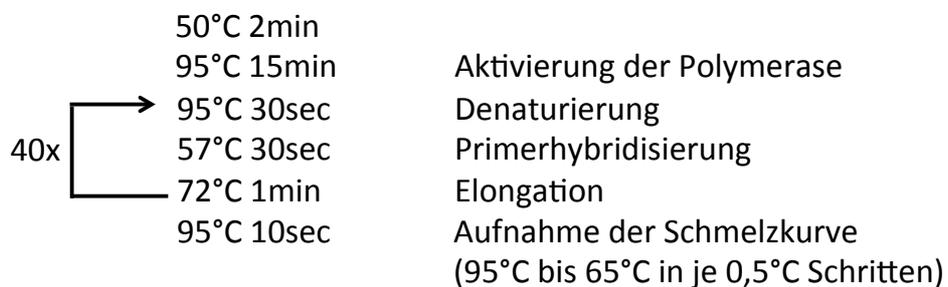
Bitte beim Pipettieren auf größtmögliche Genauigkeit achten und den Rand der Platte mit Gruppennummer beschriften.

Nach erfolgtem Pipettieren der Proben in die Platte wird diese mit Streifen verschlossen und vom Betreuer in das PCR- Gerät gestellt (Cycler, Biorad).

Sequenz der verwendeten Primer:

mIL-6.for: 5'- CTGCAAGAGACTTCCATCCAG -3'
 mIL-6.rev: 5'- AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG -3'
 HPRT for: 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3'
 HPRT rev: 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3'

Die PCR erfolgt unter folgenden Reaktionsbedingungen:



Die „hot-start“ Polymerase wird durch eine vor der eigentlichen PCR-Reaktion stattfindende 8 minütige Inkubation bei 95°C aktiviert. Dies ist beim Ansetzen der Reaktion und bei Aufbewahrung des Sybr-Green von großem Vorteil, da auf ein Eisbad beim Pipettieren bzw. einen Gefrierschrank zur Aufbewahrung verzichtet werden kann.

Auswertung:

Nach Ende der PCR- Reaktion erfolgt die Auswertung. Anhand der ermittelten Ct- Werte für jedes Triplikat wird die relative Expression der IL-6 mRNA bestimmt. Als Beispiel zur Berechnung dient untere Abbildung, in welcher die rel. IL-9 Expression von unterschiedlich lang stimulierten BMMC verglichen wird.

Beispiel: rel. Expression IL-9 mRNA von BMMC 4h Ionomycin vs. 24h Ionomycin							
Versuch mRNA-Kinetik: 11.1.11			Ct Replicate01	Ct Replicate02	Ct Replicate03	Mean	STABW
BMMC 4h Ionomycin	HGPRT		23,36	23,42	23,56	23,45	0,08
	IL-9		31,21	31,66	31,45	31,44	0,18
BMMC 24h Ionomycin	HGPRT		23,95	23,1	23,2	23,42	0,38
	IL-9		26,41	26,54	26,52	26,49	0,06

HGPRT als Ref.	CT _{IL-9}	CT _{HGPRT}	$\Delta CT = CT_{IL-9} - CT_{HGPRT}$	$\Delta CT_s - \Delta CT_c$	Relative Expression
C = BMMC 4h Ionomycin	31,44	23,45	7,99	0	1
S = BMMC 24h Ionomycin	26,49	23,42	3,07	-4,92	30,27

Reporterassay zur Bestimmung der NF- κ B Aktivität in Mastzellen

Die Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren kann durch Verwendung von DNA-Konstrukten gemessen werden, welche die induzierbare Expression des Luciferasegens aus *Photinus pyralis* (Leuchtkäfer) ermöglichen. Diese Konstrukte sind Plasmide, welche die Information der cDNA der *Photinus* Luciferase unter Kontrolle eines Minimalpromoters tragen. Dieser Minimalpromoter besteht lediglich aus einer TATA-Box (Bindestelle der RNA Polymerase II) und mehreren hintereinanderliegenden Bindestellen für NF- κ B Faktoren als *cis*-regulatorische Elemente (Sequenz GGC CTC TGG AAA GTA CCT TAA ACA).

