

Forschung hautnah:
Wissenschaftliches Schülerpraktikum
vergeben durch den
Förderverein der BiologieOlympiade e.V.

Hygieneinstitut der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg
Arbeitsgruppe Kubatzky
Betreuer: Frau Dr. Katharina Hieke-Kubatzky
Thema: Stimulierung von Makrophagen und Mutation eines Plas-
mids

Theresa Kristin Beyme
12.Klasse
Werner-von-Siemens-Gymnasium Magdeburg

19.06.17-14.07.17

Abkürzungsverzeichnis:

LPS = Lipopolysaccharide

RAW= Name einer Zelllinie von Makrophagen

IPTG = Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

rpm = rounds per minute (Runden pro Minute)

PMT = *Pasteurella multocida* Toxin

GST=Glutathion-S-Transferase

DMEM =Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Δ t = hitzeinaktiviert

TNF = Tumornekrosefaktor

pSTAT1 = Phospho -Signal transducer and activator of transcription 1

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	4
2 Projektinformationen.....	5
3 Material und Methoden	7
3.1 Pathogene Eigenschaften des Fimbrienproteins	7
3.1.1 Isolierung des Fimbrienproteins.....	7
3.1.2 Stimulierung der RAW-Zellen	8
3.2 Mutation des PMT-Plasmids.....	12
3.2.4 Sequenzierung.....	13
4 Versuchsergebnisse	14
4.1 Pathogene Eigenschaften des Fimbrienproteins	14
4.2 Mutation des PMT-Plasmids.....	18
5 Diskussion	20
6 Fazit.....	22
7 Literaturverzeichnis.....	23
8 Anhang.....	24

1 Einleitung

Da ich dieses Jahr das Abitur an einem Gymnasium mit mathematisch-naturwissenschaftlich-technischen Profil abgelegt habe, bin ich schon relativ früh mit Biologie in Berührung gekommen. Seit der 5. Klasse ist Biologie eines meiner liebsten Fächer, sodass meine Begeisterung bald auch über die Schule hinausging. Meine Lehrerin hat mich auf die Internationale Biologieolympiade aufmerksam gemacht, an der ich dieses Jahr teilnahm und es bis in die vierte Runde schaffte. In der dritten Runde der Biologieolympiade werden an einige Teilnehmer Forschungspraktika vergeben. Dabei habe ich mich um das Praktikum in Heidelberg am Hygieneinstitut der Ruprecht-Karls-Universität beworben, da ich zu diesem Zeitpunkt bereits eine Laufbahn in medizinischer Richtung anstrebte. Das Hygieneinstitut ist Teil des Theoretikums und beschäftigt sich insbesondere mit medizinischer Mikrobiologie und Hygiene. Ich habe das Praktikum in der Arbeitsgruppe Kubatzky absolviert, deren Schwerpunkt auf der Forschung an dem Bakterium *Pasteurella multocida* liegt. Es wird hauptsächlich die Wirkung des von *Pasteurella multocida* produzierten Toxin, PMT, auf Immunzellen untersucht, jedoch auch andere Eigenschaften des Bakteriums.

Während des Praktikums habe ich an zwei Projekten gearbeitet. Im ersten Projekt ging es darum, ein Membranprotein des Bakteriums zu isolieren und seine Auswirkungen auf Immunzellen zu testen. Dabei war die Fragestellung, inwiefern das Protein die pathogenen Eigenschaften von *P. multocida* beeinflusst. Meine Ergebnisse stimmten mit den vorausgegangenen Ergebnissen der Forschungsgruppe überein, dass das Membranprotein pathogene Eigenschaften besitzt, jedoch nicht so stark wie PMT.

Das zweite Projekt bestand darin, Negativmutanten zu produzieren, die inaktives PMT anstelle des Toxins herstellen. Diese Mutanten sollen der Arbeitsgruppe als Negativkontrolle in weiteren Experimenten dienen. Nach mehreren Versuchen ist es mir gelungen, eine solche Mutante herzustellen, mit dem jetzt Negativkontrollen durchgeführt werden können.

2 Projektinformationen

Das Bakterium *Pasteurella multocida*, Auslöser von Krankheiten vor allem bei Tieren, seltener bei Menschen, kann durch verschiedene Merkmale charakterisiert werden. Charakterisierungsmöglichkeiten sind beispielsweise die Schleimhülle, Membranproteine auf der Außenseite des Bakteriums oder Lipopolysaccharide (LPS). Ein weiteres Merkmal sind die sogenannten Fimbrien. Diese bestehen aus einem Protein, welches in die Außenmembran des Bakteriums eingelagert ist. Fimbrien oder Pili sind besonders häufig bei gramnegativen Bakterien zu finden. Ihre Funktion besteht zumeist in der Anheftung an andere Bakterien oder an die Oberfläche tierischer Zellen. Letzteres ist bei *P. multocida* der Fall, daher lohnt es sich, im Rahmen der Betrachtung von *P. multocida* als Pathogen seine Bakterienfimbrien genauer zu untersuchen. Eine der 4 Untereinheiten, aus welchem das *P. multocida*-Fimbrium besteht, ist das untersuchte Membranprotein. Ziel des Projektes ist es, dieses aus *E. coli*-Bakterien zu isolieren und seine pathogenen Eigenschaften zu untersuchen. Für das Experiment wurde deswegen ein *E. coli* Stamm genutzt, in den die DNA, die für das Protein codiert, zuvor transformiert wurde. Um die pathogenen Eigenschaften zu testen, wird das isolierte Fimbrienprotein zu RAW-Zellen (Makrophagen) gegeben und die Gestaltveränderung der Zellen nach einer Zeit von ca. 24 Stunden beobachtet.

Die Proteincodierende Sequenz ist Teil eines Operons, welches durch IPTG induziert werden kann. Ein Operon ist ein Abschnitt der DNA, der aus Promotor, Operator und Strukturgenen besteht. An anderer Stelle der DNA wird für einen Repressor codiert, der sich an die Bindungsstelle des Operators heften kann. Am Promotor setzt die Transkription, der erste Schritt zur Herstellung von Proteinen, an. Diese wird jedoch durch das mit dem Repressor blockierte Operon verhindert, sodass die Strukturgene, zu denen die Fimbrienprotein-codierende Sequenz gehört, nicht abgelesen werden können. Bestimmte Substanzen wie IPTG können Repressoren inaktivieren, indem sie die Bindungsstelle des Repressors an dem Operon verändern. Nun kann sich der Repressor nicht mehr an den Operator heften und die Transkription kann erfolgen. Das zu untersuchende Fimbrienprotein kann gebildet werden.

Nach der Isolierung des Proteins wird dessen Wirkung auf RAW-Zellen im Vergleich mit anderen pathogenen Substanzen getestet. RAW-Zellen sind adhärente Zellen, sie setzen sich also auf dem Boden der Zellkulturflasche oder der 6-well-Platte ab und wachsen dort an. Um die Wirkung der Stimulationssubstanzen im Detail erkennen zu können, wurden verschiedene Techniken angewandt.

Die von *P. multocida* ausgelösten Krankheiten werden vom PMT induziert, einem Toxin, welches das Bakterium produziert. Das sogenannte PMT ist ein Protein, das auf einem Plasmid codiert ist und als Exotoxin von dem Bakterium in die Zellumgebung abgegeben wird. Es handelt sich hierbei um ein AB-Toxin, es besteht folglich aus einem A-Teil, welcher die katalytische Aktivität enthält, und einem B-Teil, welcher für die spezifische Bindung an einen Rezeptor unerlässlich ist. Durch diesen findet rezeptorvermittelte Endocytose statt, der B-Teil verlässt im Anschluss die Zelle wieder, der A-Teil gelangt in das Zellplasma und weiter bis in den Kern, wo er als Repressor in einem Operon die Transkription beeinflussen kann. Der A-Teil besitzt ein kleines aktives Zentrum, sodass der Austausch einer Aminosäure bzw. Base ausreicht, um die katalytische Aktivität zu stoppen. Für einen Negativnachweis werden Bakterien mit diesem mutierten Gen benötigt. Nachdem die Mutation erfolgt ist, ist eine Klonierung von Plasmiden mit der Punktmutation notwendig. Um die einzelne Base auszutauschen, wird das Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Dabei wird zuerst eine PCR durchgeführt, bei der durch die Primer die Mutation herbeigeführt wird. Gleichzeitig wird das Plasmid mit der veränderten Basensequenz vervielfältigt. Die duplizierte DNA liegt nun in linearer Form, noch nicht ringförmig als Plasmid vor. Der zweite Schritt des Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit Protokolls ist daher die Ligation, sodass Plasmide entstehen. Danach folgt die Transformation, d.h. die Plasmide werden in Bakterien eingebracht. Nachdem die Bakterien transformiert wurden, werden sie auf einer Agarplatte ausgestrichen. Es folgt die Sequenzierung, um eindeutig nachzuweisen, dass die gewünschte Mutation vorliegt. Das Primerset besteht aus einem Forward und einem Revers Primer. Dabei setzen beide Primer „Rücken an Rücken“ an, der eine geht rückwärts, der andere vorwärts. Letzterer enthält ungefähr in der Mitte die Mutation. Um das aktive Zentrum des Toxins zu inaktivieren, wird aus dem Basentriplet „TGT“ an 3495. Stelle der Plasmidsequenz „AGT“. Es handelt sich also um eine Punktmutation, bei der nur eine Aminosäure ausgetauscht wird, aus Cystein wird Serin (siehe Anhang, Abb. 3).

3 Material und Methoden

3.1 Pathogene Eigenschaften des Fimbrienproteins

3.1.1 Isolierung des Fimbrienproteins

Zur Isolierung wurde zunächst eine Vorkultur an *E.coli*-Bakterien, die so transformiert wurden, dass sie das untersuchte Fimbrienprotein produzieren können, angesetzt. 500 ml LB Medium wurden mit 500 µl Carbenicillin (50 mg/ml) versetzt und anschließend in einen Kolben mit Schikane gegeben. Abends wurde das vorbereitete Medium mit transformierten *E.coli*-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm auf den Schüttler gestellt. Am nächsten Morgen wurde die Expressionskultur angesetzt. Hierfür wurden 2 l LB Medium mit 2 ml Carbenicillin in einen Kolben mit Schikane gegeben. Die Expressionskultur wurde mit Bakterien aus der Vorkultur angeimpft. Nun wurde die Expressionskultur bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis die durch eine photometrische Messung ermittelte Dichte der Bakterienkultur bei OD₆₀₀ ausreichend war. Der OD-Wert sollte ca. 0,6 betragen, sodass genug Bakterien für die Isolierung zur Verfügung standen. War dies der Fall, wurde eine Prä-Induktionsprobe abgenommen und die dreistündige Induktion mit 2 ml IPTG (1M) begonnen. Nach der Induktion wurde eine After-Induktionsprobe abgenommen und zusammen mit der Prä-Induktionsprobe bei 13.000 rpm 1 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei -20°C eingefroren. Anschließend erfolgte die Zellernte, wobei die Expressionskultur bei 6.000 rpm 10 min bei 4°C abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Lyse Puffer resuspendiert und danach der Zentrifugenbecher mit Lyse Puffer aufgefüllt. Nun wurde dieser unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Pellet auf Raumtemperatur aufgetaut, in 10 ml Lyse Puffer resuspendiert und mit dem Homogenisierer auf Eis aufgelöst. Zu dem Lysat wurde 6 ml Triton-X 100 (10%) hinzugegeben sowie 20 mg Lysozyme. Das Lysat wurde 2 h auf einem Roller im Kaltraum inkubiert. Im Anschluss erfolgte der DNase-Verdau. Es wurden 40 µl CaCl₂ (2mM), 200 µl MnCl₂ (10 mM) und 20 µl DNase 1 (10 µl/ml) hinzugegeben und das Lysat unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Vom Lysat wurden nach der Inkubation im Kaltraum eine Probe entnommen, die bei 15.000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und zusammen mit dem Pellet bei -20°C eingefroren. Das restliche Lysat wurde ebenfalls bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert, jedoch für eine Stunde. Der Überstand wurde in einen Falcon überführt und zusammen mit dem Pellet bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen des Überstands folgte die Aufreinigung des