Dieser NF- κ B Reporter wird durch Elektroporation in Mastzellen eingeschleust. Nach einer kurzen Ruhephase werden die transfizierten BMMC entweder so belassen oder unterschiedlich stimuliert (unbehandelt, LPS, Ionomycin, Ionomycin+LPS). Am nächsten Tag werden die Zellen lysiert und die Lumineszenz der einzelnen Proben in einem Luminometer ermittelt.

Als interne Referenz dient ein Plasmid, welches eine zweite Luciferase (aus der Korallenart *Renilla reniformis*) unter Kontrolle des konstitutiv-aktiven Thymidin-Kinase Promoters trägt (pRL-TK). Dieses Plasmid wird zusammen mit dem NF- κ B Reporter in die Zellen eingeschleust und dient aufgrund der konstitutiven Aktivität als interner Standard. Die Lumineszenzen beider Luciferasen lassen sich nacheinander in der selben Probe messen (Dual-Luciferase Reporter Assay der Firma Promega; siehe Anhang).

Zunächst wird die *Photinus* Lumineszenz durch Zugabe des Substrates LAR II spezifisch für die *Photinus* Luciferase gemessen, danach wird durch Zugabe der Lösung „Stop+Glo“ die *Photinus* Aktivität durch Chelatierung der wichtigen Mg^{2+} - Ionen inhibiert und die Lumineszenzreaktion der *Renilla* Luciferase gestartet. Diese zweite Messung ist von großer Wichtigkeit, da voneinander abweichende Werte verschiedener Proben auf Unterschiede in der Transfektionseffizienz oder der Menge der eingesetzten Lysate hindeuten. Treten solche Abweichungen ein, lassen sich als Ausgleich Korrekturfaktoren ermitteln, mit denen die gemessenen *Photinus* - Werte berichtigt werden können.

Durchführung:

- Mastzellen ernten, zentrifugieren, zählen und auf 3×10^6 Zellen/100 μ l in ISCOVEs Medium ohne weitere Zusätze wie z.B. Serum (Schaumbildung!) einstellen; ein Gesamtvolumen von 220 μ l ist ausreichend.

- Plasmide vorbereiten:

7 μ g NF- κ B Reporter und 600ng pRL-TK zusammen in einem Endvolumen von 200 μ l mit ISCOVEs Medium ansetzen.

- Elektroporation (zügig arbeiten):

In 2 Elektroporationsküvetten jeweils 100 μ l Zellsuspension und 100 μ l Plasmidlösung geben und vorsichtig mischen.

Kondensatorentladung mit einer Kapazität von 600 μ F und einer Spannung von 290V in einem Genepulser II (Biorad). Nach dem Signalton sofort 1ml Mastzell-Medium in die Küvetten geben und Zellsuspension in 24 well Platte geben und bis zum Nachmittag im Brutschrank inkubieren.

Kontrolle: nach dem Stromstoß zeigt das Gerät die sog. Zeitkonstante in msec an. Darunter versteht man die Zeit, nach welcher die Kondensatorkapazität bei der Entladung auf den Wert $1/e$ (Euler Konstante), also etwa $1/3$, abgesunken ist. Die Zeitkonstante sollte zwischen 30 und 40 msec liegen; bei höheren Werten die Probe verwerfen.

- Stimulation der Zellen:

Die beiden Transfektionsansätze werden vereinigt und zu gleichen Teilen (0,5 ml) auf 4 Ansätze in 24 well Platten verteilt:

1. unstimuliert
2. 1 μ M Ionomycin
3. LPS [200ng/ml]
4. 1 μ M Ionomycin + LPS [200ng/ml]

Die Substanzen werden in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml in Testmedium zugegeben. Die Stimulation erfolgt über Nacht im Brutschrank.

- Herstellen der Zellysate:

Die Zellen werden geerntet, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4000 rpm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die Zellen werden danach in 1ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellpellets werden danach in je 50 μ l "Passive Lysis Buffer" (muß vorher 1:5 mit H₂O verdünnt werden!) gründlich resuspendiert und kommen für 10 min auf einen Schüttler (Kühlraum).

Nach der Extraktion werden die Proben kühl für 2min zentrifugiert (10krpm), die Überstände in neue 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und bei mind. -20°C aufbewahrt.

- Lumineszenzmessung:

Vorbereitung der Substrate:

Das Photinussubstrat LAR II wird gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt.