Proteins über GST Gravity Flow sowie die Thrombinspaltung. Das Verfahren mittels GST Gravity Flow beruht darauf, dass das Fimbrienprotein durch eine angehängte Aminosäuresequenz mit einem GST-Tag markiert wurde. In der Säule bleibt das mit dem GST-Tag markierte Protein haften, während andere Proteine, die im Lysat vorkommen, durch die Säule gepumpt werden. Der GST-Tag wird durch Thrombinspaltung von der Säule getrennt. Im Vergleich zu dem Fimbrienprotein ist der GST-Tag sehr groß, sodass der GST-Tag vor der Stimulierung der Makrophagen mit dem Protein abgespalten werden sollte. Anderenfalls könnten die gemachten Beobachtungen auf das GST, nicht auf das Fimbrienprotein zurückzuführen sein. Daher ist eine Elution vor der Stimulierung notwendig. Daher wurde das Lysat mit Lyse Puffer so verdünnt, dass die Tritonkonzentration weniger als 0,1 % beträgt. Nun wurde die Säule im Kaltraum an die Pumpe angeschlossen und das Lysat durch die Säule geleitet (Aufbau im Anhang S. 26, Abb. 4). Die GST-Tags wurden nach dem Durchlaufen des Lysats durch die Säule von der Säule getrennt, indem 3 ml Tris/HCl-Puffer mit 50 µl Thrombin-Units durch die Säule geleitet wurden. Über Nacht blieb 1 ml der Puffer-Thrombin-Lösung in der Säule stehen. Am nächsten Morgen erfolgt die Elution mit Lysepuffer. Die Säule wird mit Gluthation, Wasser und Lysepuffer regeneriert. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden die Elutionsproben mit dem Nanodrop gemessen. Außerdem habe ich Proben bei der Regeneration der Säule angefertigt und hier ebenfalls die Proteinkonzentration mit Nanodrop gemessen.

Zur Identifizierung des Fimbrienproteins wurde ein SDS Gel mit Coomassie-Färbung angefertigt. Die Pellets von Prä-Induktion, After-Induktion und Lyse wurden in 100 µl PBS-Puffer aufgelöst und genauso wie der Überstand der Lyse auf $OD_{600}=0,15$ normalisiert (Rechnung im Anhang, S. 26). Die Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die SDS-Page wurde mit den Proben und einem Marker gefüllt und bei 120 V 2h laufen gelassen. Im Anschluss wird das Gel mit Coomassie gefärbt und nach einigen Stunden mit Entfärber entfärbt.

3.1.2 Stimulierung der RAW-Zellen

Die Makrophagen der Zelllinie RAW 246.ATCC wurden zunächst aus dem Stickstofftank entnommen und anschließend im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Das Medium, DMEM mit Glutamin, 10% FCS Δt und 1% Penicillin/Streptomycin, wurde ebenfalls vorgewärmt. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet resuspendiert. Dann wurde Medium in eine Zellkulturflasche vorgelegt und die

Zellen überführt. Unter dem Lichtmikroskop wurde überprüft, ob genug lebende Zellen vorhanden waren. Die Zellkulturflasche wurde nun bei 37°C gelagert, das Medium alle zwei Tage gewechselt und die Zellen gesplittet. Dazu wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, mehrmals in einer Pipette aufgezogen und wieder hinuntergelassen. Anschließend wurden nur noch 5 ml des Mediums mit den Zellen in der Zellkulturflasche gelassen, der Rest wird. In die Zellkulturflasche werden noch 20 ml frisches, angewärmtes Medium gegeben.

Vor dem Experiment wurden die Zellen nach dem Ablösen von der Zellkulturflasche unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellen wurden auf die gewünschte Konzentration verdünnt und in eine 6-Well-Platte gegeben. In jedes Well wurde nun die Substanz zur Stimulierung gegeben. Im ersten Well wurden keinerlei Substanzen hinzugefügt, um einen unstimulierten Zustand als Kontrolle zu erreichen. Die anderen Wells wurden mit LPS, hitzeinkativierten Fimbrienprotein, aktiven Fimbrienprotein, PMT sowie PMT und Fimbrienprotein gleichzeitig stimuliert. Das hitzeinkativierte Fimbrienprotein stammte wie das aktivierte Fimbrienprotein aus der Proteinisolierung, die auf Seite 8 beschrieben wird. Die Hitzeinaktivierung erfolgte für 2h in 90°C warmem Wasserbad. Nach ca. 24 Stunden wurde die 6-Well-Platte unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

Zur weiteren Untersuchung der Wirkung der Substanzen auf die Makrophagen wurde ein Western Blot, eine RT-PCR sowie eine ELISA durchgeführt.

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit von Proteinen. Vor dem namensgebenden Blot werden die Proteine in einer Probe durch Gelelektrophorese in Banden aufgetrennt. Dabei wurde in diesem Versuch eine SDS-Page verwendet. Nachdem das Gel gelaufen ist, findet der eigentliche Western Blot statt. Ein Semi-dry-Blotter wird von unten nach oben mit vier Whatmann Papers, der Membran, dem Gel und wiederum vier Whatmann Papers gefüllt. Die negativ geladenen Proteine wandern zur Anode des Blotters und werden dann auf der anodenseitig gelegenen Membran fixiert (Anhang S. 24, Abb. 1). Die Membran kann jetzt gefärbt werden, anschließend soll die Membran geblockt werden, damit keine unerwünschten Proteine auf die Membran gelangen und dort fixiert werden. Um die Proteine nun nachzuweisen, werden Antikörper benutzt. Antikörper sind von Immunzellen gebildete Proteine, die an für diesen Antikörper spezifische Strukturen binden können. Dabei besitzen sie zwei Bindungsstellen. Für den Western Blot werden zwei Antikörper verwendet. Der Erstantikörper bindet an für ihn spezifisches Protein und weist dieses nach. Nun wird der Erstantikörper von den Stellen der Membran gewaschen, an die er nicht gebunden hat und an denen folglich das

nachzuweisende Protein nicht vorkommt. Der Zweiantikörper weist den Erstantikörper nach, indem er an die zweite Bindungsstelle des Erstantikörpers bindet, gleichzeitig ist dieser jedoch auch z. B. durch Fluoreszenz markiert. Die Fluoreszenz ist nun durch eine Kamera als Bild erkennbar. Somit kann der Zweiantikörper lokalisiert werden und über den daran gebundenen Erstantikörper das Protein.

Ein ELISA ist ein Verfahren, um die Konzentration eines Proteins in einer Lösung zu bestimmen. Dazu wird zuerst über Nacht einen Antikörper an eine ELISA-Platte gebunden. Am nächsten Morgen wird die Platte gewaschen und die Standards sowie die zu testende Lösung in die ELISA-Platte pipettiert. Je nachdem, wie viel Protein in der Lösung enthalten ist, desto mehr Protein wird an die Antikörper gebunden. Die überschüssigen Proteine werden abgewaschen. Nun werden andere Antikörper hinzugegeben, die an die Proteine spezifisch binden. Diese Antikörper besitzen jedoch ein Enzym, welches an sie gekoppelt ist. Im letzten Schritt wird zu jeder Probe und den Standards ein Substrat gegeben, welches durch das an den Zweiantikörper gekoppelte Enzym umgesetzt wird. Bei der Umsetzung des Substrats tritt ein Farbumschlag ein, zumeist von weiß nach gelb. Ein Photometer kann nun die Farbintensität der Proben bestimmen und somit die Konzentration des Proteins ermitteln (Anhang S. 24, Abb. 2).

Eine RT-PCR oder quantitative Echtzeit-PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA, die auf der herkömmlichen PCR beruht. Jedoch ist bei einer RTPCR gleichzeitig die Quantifizierung der gewonnenen Nukleinsäure möglich. Dies geschieht durch Fluoreszenzmessungen während die PCR abläuft, wobei die Fluoreszenz proportional mit der DNA-Menge zunimmt. Mit Hilfe eines Computers kann mit dieser Methode in Echtzeit die Zunahme an DNA verfolgt werden.

Eine herkömmliche PCR besteht aus drei Abschnitten. Zuerst wird die DNA bei ca. 90°C denaturiert, sodass sich die Doppelstränge lösen und einzeln vorliegen. Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf 50-70°C herabgesetzt, damit sich die Primer anlagern können. Die Temperatur richtet sich dabei nach dem jeweiligen Primer. Nachdem sich die Primer angelagert haben, wird die Temperatur wieder auf 70°C angehoben, weil die häufig verwendete TAQ-Polymerase bei dieser Temperatur ihr Optimum besitzt. Die DNA-Polymerase verlängert und dupliziert die DNA-Stränge nach dem Vorbild des Mutterstrangs beginnend beim Primer, sodass am Ende des Zyklus doppelt so viel DNA vorhanden ist wie zu Beginn. Die DNA liegt nun wieder in Doppelsträngen vor. Ein derartiger Zyklus wird mehrere Male wiederholt.

Um die Verfahren durchführen zu können, wurde der Überstand abgenommen und für den ELISA genutzt. Die Zellen für RT-PCR und Western Blot wurden in PBS-Puffer

gewaschen, vom Boden der Wells abgelöst und in Eppendorf-Tubes überführt.

Die Zellen für die RT-PCR wurden nach dem Protokoll für RNA-Isolation weiterbehandelt. Anschließend folgte die Synthese der cDNA aus der RNA. Die Proben wurden für die RT-PCR vorbereitet und in das RT-PCR-Gerät gestellt. Die RT-PCR lief ca. zwei Stunden.

Der ELISA aus den Überständen erfolgte nach dem ELISA-Protokoll (Anhang S.28) und wurde mit dem Programm Magellan5 ausgewertet.

Um den Western Blot durchzuführen, wurde zunächst die Proteinkonzentration mit Hilfe eines BCA-Assay bestimmt (Protokoll Anhang S. 27). Danach wurde die damit ermittelte Menge an Probe auf ein SDS-Gel aufgetragen und das Gel laufen gelassen. Das Gel wurde dann Semi-dry auf eine Membran geblottet. Die Membran wurde dann gefärbt und zerschnitten, um verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Antikörpern behandeln zu können. Anschließend wurden die Membranteile eine Stunde geblockt und anschließend über Nacht mit dem Erstantikörper behandelt, der gegen das spezifische Protein gerichtet ist, welches in der Probe vermutet wird. Am nächsten Morgen wurde die Membran gespült und mit dem Zweitantikörper (Anti-Rabbit-Antikörper) versetzt. Die Antikörper wurden abgewaschen und von den Membranteilen Bilder gemacht, um die Fluoreszenz aufzunehmen. Da die Kamera defekt war, wurden die Bilder in der Dunkelkammer angefertigt.

3.2 Mutation des PMT-Plasmids

3.2.1 Primerauswahl

Von essentieller Wichtigkeit bei der Nutzung des Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit ist die Auswahl der Primer. Von diesen ist die Art und Position der Mutation abhängig. Daher gibt es ein Programm zur Erleichterung dieser Aufgabe. Der NEBaseChanger benötigt als Input die Basensequenz (Anhang S. 25, Abb. 3) sowie die Position des Triplets, das verändert werden soll. Außerdem muss die gewünschte Änderung angegeben werden. Das Programm ermittelt die Sequenz der Primer sowie die optimale Temperatur zur Anlagerung der Primer bei der PCR (Anhang S. 29). Danach wurden die Primer bestellt und gefriergetrocknet ins Labor geliefert.

3.2.2 Induktion der Mutation

Die Induktion der Mutation folgte dem Protokoll des Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (Protokoll Anhang S. 30). Die Primer wurden mit Wasser angesetzt und zusammen mit der Template DNA, dem Master Mix und Wasser vermischt. Es folgte das im Protokoll angegebene Programm im ThermoCycler, die Temperatur zur Anlagerung der Primer betrug 62°C. Die replizierten DNA-Stücke wurden nach Protokoll zu Ringen geformt und in *E. coli*-Bakterien transformiert. Anschließend wurden die *E. coli* auf Agaroseplatten ausgestrichen.

3.2.3 DNA-Isolierung

Nachdem die Bakterien einen Tag gewachsen waren, wurden 10 einzelne Kolonien mit einem Zahnstocher gepickt und in je 5 ml Medium gegeben. Die Kulturen wurden bei 37°C und 180 rpm über Nacht in den Schüttler gestellt. Am nächsten Morgen konnte die DNA-Isolierung aus den Bakterien mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit beginnen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren vom Medium getrennt, in 250 µl Puffer P1 resuspendiert und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Es wurde 250 µl Puffer P2 hinzugegeben und durch vier- bis sechs maliges Umdrehen des Tubes gemischt. Die Lösung wurde dann blau. Danach wurde 350 µl Buffer N3 hinzugefügt und sofort durch zwei- bis sechs maliges Umdrehen gemischt. Dadurch erschien die Lösung nicht mehr blau, sondern farblos. Diese Lösung wurde anschließend bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. 800 µl des Überstands wurde nun in eine QIAprep 2.0 spin column pipettiert. Die Säule wurde für 30-60 s zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Säule in mehreren Schritten gewaschen. Im ersten Schritt wurden 0,5 ml Puffer PB auf die Säule gegeben und für 30-60 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt. Es folgte eine

Waschung mit 0,75 ml Puffer PE, wonach wieder 30-60 s zentrifugiert und der Durchfluss entfernt wurde. Anschließend wurde noch einmal für 1 min zentrifugiert um überschüssigen Waschpuffer zu entfernen. Die QIAprep 2.0 Säule wurde nun in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Tube gesetzt und mit 50 µl EB Puffer eluiert, 1 min stehen gelassen und dann die gleiche Zeit zentrifugiert. Im Eppendorf-Tube befand sich anschließend die isolierte Bakterien-DNA.

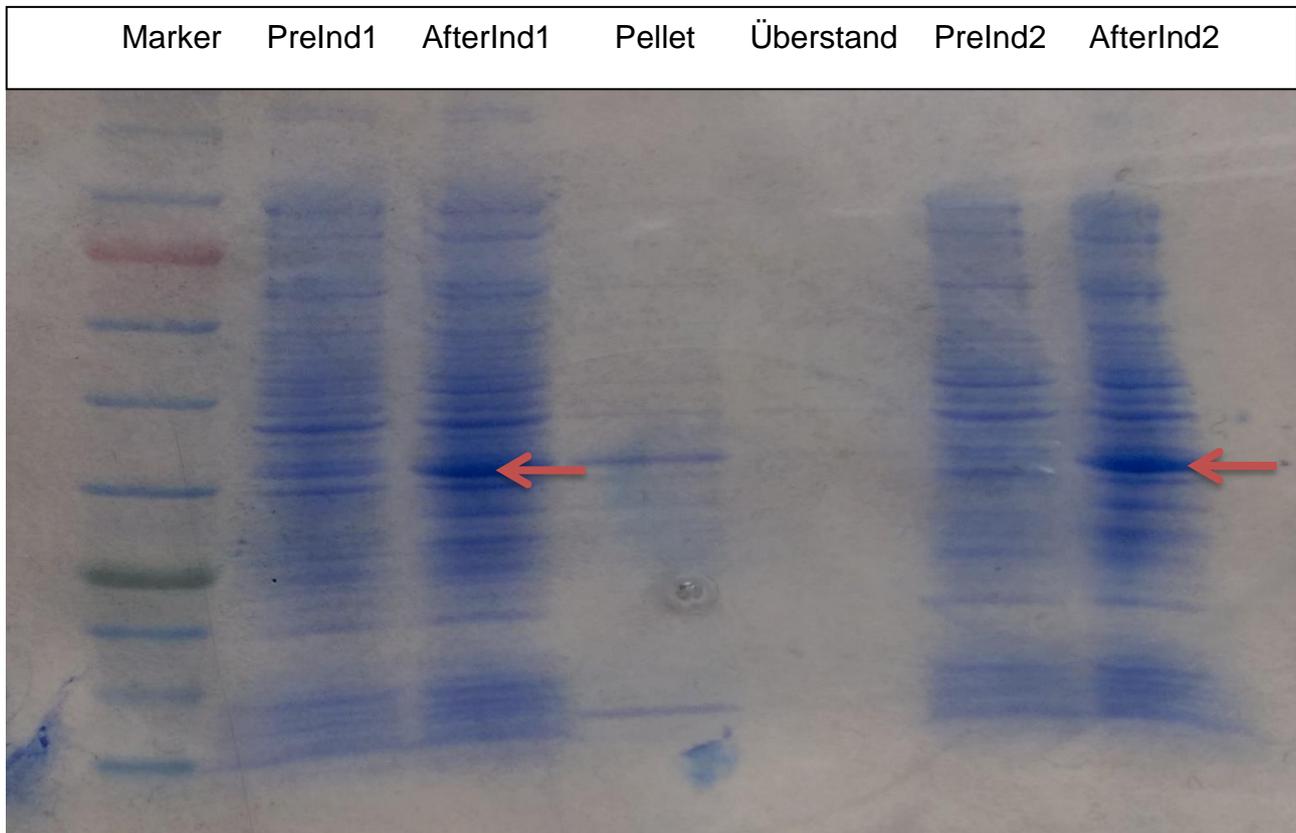
3.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde von einem anderen Institut vorgenommen, daher musste sie lediglich vorbereitet werden. Dazu wurden 12 µl der isolierten Plasmid-DNA zusammen mit 3 µl Sequenzierprimern zu diesem Institut geschickt, von dem zwei Tage später die fertige Sequenzierung zurückkam.

4 Versuchsergebnisse

4.1 Pathogene Eigenschaften des Fimbrienproteins

4.1.1 Isolierung des Fimbrienproteins



Anhand des Coomassie-Gels ist klar zu erkennen, dass sowohl in den Prä-Induktionsproben als auch in den After-Induktionsproben Proteine zu finden sind. In den After-Induktionsproben erkennt man ebenfalls die erhöhte Konzentration an untersuchtem Fimbrienprotein (Pfeil). In der Probe nach der Lyse sind erheblich weniger Banden und damit weniger Proteine zu sehen, im Überstand nach der Lyse kann man die Banden nur noch erahnen.

User Default

05.07.2017 11:19

3.0.1 B2553

Save

Print

Exit

Sample ID	mg/ml	A 280	260/280	E 1%	Epsilon x10e3	M. Wt. kDa
P 3	-0,02	-0,016	-0,11	10,		
P 2	-0,01	-0,015	-0,62	10,		
P 1	0,02	0,018	2,77	10,		
GST1	0,18	0,180	1,02	10,		
GST2	1,56	1,565	0,97	10,		
GST3	1,27	1,267	1,10	10,		
GST4	0,28	0,278	1,29	10,		
GST5	0,20	0,200	1,93	10,		
GST6	0,12	0,118	2,78	10,		
GST7	0,05	0,048	4,48	10,		

Die Messungen am Nanodrop von der Elution P 3 – P 1 und der Reinigung der Säule GST1 – GST7 zeigen, dass in den Elutionsproben wenig Proteine zu finden sind. Dafür ist in den Reinigungsproben viel Protein enthalten.

4.1.2 Stimulierung der RAW-Zellen

Die Stimulierung mit verschiedenen Substanzen hat die RAW-Zellen in ihrer Gestalt verändert (Anhang, ab S.33). Die unstimulierten Zellen sind fast rund, während die mit LPS stimulierten Zellen oval sind und spitze Ausläufer ausgebildet haben. Noch extremer ist diese Gestalt bei PMT-Stimulierung zu erkennen. Bei gleichzeitiger Zugabe von PMT und Fimbrienprotein tritt dieselbe Formveränderung der Zellen ein, hitzeinaktiviertes Fimbrienprotein hat kaum Auswirkungen auf die Gestalt der RAW-Zellen. Aktives Fimbrienprotein allein führt zu geringen Veränderungen in der Form der Zellen, auch hier kann man Ausläufer der Zellen entdecken.

Bei der Untersuchung der stimulierten Zellen mit der RT-PCR wurden Rohdaten erhalten, die im Anhang (S. 31) zu finden sind.

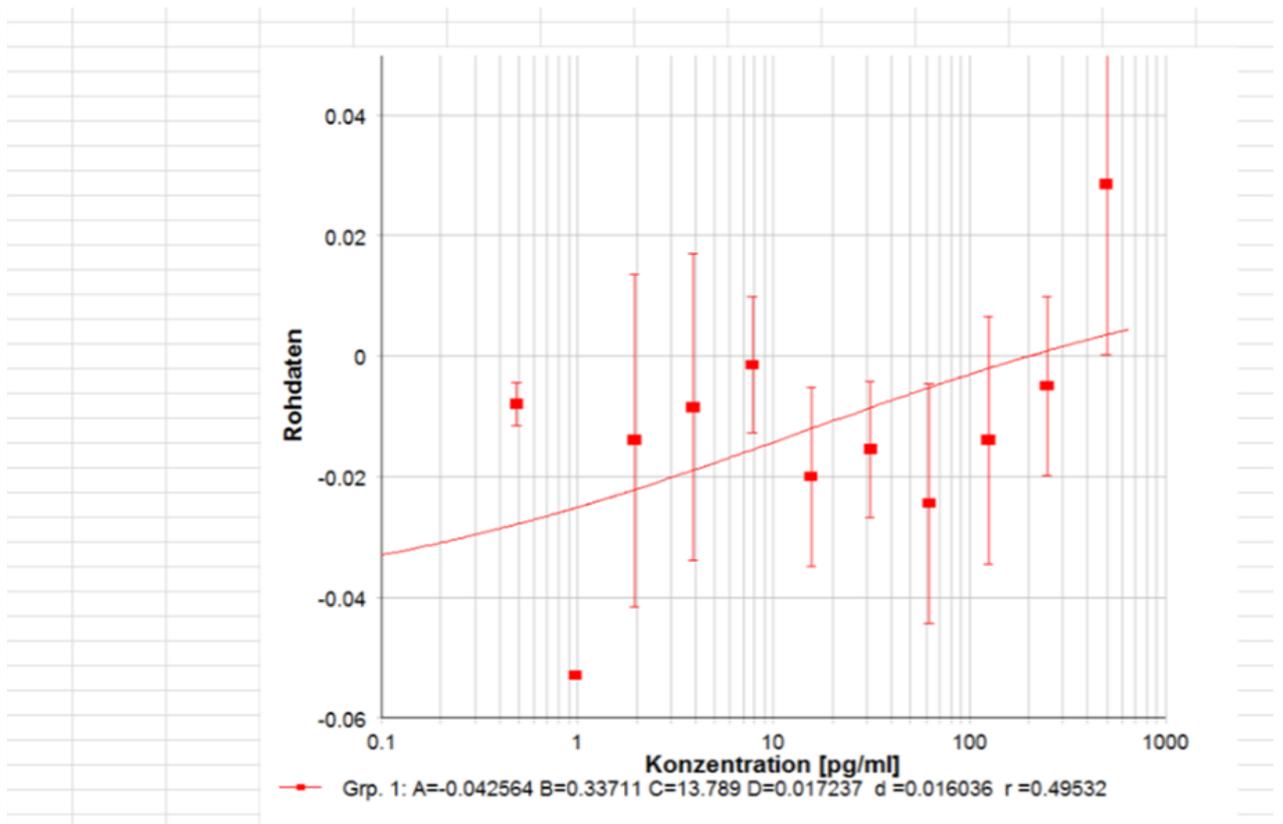
Aus den Rohdaten wurden folgende Daten der RT-PCR gewonnen:

	TNF 13-07-2017	MW	ΔCt	$1/2^{\Delta Ct}$		
1	19	20	19,5008015	1,5738915	0,3359011174	Unst
2	19	19	19,232725	-0,5516445	1,46575553	LPS
3	17	17	17,281608	-1,5042725	2,836815846	PMT
4						
5	17	18	17,6562955	0,859947	0,5509727985	Unst
6	16	16	15,961097	-2,1509455	4,441187559	LPS
7	18	18	18,0837725	0,591403	0,6636971572	P ΔT
8	17	17	17,057519	-0,56973	1,484245768	P
9	17	17	17,173974	-1,320224	2,497048772	PMT
10	16	16	16,208855	16,208855	0,00001320226	PMT-P

Bei der RT-PCR wird zur Bestimmung der Menge an PCR-Produkt ein so genanntes housekeeping gene zum Vergleich der Konzentrationen benötigt. Dies ist in diesem Experiment TNF und in den Spalten 3 und 4 zu finden, da es zweimal als Referenz aufgetragen wurde. Der Ct-Wert (eng. *Cycle threshold*) ist der Schwellenwertzyklus, bei dem die exponentielle Phase der PCR beginnt. Die Ct-Werte von Probe und TNF werden in mehreren Schritten miteinander verrechnet. Da die Konzentrationen logarithmisch zur Basis 2 miteinander zusammenhängen, wird das erhaltene Ergebnis als Exponent zur Basis 0,5 aufgefasst. In der vorletzten Spalte ist daher die DNA-Konzentration zu sehen. Es ist ersichtlich, dass am wenigsten DNA-Produkt bei den unstimulierten Zellen entsteht. PMT und LPS haben einen großen Einfluss auf das DNA-Produkt, auch das untersuchte Fimbrienprotein hat einen Einfluss, jedoch einen kleineren.