Stop&Glo-Substrat (Renillasubstrat) ist 50fach konzentriert und wird in Stop&Glo-Puffer verdünnt.

Messung:

10 μ l Zellextrakt werden in Meßröhrchen vorgelegt, 50 μ l LAR II zugegeben, 3x resuspendiert und sofort in einem Turner Luminometer für 10sec gemessen. Wert notieren (Photinus).

Danach werden 50 μ l Stop&Glo dazu gegeben, 3x resuspendiert und wieder für 10sec gemessen (Renilla).

Bei der Auswertung muß mit Hilfe der Renilla-Werte ein Faktor berechnet werden, mit dem die Photinus-Werte korrigiert werden.

Berechnet wird ein Stimulationsindex der angibt, um welchen Faktor die Luciferaseaktivität einer Probe den Leerwert (unstimulierte Mastzellen; Faktor = 1) übersteigt.

1.A. Dual-Luciferase® Reporter Assay Chemistry

Firefly and *Renilla* luciferases, because of their distinct evolutionary origins, have dissimilar enzyme structures and substrate requirements. These differences make it possible to selectively discriminate between their respective bioluminescent reactions. Thus, using the DLR™ Assay System, the luminescence from the firefly luciferase reaction may be quenched while simultaneously activating the luminescent reaction of *Renilla* luciferase.

Firefly luciferase is a 61kDa monomeric protein that does not require post-translational processing for enzymatic activity (1,2). Thus, it functions as a genetic reporter immediately upon translation. Photon emission is achieved through oxidation of beetle luciferin in a reaction that requires ATP, Mg²⁺ and O₂ (Figure 1). Under conventional reaction conditions, the oxidation occurs through a luciferyl-AMP intermediate that turns over very slowly. As a result, this assay chemistry generates a “flash” of light that rapidly decays after the substrate and enzyme are mixed.

Many of our Luciferase Assay Reagents for quantitating firefly luciferase incorporate coenzyme A (CoA) to provide more favorable overall reaction kinetics (3). In the presence of CoA, the luciferase assay yields stabilized luminescence signals with significantly greater intensities (Figure 2) than those obtained from the conventional assay chemistry. The firefly luciferase assay is extremely sensitive and extends over a linear range covering at least seven orders of magnitude in enzyme concentration (Figure 3).

Renilla luciferase, a 36kDa monomeric protein, is composed of 3% carbohydrate when purified from its natural source, *Renilla reniformis* (4). However, like firefly luciferase, post-translational modification is not required for its activity, and the enzyme may function as a genetic reporter immediately following translation. The luminescent reaction catalyzed by *Renilla* luciferase utilizes O₂ and coelenterate-luciferin (coelenterazine; Figure 1).

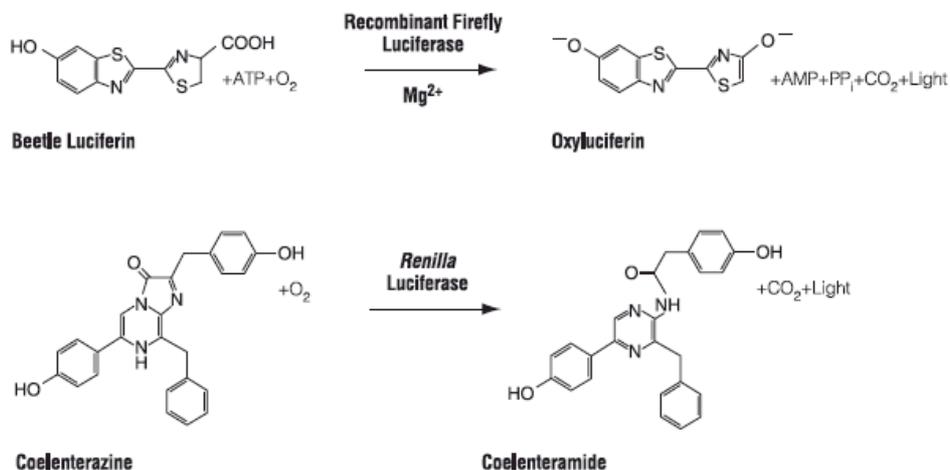


Figure 1. Bioluminescent reactions catalyzed by firefly and *Renilla* luciferases.