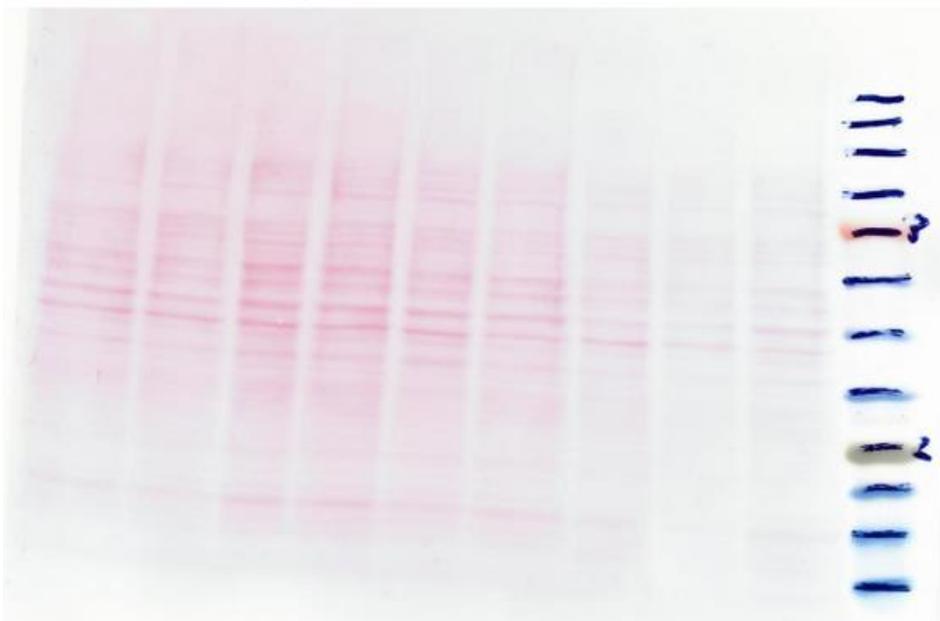
Die Ergebnisse des ELISA zeigten sich wie folgt:

<>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,083	0,255	0,247	0,109	0,336	0,231	0,288	0,313	0,331	0,005	0,003	0,004
B	0,099	0,362	0,329	0,123	0,315	0,252	0,303	0,334	0,31	0,004	0,004	0,004
C	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003
D	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,002	0,003	0,002	0,002	0,003
E	0,003	0,003	0,004	0,002	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003	0,002	0,001	0,002
F	0,002	0,003	0,003	0,003	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003
G	0,067	0,043	0,03	0,02	0,035	0,028	0,049	0,032	0,025	0,006	0,053	0,051
H	0,107	0,064	0,059	0,048	0,051	0,049	0,065	0,068	0,064	0,005	0,048	0,066

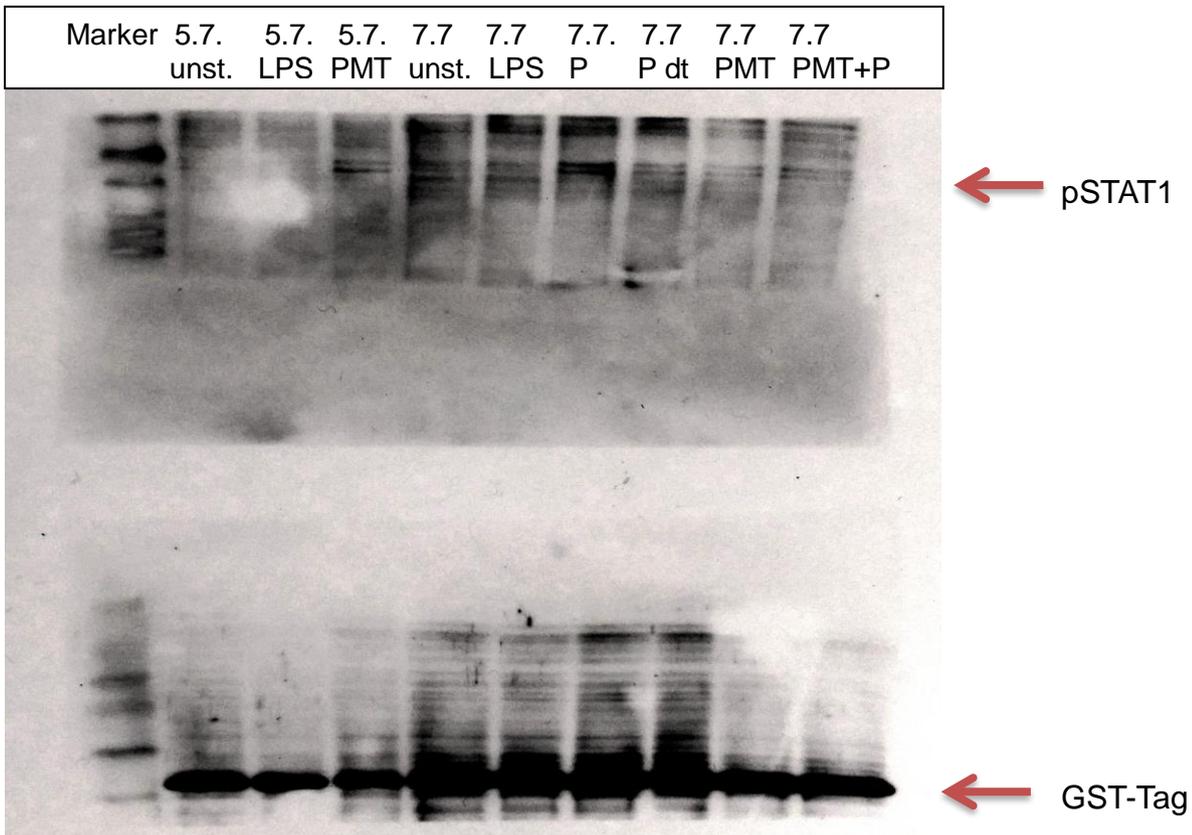


Der Western Blot zeigt folgendes Bild:

7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	5.7	5.7	5.7
P	PMT	P	P	LPS	unst.	PMT	LPS	unst.
+PMT		ΔT						



Angefärbte Membran nach dem Blotten. Die grüne Markierung zeigt den 25 kDa Marker, die rote den 80 kDa Marker.



In der Dunkelkammer entstandenes Bild der Fluoreszenz der Zweitantikörper. Dabei wurde pSTAT1 nachgewiesen, ein Transkriptionsfaktor, der bei Infektionen angeschaltet wird und hilft Interferone zu produzieren.

4.2 Mutation des PMT-Plasmids

4.2.1 DNA-Isolierung

Der Erfolg der DNA-Isolierung zeigte sich anhand der Nanodrop-Ergebnisse zur Messung der DNA-Konzentration. Dabei war jedoch erst der dritte Versuch erfolgreich. Versuch 1 und 2 finden sich im Anhang auf Seite 32.

Versuch 3:

	User	Default					07.07.2017 11:
	Sample ID	ng/uL	A260	<u>260</u> 230	<u>260</u> 280	Const.	
1		247,	4,949	1,38	1,77	50	
2		179,	3,594	1,19	1,74	50	
3		355,	7,114	1,41	1,76	50	
4		110,	2,203	2,12	1,83	50	
5		340,	6,807	1,79	1,81	50	
6		142,	2,854	1,41	1,76	50	
7		307,	6,158	1,72	1,80	50	
8		361,	7,235	1,70	1,81	50	
9		329,	6,588	1,54	1,78	50	
10		371,	7,427	1,62	1,79	50	

4.2.2 Sequenzierung

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden zwei Tage nach dem Einschicken der DNA an das Labor geschickt. Dabei wurde jede Base der Plasmid-DNA aufgeschlüsselt, sodass sowohl die gewollte Mutation als auch Spontanmutationen sichtbar wurden. Nur die Probe 10 enthielt die gewollte Mutation an der richtigen Stelle der DNA.

5 Diskussion

Das Coomassie-Gel gibt Aufschluss darüber, dass die Methode der Lyse des untersuchten Fimbrienproteins aus den Bakterien nicht sehr erfolgreich ist. Das Protein befindet sich maßgeblich noch im Pellet, d.h. in den Bakterienzellen und nicht im Überstand. Da allerdings mit dem Überstand weitergearbeitet wurde, ist die Konzentration an Fimbrienprotein, welches gewonnen werden konnte, schon an dieser Stelle sehr gering. Anhand der Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop ist zu sehen, dass auch die Aufreinigung des Fimbrienproteins über die GST-Säule schwierig ist. Die Abspaltung des GST vom Fimbrienprotein mithilfe von Thrombin ist nicht gelungen, sodass bei der Nanodrop-Messung wenig Proteine in den Proben gefunden wurden, die nur das untersuchte Fimbrienprotein enthalten sollten. Mehr Proteine wurden in den Proben der Säulenreinigung gefunden, bei der theoretisch nur GST abgespalten werden sollte. Es liegt also die Vermutung nahe, dass die Thrombinspaltung nicht erfolgreich war und das Fimbrienprotein noch am GST-Tag hängt. Basierend auf dieser Vermutung wurden die Zellen mit den Proben stimuliert, in denen der GST-Tag noch am Fimbrienprotein gebunden war. Der GST-Tag ist jedoch um ein Vielfaches größer als das Molekül des untersuchten Proteins und kann somit eine Auswirkung auf die Reaktion der Zellen bei der Stimulierung haben. Eine reine Stimulierung mit reinem GST als Kontrolle war jedoch nicht möglich gewesen, da die Aufreinigung des GST problematisch ist und der Zeitraum des Praktikums dieses Verfahren nicht zuließ.

Eindeutig zu erkennen ist eine stimulierende Wirkung aller Substanzen außer des hitzeinaktivierten Fimbrienproteins auf die Makrophagen. Diese lässt sich einerseits anhand der Verformung der Zellen erkennen, andererseits auch anhand der Untersuchungen mit RT-PCR, ELISA und Western Blot. Dabei konnten die Veränderungen des Cytoskeletts anhand des Nachweises der Proteine β -Aktin und Pho-Stat1 mit dem Western Blot nachgewiesen werden. Jedoch sind anhand der ELISA-Ergebnisse auch Pipettierfehler zu sehen, die die Ergebnisse verfälschen.

Insgesamt kann man sicher sagen, dass das Fimbrienprotein eine Wirkung auf das Cytoskelett der RAW-Zellen hat und damit pathogene Eigenschaften besitzt. Durch die Veränderung des Cytoskeletts können die RAW-Zellen beispielsweise ihre mit der Immunabwehr verbundene Aufgabe der Phagozytose von Fremdkörpern nicht mehr ausführen.

Für die DNA-Isolierung aus den transformierten Bakterien mit der mutierten Gensequenz wurden mehrere Anläufe benötigt, da sich die DNA-Konzentration durch Nanodrop-Messungen bei den ersten zwei Versuchen als zu gering herausstellte. Zuerst wurde der Fehler in einem alten DNA-Isolierungs-Kit vermutet, beim zweiten Versuch wurde daher ein neues benutzt. Die DNA-Konzentration stieg daraufhin, jedoch immer noch nicht in den gewünschten Bereich. Im dritten Versuch wurde die Transformation wiederholt und neuere Agaroseplatten verwendet. In diesem Versuch war die gewünschte Konzentration erreicht und die DNA konnte zur Sequenzierung eingeschickt werden. Nur eine der 10 eingeschickten Proben enthielt die Mutation an der richtigen Stelle.

Die DNA, die in dieser Probe enthalten ist, kann nun wiederum in *E. coli*-Bakterien transformiert werden. Diese Bakterien dienen der Arbeitsgruppe im Anschluss als Negativkontrolle bei Experimenten mit *E. coli*-Bakterien, welche so verändert wurden, dass sie PMT produzieren können.

6 Fazit

Während des Praktikums am Institut für Hygiene in Heidelberg habe ich einen umfassenden Einblick in die Arbeit eines Wissenschaftlers erhalten. Dabei habe ich Vor- und Nachteile kennen gelernt. Die Forschung ist ein weites, spannendes Feld, in dem es viel zu entdecken gibt. Jedoch kann die Arbeit auch frustrierend sein, da Experimente in den meisten Fällen nicht so klappen, wie sie sollen. „Troubleshooting“, die Suche nach dem Problem, ist nach fast jedem Experiment notwendig. Dafür ist die Freude über ein gelungenes Experiment umso größer.

Das Praktikum hat mir gezeigt, dass selbst die kleinsten Unaufmerksamkeiten beim Pipettieren zu verfälschten Ergebnissen führen können und so die Arbeit von fünf Stunden zerstört wird. Manchmal liegt der Fehler auch in einem Faktor, für den man nichts kann, z.B. an einer zu alten Agaroseplatte. Unabdingbar sind in der Forschung also Geduld und Genauigkeit.

Obwohl ich den durch das Praktikum erlangten Einblick unglaublich interessant und spannend fand, kann ich mir jedoch nicht vorstellen, in der Forschung zu arbeiten. Für das wissenschaftliche Arbeiten im Labor fehlt es mir an der Geduld, dasselbe Experiment mehrmals hintereinander durchführen zu müssen und trotzdem nicht das gewünschte Ergebnis zu erhalten.

Jedoch hat mir auch diese Erkenntnis weitergeholfen und ich habe in der Zeit am Hygieneinstitut sehr viel gelernt. Nicht nur, dass ich das erste Mal in einem Labor arbeiten durfte, auch die Umsetzung von in der Schule theoretisch gelernten Methoden und Verfahren war für mich ein besonderes Erlebnis.

Für die wunderbare Zeit in Heidelberg möchte ich mich bei allen Mitarbeitern im Hygieneinstitut der Universität Heidelberg bedanken, insbesondere bei der Arbeitsgruppe Kubatzky. Ein besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Katharina Hieke-Kubatzky, die meine Ansprechpartnerin während des Praktikums war und mir immer weiterhelfen konnte.

Außerdem möchte ich dem Förderverein der Internationalen Biologieolympiade danken, der das Praktikum organisiert und möglich gemacht hat.

7 Literaturverzeichnis

[Stand: 21.09.17]

<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/elisa/20874>

https://de.wikipedia.org/wiki/Enzyme-linked_Immunsorbent_Assay

https://de.wikipedia.org/wiki/Western_Blot

<http://www.antikoerper-online.de/resources/17/1224/western-blot-hintergrundinformationen/>

https://de.wikipedia.org/wiki/Real_Time_Quantitative_PCR

<https://de.wikipedia.org/wiki/Pilus>

<https://www.neb.com/products/e0554-q5-site-directed-mutagenesis-kit>

<http://nebasechanger.neb.com/>

https://de.wikipedia.org/wiki/pasteurella_multocida

Katharina F. Kubatzky: *Pasteurella Multocida and Immune Cells*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Katharina F. Kubatzky, Bianca Kloos, Dagmar Hildebrand: *Signaling Cascades of Pasteurella multocida Toxin in Immune Evasion*

8 Anhang

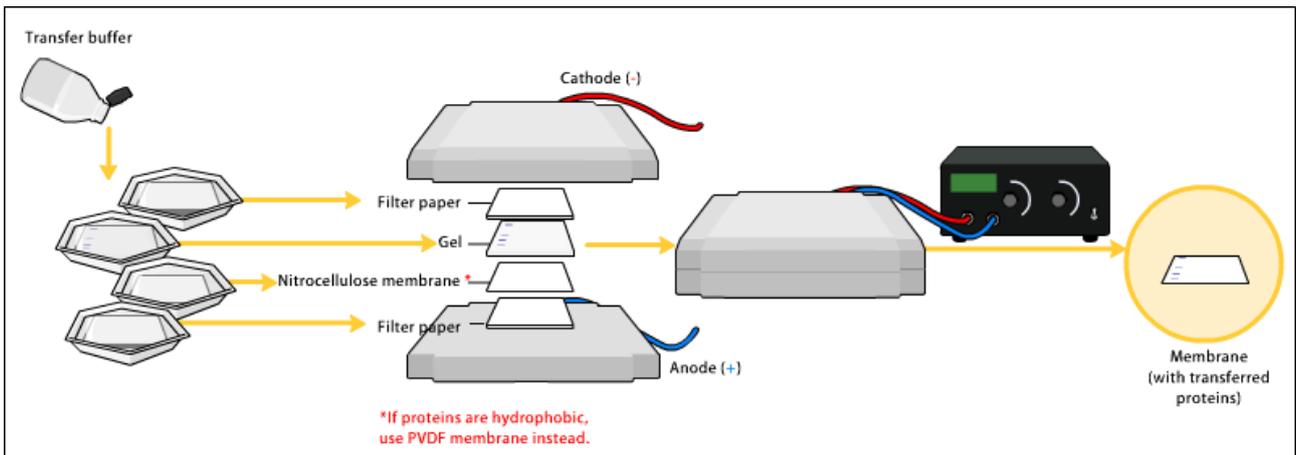


Abbildung 1: Skizze Westen Blot semi-dry

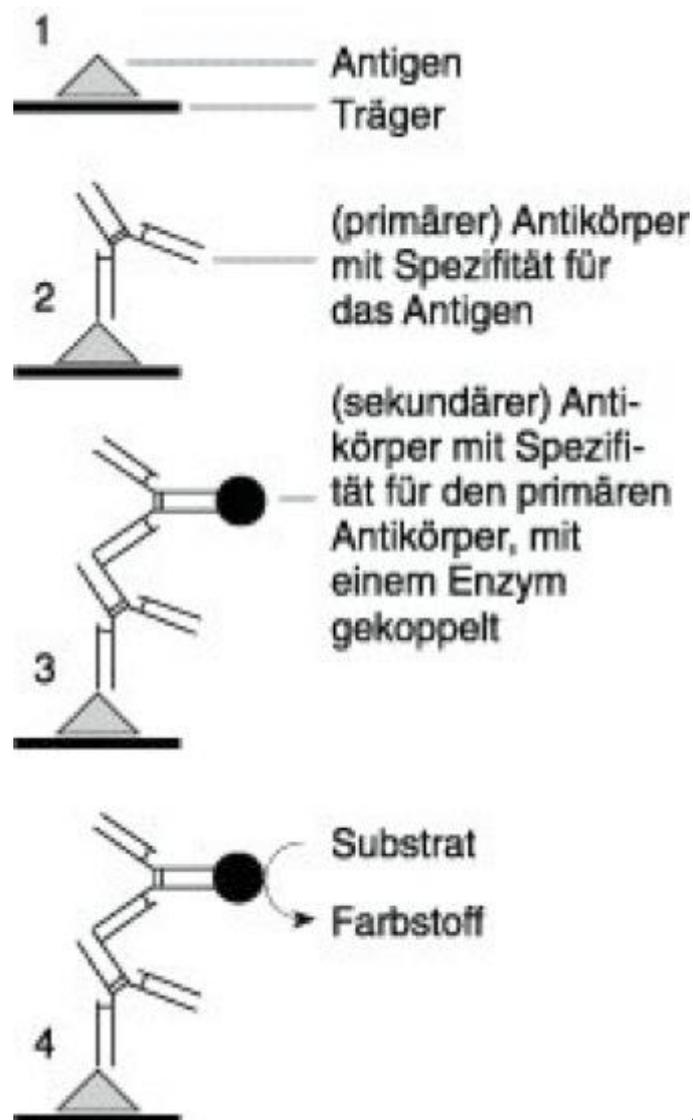


Abbildung 2: Skizze ELISA

```

c tgg aac gaa gga agt aat agc cga tta ctg cct ggt ttg tta cgt gaa tgg caa agc aag ggg atg tta agt aag tgt cgt atc ata gaa aat agc ctt < 2400
W N E G S N S R L L P G L L R E S Q S K G M L S K C R I I E N S L
2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390

tat att gga cat agc tat gaa gaa atg ttt tac agc att tct cca tat tca aac cag gtt gga ggg cct tat gaa tta tat cct ttc act ttt ttc agt a < 2500
Y I G H S Y E E M F Y S I S P Y S N Q V G G P Y E L Y P F T F F S M
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490

tg ctt caa gaa gta caa ggt gat tta gga ttt gag cag gcc ttt gcc aca cgt aac ttt ttc aat act ctt gtt tct gat cga cta tcc tta atg gaa aa < 2600
L Q E V Q G D L G F E Q A F A T R N F F N T L V S D R L S L M E N
2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590

t acg atg tta ctt aca gaa agt ttt gat tat aca cct tgg gat gct att tat gga gat att aat tat gat gaa caa ttt gct gca atg tct att aat gaa < 2700
T M L L T E S F D Y T P W D A I Y G D I N Y D E Q F A A M S I N E
2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690

cgc ata gaa aaa tgt atg aat acc tat aga ggt gtg gca ttc caa aac tct tca aaa agt att gac ttt ttc cta aat aat cta acc aca ttc att gat a < 2800
R I E K C M N T Y R G V A F Q N S S K S I D F F L N N L T T F I D N
2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790

at gga cta acc gaa att gct ata tct gat tta ccg tat gat att gtg caa caa gaa atc tct caa ttc tta caa gga agt aat gaa tgg aaa aca ctt ga < 2900
G L T E I A I S D L P Y D I V Q Q E I S Q F L Q G S N E W K T L D
2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890

t gcc atg tta ttt aac tta gat aaa gga gat att aat ggt gct ttc aga aag ctt ctg caa tca gca aaa gat aat aat ata aaa ttt aga gct ata ggg < 3000
A M L F N L D K G D I N G A F R K L L Q S A K D N N I K F R A I G
2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990

cat tca gat aat tct gtt ccg cca ttt aat aac cct tat aag tct tta tat tat aaa gga aat ata ata gct gaa gca att gaa aaa cta gat cga gaa g < 3100
H S D N S V P P F N N P Y K S L Y Y K G N I I A E A I E K L D R E G
3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090

gt caa aaa ttt gtt gta ttt gct gat agt tct ctg ctc aac agc acg cct ggg aca ggt cgt cct atg cca gga cta gtt caa tat tta aaa ata cca gc < 3200
Q K F V V F A D S S L L N S T P G T G R P M P G L V Q Y L K I P A
3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190

a act gta gta gat agc gat ggt gca tgg caa ttt ctt cca gat gta gct tca agc aga gtt cct att gaa gtt aca gag tta gaa aat tgg caa gtc tta < 3300
T V V D S D G A W Q F L P D V A S S R V P I E V T E L E N W Q V L
3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290

act cct cca caa ggt aag att ctt gga tta aag caa ttt aag tta acg gca ggt ttt cca aca gaa caa agt cgc tta cct ctt tta gag aat tgg gtt t < 3400
T P P Q G K I L G L K Q F K L T A G F P T E Q S R L P L L E N S V S
3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390

ct gaa gat tta agg gaa gaa tta atg caa aag att gat gca ata aaa aat gat gtg aaa atg aat agt tta gtg tgt atg gaa gct agc tct ttt gat tc < 3500
E D L R E E L M Q K I D A I K N D V R M N S L V C H E A G S
3495
c
s => tgt -> agt

```

Abbildung 3: Ausschnitt aus der Basensequenz des Plasmids



Abbildung 4: Aufbau der GST-Säule

Rechnung zur Verdünnung der Proben auf $OD_{600}=0,15$

Prä-Induktionsprobe Nr. 1

$$OD_{600}=0,595$$

$$0,595=1 \text{ ml}$$

$$0,15 \rightarrow 1 \text{ ml} * 0,15 / 0,595 = 0,2521$$

$$=252 \mu\text{l}$$

-->1:10 Verdünnung:

$$\rightarrow 25,2 \mu\text{l}$$

After-Induktionsprobe Nr. 1

$$OD_{600}=0,849$$

$$0,849=1 \text{ ml}$$

$$0,15 \rightarrow 1 \text{ ml} * 0,15 / 0,849 = 0,1767$$

$$=176,7 \mu\text{l}$$

-->1:10 Verdünnung:

$$\rightarrow 17,7 \mu\text{l}$$

Prä-Induktionsprobe Nr. 2

$$OD_{600}=0,594$$

$$0,594=1 \text{ ml}$$

$$0,15 \rightarrow 1 \text{ ml} * 0,15 / 0,594 = 0,2525$$

$$=253 \mu\text{l}$$

-->1:10 Verdünnung:

$$\rightarrow 25,3 \mu\text{l}$$

After-Induktionsprobe Nr. 2

$$OD_{600}=0,849$$

$$0,849=1 \text{ ml}$$

$$0,15 \rightarrow 1 \text{ ml} * 0,15 / 0,849 = 0,1767$$

$$=176,7 \mu\text{l}$$

-->1:10 Verdünnung:

$$\rightarrow 17,7 \mu\text{l}$$



BCA Assay to determine protein concentration

1. Prepare mixture of BCA reagents (A+B at 1:50) → use 100 µl per well
(10 standard samples + # samples + 4 blanks +2) x 2 x 0.1 ml
2. add 10 µl sample to each well (duplicates, diluted 1:10 or 1:20 with PBS)
3. add 10 µl of each standard sample (duplicates). Standards: 2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 [µg/ml]
4. add 10 µl of PBS in 4 wells as blank
5. add 100 µl of BCA reagent mix to each well
6. incubate plate at 37°C for 30 minutes
7. measure assay at ELISA reader

Program → Tecan → Magellan5 → start measurement → piecp_Gabi → start → Yes → show data → analyse data → paste in excel (2 table: OD and conc. + graph) → concentration curve of standards → paste into excel → save on O:

Example plate:

Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	control						
Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	control						
Standard 2	Standard 1.5	Standard 1	Standard 750	Standard 500	Standard 250	Standard 125	Standard 62.5	Standard 31,25	Standard 15,6	B	B
Standard 2	Standard 1.5	Standard 1	Standard 750	Standard 500	Standard 250	Standard 125	Standard 62.5	Standard 31,25	Standard 15,6	B	B



ELISA protocol

1. Mix capture antibody and coating buffer (pH 9,5 -> AG Dalpke); 12,5 µl antibody + 2487,5 µl coating buffer for an entire plate, i.e. 25 µl/well for a half-area 96 well ELISA plate

Calculate for all probes in duplicates + 24 additional wells for the standard curve and blank

2. Seal plate and incubate overnight at 4°C
3. Wash plate on Wellwash AC (program: Hawell x4), press rinse after each use
4. Remove residual coating buffer and pat dry on paper (all subsequent washes should be performed like this)
5. Block non-specific binding sites with 100 µl/well of blocking buffer (-> AG Dalpke), seal the plate and incubate for 45 min at RT on an orbital shaker at 200 rpm
6. Wash
7. Prepare appropriate sample dilutions (if necessary) and standard dilutions, 50 µl/well
 - Original standard stock solutions are 500 pg/ml
 - Add 50 µl of stock solution to the first and second wells in the standard rows, add 50 µl of blocking buffer to wells 2-12 in the standard rows
 - Mix the second well containing stock solution and blocking buffer, transfer 50 µl from the second to the third well, mix and transfer 50 µl to the next well; repeat this procedure for all subsequent wells, but leave the last wells untouched (blanks) and discard the 50 µl taken from well 11 -> creation of a standard curve with 1:2 row dilutions
 - If necessary, samples should be diluted in blocking buffer
8. Seal the plate and incubate standards and samples for 2 h at RT on the orbital shaker
9. Wash
10. Mix detection antibody, avidin-HRP and blocking buffer; 12,5 µl antibody, 2,5 µl avidin-HRP and 2485 µl blocking buffer for a full plate, with 25 µl/well
11. Incubate for 1 h at RT on the orbital shaker
12. Wash
13. Mix TMB substrates A and B (fridge) in a 1:1 ratio, add 25 µl/well
14. Incubate at RT for 15-30 min **in the dark (!!!)** -> blue coloration should appear
15. Stop the reaction with 1 M H₂SO₄ (kept in the chemical cabinet), 25 µl/well -> should turn yellow
16. Read absorbance at 450 nm (AG Dalpke, TECAN SUNRISE, program Magellan5)

Quick-Start Steps

- 1 Input starting sequence
- 2 Set mutagenesis type
- 3 Set mutagenesis region
- 4 Set desired seq [optional]
- 5 View primers

NEW SEQUENCE

CLEAR HELP

GET PROTOCOL

GET RESULT SEQ

PE 139
PP 440

Input

Click and drag to set mutagenesis region

```
>InputSeq 3959 bp
ATGAAACAAAAACATTTTTTAACTCAGATTTTACTGTAAAAGGAAAAAG
TGCCGATGAAATTTTAGAAGATTGTACTGATCATCTGACAAGCAAT
TAAACAATGTAAATGGAAAGAGTTTTFATTAATCGTTTGGTCAGATG
ATGCTAGATACTCCTAATCCGAGAAAGATTGTAGAAAAAATTATTAATGA
AGGGCTTGA AAAACAAGGCTGAAAAATATAGATCCTGAAAACACATATT
TCACCATTTTTTCATCTTCTGACAGCTCCGATGGGAACGTTTTTCATTAT
AACTCTTTATCAGAATCCTATCGAGTTACTGATGCCTGCCTAATGAATAT
TTTTGTGGAGCGTTATTTTGTGATGGGACTTGCTAAATAGCTTAGCCA
GTAATGGAATATATTCAGTAGAAAAGAAGGAGCTTATTATCCTGATCAT
GATTATGGTCCAGAATATAACCTGTTTGGGGACCAAACGAACAAATTTA
CCATTCTAGAGTGATTGCAGATATCCTTTATGCTCGCTCCGATGGGATG
AATTTAAAAAATCTTTCATGGAGTATTGGCAAAAATATGCTCAGCTTTAT
ACCGAAATGTTATCTGATACATTTCTTGCAATGGCTATTGACAAATATAC
ACGACAAACGCTTACTGATGAAGGCTTCTTATGGTTTGTAAACACATATT
ATGGCAATAAGGAAGAAGTTCAATAACTCTACTAGATATCTATGGATAC
CCTTCCACTGATATAATTTGTATAGAGCAAAAAGGGCTTCTACTCCTAA
```

Result

```
K * I V * C V W K L A L V I Q *
K M N S L V C M E A G S S D S V
E N E * F S V Y G S W L * * F S
GAAAATGAATAGTTTAGTGTGATGGAAGCTGGCTCtagtGATTGAGTAA
CTTTTACTTATCAATCACACATACCTTCGACCGAGATCACTAAGTCATT
```

InputSeq 3858 bp

Substitution Insertion Deletion

Find: 42 matches

Start and end positions included in substitution.

Start (5') End (3')

Desired Sequence

Common Peptide Tags

Protocol for Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit

Step I: Exponential Amplification (PCR)

1. Assemble the following reagents in a thin-walled PCR tube.

	25 µl RXN	FINAL CONC.
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12.5 µl	1X
10 µM Forward Primer	1.25 µl	0.5 µM
10 µM Reverse Primer	1.25 µl	0.5 µM
Template DNA (1–25 ng/µl)	1 µl	1-25 ng
Nuclease-free water	9.0 µl	

2. Mix reagents completely, then transfer to a thermocycler.

3. Perform the following cycling conditions:

Thermocycling Conditions for a Routine PCR:

STEP	TEMP	TIME
Initial Denaturation	98°C	30 seconds
	98°C	10 seconds
25 Cycles	50–72°C*	10–30 seconds
	72°C	20–30 seconds/kb
Final Extension	72°C	2 minutes
Hold	4–10°C	

* For a Q5-optimized annealing temperature of mutagenic primers, please use NEBaseChanger™, the online NEB primer design software. For pre-designed, back-to-back primer sets, a $T_a = T_m + 3$ rule can be applied, but optimization may be necessary.

Step II: Kinase, Ligase & DpnI (KLD) Treatment

1. Assemble the following reagents:

	VOLUME	FINAL CONC.
PCR Product	1 µl	
2X KLD Reaction Buffer	5 µl	1X
10X KLD Enzyme Mix	1 µl	1X
Nuclease-free Water	3 µl	

2. Mix well by pipetting up and down and incubate at room temperature for 5 minutes.

Step III: Transformation

1. Thaw a tube of NEB 5-alpha Competent *E. coli* cells on ice.
2. Add 5 µl of the KLD mix from Step II to the tube of thawed cells. Carefully flick the tube 4-5 times to mix. Do not vortex.
3. Place the mixture on ice for 30 minutes.
4. Heat shock at 42°C for 30 seconds.
5. Place on ice for 5 minutes.
6. Pipette 950 µl of room temperature SOC into the mixture.
7. Incubate at 37°C for 60 minutes with shaking (250 rpm).
8. Mix the cells thoroughly by flicking the tube and inverting, then spread 50-100 µl onto a selection plate and incubate overnight at 37°C. It may be necessary (particularly for simple substitution and deletion experiments) to make a 10- to 40-fold dilution of the transformation mix in SOC prior to plating, to avoid a lawn of colonies

Rohdaten der RT-PCR

SDS 2.2.1	AQ Results	1			
Filename	TNF 13-07-2017				
PlateID					
Assay Type	Absolute Quantification				
Run DateTime	7/13/17 11:32				
Operator					
ThermalCycleParams					
Sample Information					
Well	Sample Name	Detector Name	Reporter	Task	Ct
1	A1	SybrGr	SYBR	NTC	Undetermined
2	A2	SybrGr	SYBR	Unknown	19,280373
3	A3	SybrGr	SYBR	Unknown	18,990532
4	A4	SybrGr	SYBR	Unknown	17,242786
5	A5	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
6	A6	SybrGr	SYBR	Unknown	17,372831
7	A7	SybrGr	SYBR	Unknown	15,90745
8	A8	SybrGr	SYBR	Unknown	18,167545
9	A9	SybrGr	SYBR	Unknown	17,115038
10	A10	SybrGr	SYBR	Unknown	17,347948
11	A11	SybrGr	SYBR	Unknown	16,41771
12	A12	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
13	B1	SybrGr	SYBR	NTC	33,951775
14	B2	SybrGr	SYBR	Unknown	19,72123
15	B3	SybrGr	SYBR	Unknown	19,474918
16	B4	SybrGr	SYBR	Unknown	17,32043
17	B5	SybrGr	SYBR	Unknown	34,250175
18	B6	SybrGr	SYBR	Unknown	17,93976
19	B7	SybrGr	SYBR	Unknown	16,014744
20	B8	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
21	B9	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
22	B10	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
23	B11	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
24	B12	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
73	G1	SybrGr	SYBR	NTC	Undetermined
74	G2	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
75	G3	SybrGr	SYBR	Unknown	20,872194
76	G4	SybrGr	SYBR	Unknown	18,877441
77	G5	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
78	G6	SybrGr	SYBR	Unknown	16,88854
79	G7	SybrGr	SYBR	Unknown	18,1386
80	G8	SybrGr	SYBR	Unknown	17,422075
81	G9	SybrGr	SYBR	Unknown	17,560856
82	G10	SybrGr	SYBR	Unknown	18,41877
83	G11	SybrGr	SYBR	Unknown	17,586258
84	G12	SybrGr	SYBR	Unknown	24,654087
85	H1	SybrGr	SYBR	NTC	26,553602
86	H2	SybrGr	SYBR	Unknown	17,85382
87	H3	SybrGr	SYBR	Unknown	18,696545
88	H4	SybrGr	SYBR	Unknown	18,69432
89	H5	SybrGr	SYBR	Unknown	30,43694
90	H6	SybrGr	SYBR	Unknown	16,704157
91	H7	SybrGr	SYBR	Unknown	18,085485
92	H8	SybrGr	SYBR	Unknown	17,562664
93	H9	SybrGr	SYBR	Unknown	17,693642
94	H10	SybrGr	SYBR	Unknown	18,569626
95	H11	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined
96	H12	SybrGr	SYBR	Unknown	Undetermined

Plasmid Isolierung

Versuch 1

User		Default		04.07.2017 12:34		
Sample ID	ng/uL	A260	<u>260</u> 230	<u>260</u> 280	Const.	
1	0,73	0,015	0,06	1,00	50	
2	1,40	0,028	0,09	2,49	50	
3	1,69	0,034	0,12	0,97	50	
4	0,84	0,017	0,07	1,19	50	
5	23,	0,474	0,85	1,84	50	
6	1,94	0,039	0,16	2,02	50	
7	1,32	0,026	0,09	1,88	50	
8	15,	0,314	0,85	1,81	50	
9	1,54	0,031	0,13	1,66	50	
10	1,00	0,020	0,08	0,63	50	

Versuch 2

User		Default		05.07.2017 13:03		
Sample ID	ng/uL	A260	<u>260</u> 230	<u>260</u> 280	Const.	
1	40,	0,817	2,10	2,01	50	
2	11,	0,221	1,56	2,23	50	
3	60,	1,205	2,02	1,85	50	
4	33,	0,679	0,91	1,85	50	
5	31,	0,631	0,81	1,70	50	

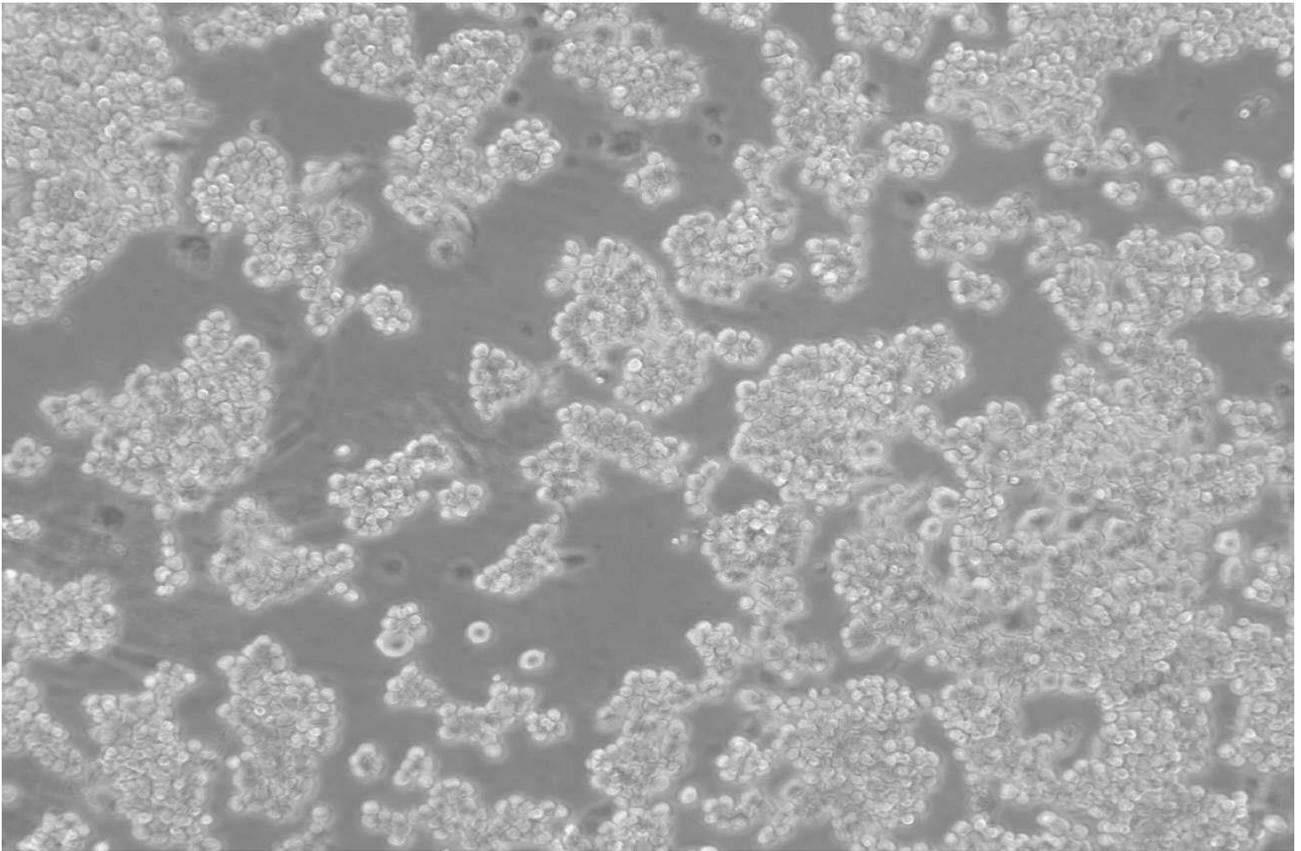


Abbildung 5: unstimulierte RAW-Zellen

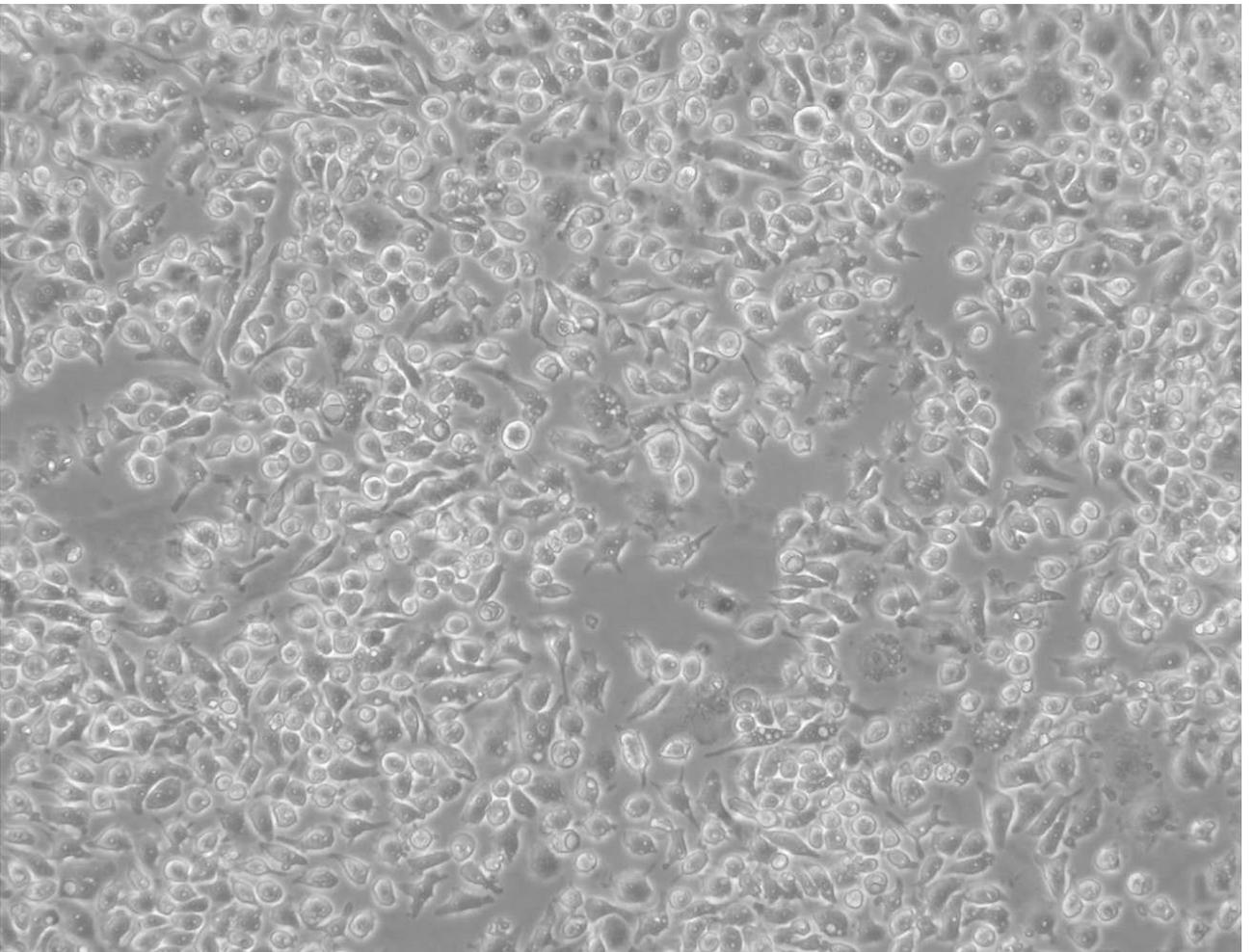


Abbildung 6: mit LPS stimulierte RAW-Zellen 33

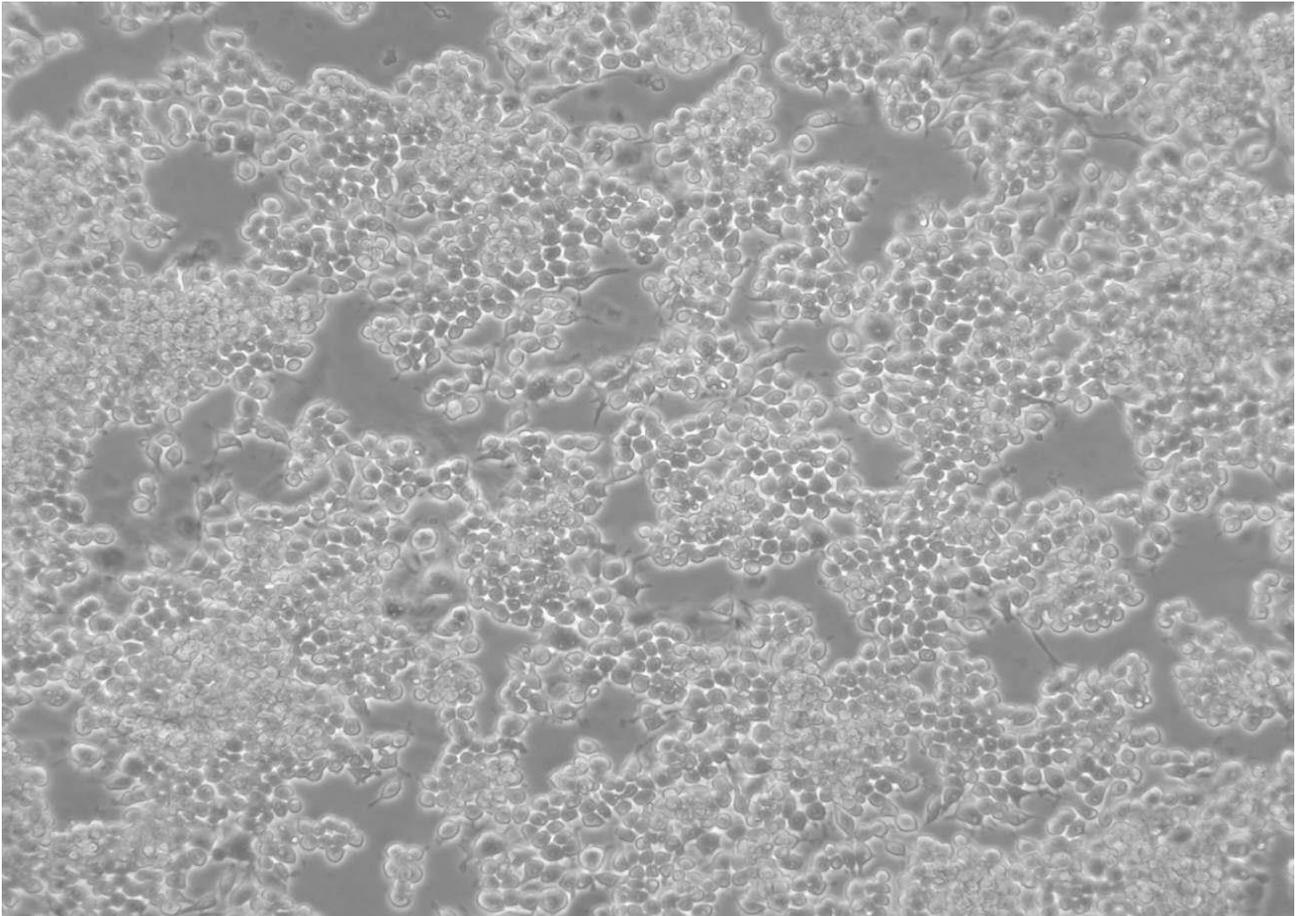


Abbildung 7: mit dem hitzeinaktivierten Fimbrienprotein stimulierte RAW-Zellen

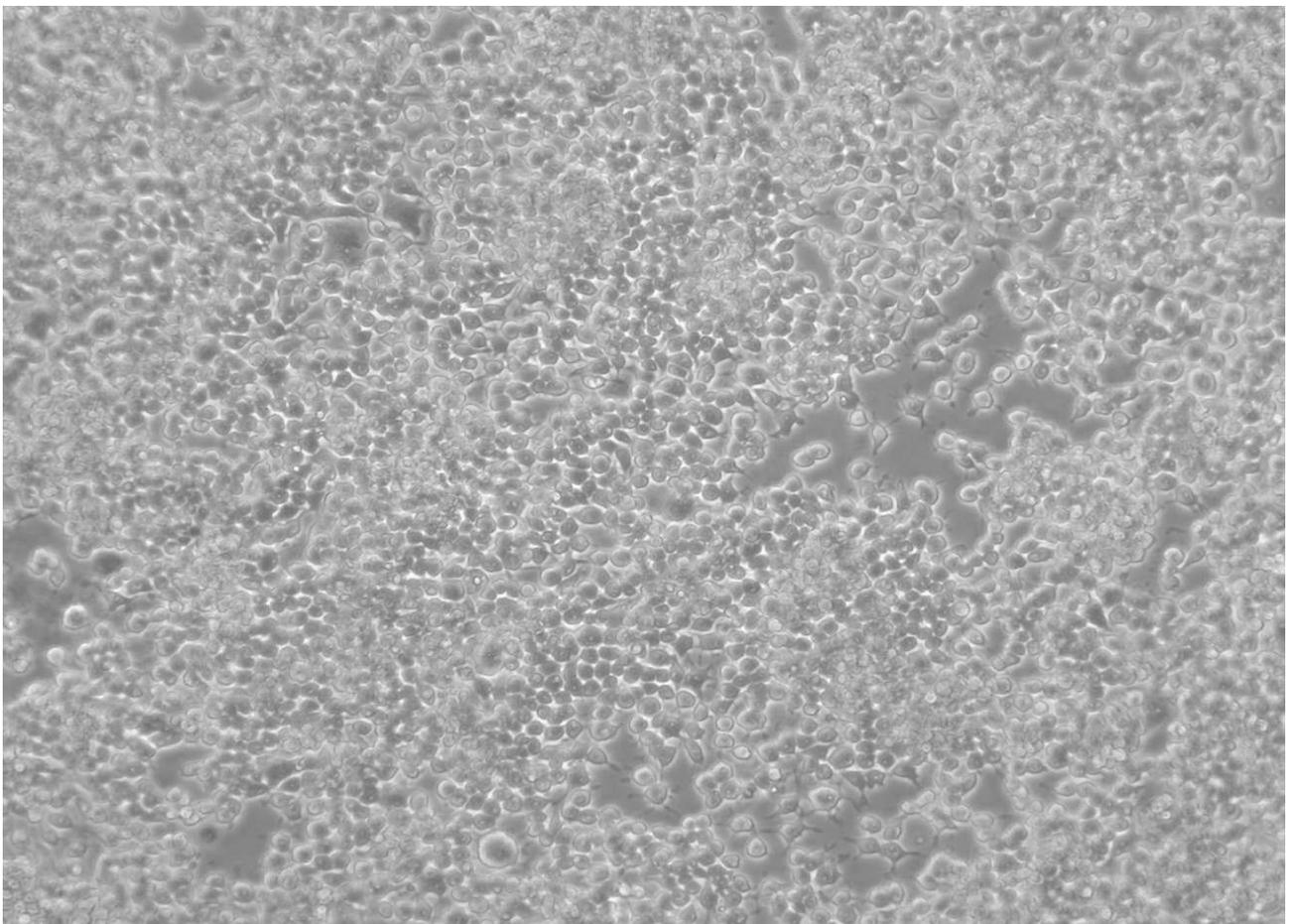


Abbildung 8: mit dem untersuchten Fimbrienprotein stimulierte RAW-Zellen

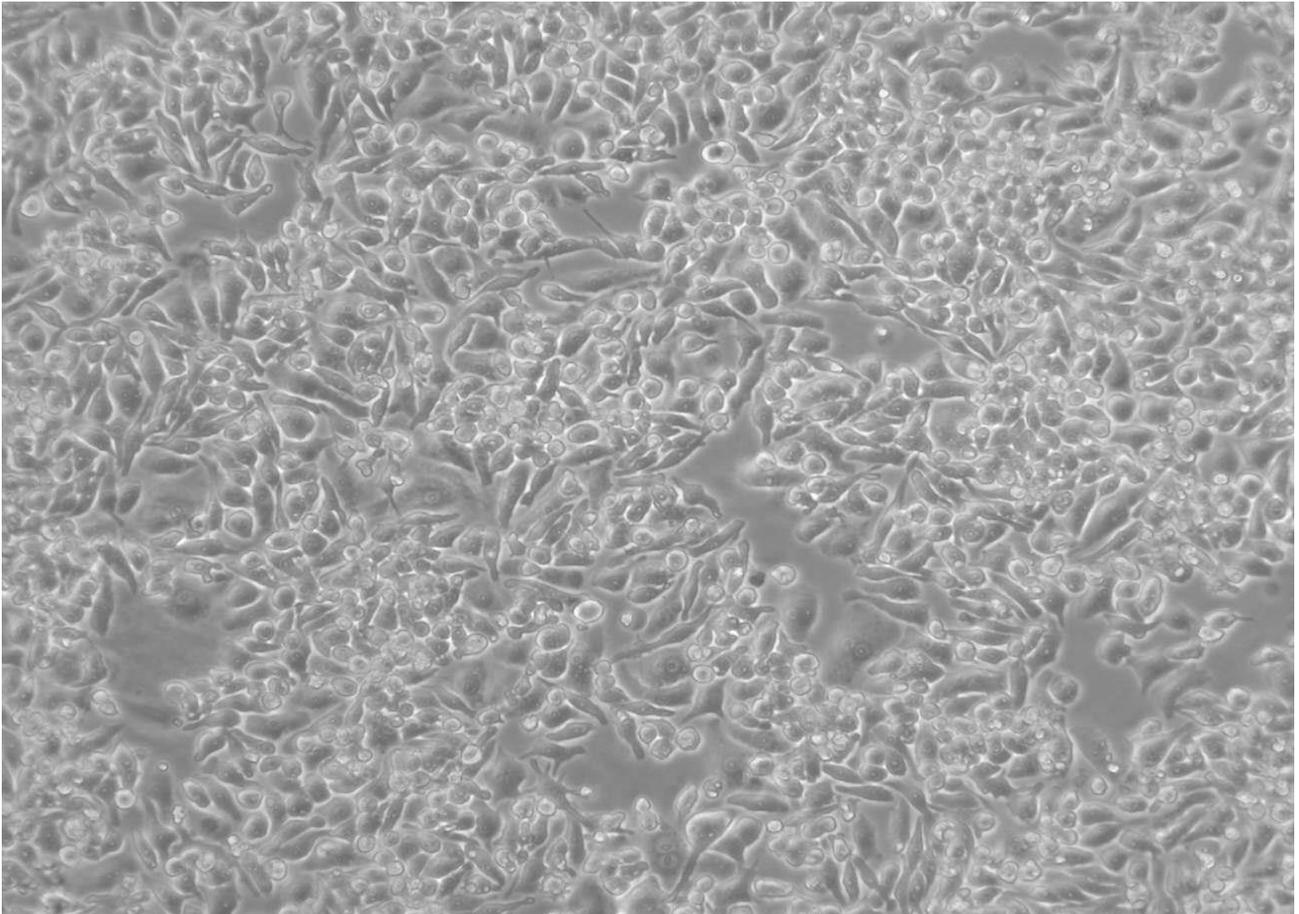


Abbildung 9: mit Fimbrienprotein und PMT stimulierte RAW-Zellen

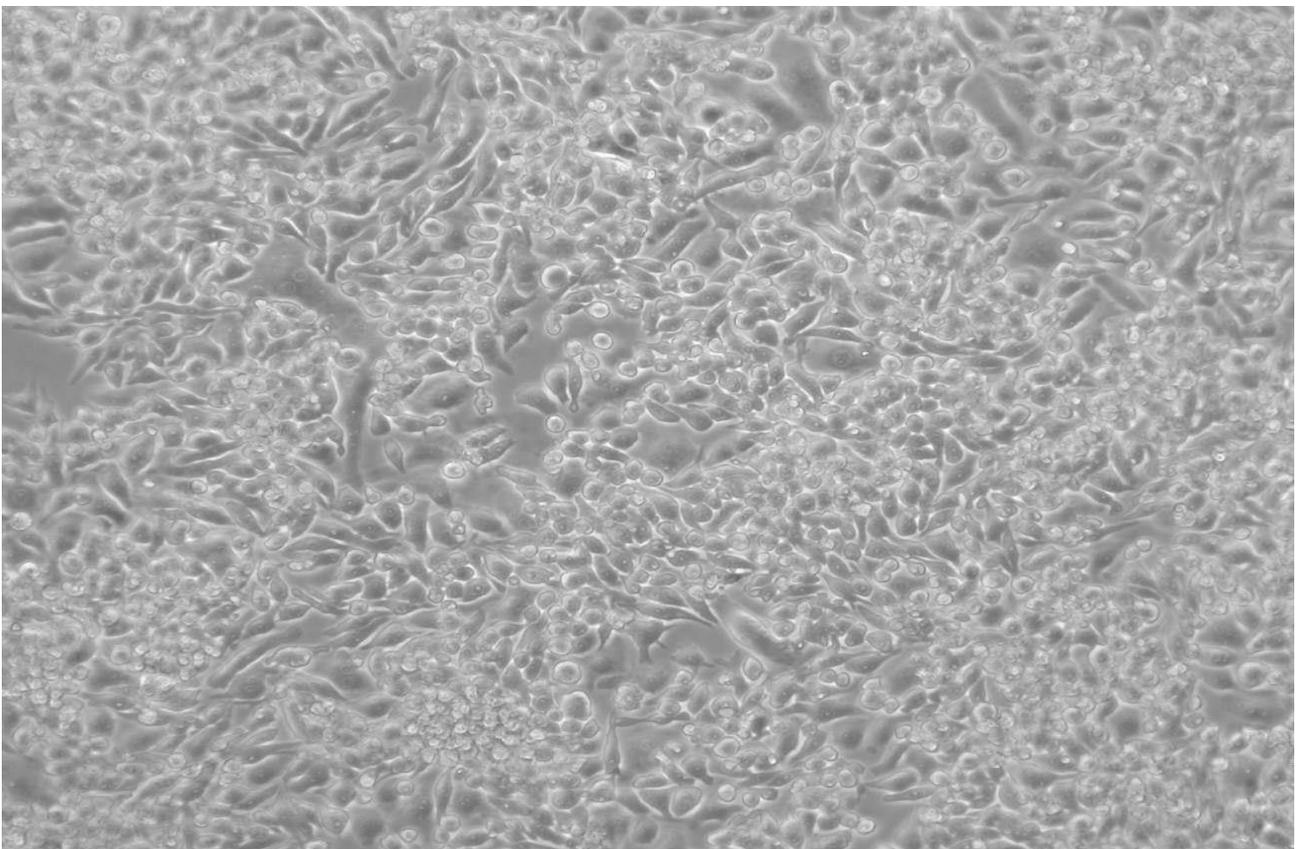


Abbildung 10: mit PMT stimulierte RAW-Zellen