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

Institut: Departement für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Ort: Heidelberg
Arbeitsgruppe: Katharina Kubatzky
Betreuer:Katharina Kubatzky
Thema: Das *Pasteurella multocida* Toxin und seine Effekte auf Osteoklasten

Zeitraum: 13.8.-7.9.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis 2
2. Einleitung 3
3. Projektinformationen 4
4. Methoden 8
5. Resultate 14
6. Diskussion 23
7. Fazit 24
8. Quellenverzeichnis 25

1. Abkürzungsverzeichnis

P. multocida: Pasteurella multocida
PMT: *Pasteurella multocida* Toxin
GDP: Guanosinediphosphat
GTP: Guanosinetriphosphat
Rho-GEF: Rho Guanine nucleotide exchange factor
PLC: Phospholipase C
WT: Wildtyp
hCD4: humanes CD4
RT: Raumtemperatur
rpm: rotations per minute
PBS: Phosphate buffered saline
BSA: Bovine serum albumin
TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase
TBST: Tris buffered saline with tween

2. Einleitung

Ich habe dieses Jahr meine Matura mit einem biologischen Schwerpunkt abgelegt, da mich dieses Fach immer schon fasziniert hat. Als ich dann im Rahmen der Biologie Olympiade die Möglichkeit dazu bekam, bewarb ich mich für ein Praktikum am Departement für medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Ruprecht-Karls Universität in Heidelberg, weil mich dieses Thema als angehender Medizinstudent besonders interessierte.

Ich hatte vor dem Antritt des Forschungspraktikums in Heidelberg im Rahmen meiner Maturaarbeit bereits die Möglichkeit gehabt, einige Wochen in einem biologischen Labor zu arbeiten. Da mich die Arbeit dort stark interessiert hatte, freute ich mich sehr die Arbeit in solch einem Labor noch vertiefter kennenzulernen.

Die Arbeitsgruppe von Katharina Kubatzky, in der ich das Praktikum absolvieren durfte, beschäftigt sich vor allem mit dem *Pateurella multocida* Bakterium und dem von ihm produziertem *Pasteurella Multicoda Toxin* (PMT). Dabei werden die Effekte des Toxins auf Immunzellen untersucht, wobei ich mich mit Osteoklasten beschäftigte. Die Idee bestand darin gewisse Signalkaskaden, welche durch PMT aktiviert werden, vereinzelt in unterschiedlichen Zelllinien ebenfalls zu aktivieren, um zu verstehen, warum Vorläufer Zellen in Anwesenheit von PMT zu Osteoklasten differenzieren, die kleiner sind und weniger Nuclei haben als normale Osteoklasten.

Meine Hauptaufgabe bestand darin, zwei genveränderte Versionen der Zellinie herzustellen. In die erste wurde eine Gensequenz für das G_q Protein eingefügt. In der zweiten war das G_q konstitutiv aktiviert. Bei der Linie, die das Wildtyp (WT) Protein exprimiert wurde die Sequenz aufgenommen und exprimiert, während bei der Linie mit dem konstitutiv aktivierten G_q, die Sequenz nur sehr schwach exprimiert wird. Ausserdem führte ich eine Reihe von Experimenten mit bereits hergestellten Zelllinien durch, welche konstitutiv aktiviertes RhoA, Rac1 und Rac2 enthielten. Dabei konnte der Effekt des PMT aber nicht repliziert werden.

3. Projektinformationen

Pasteurella multocida ist in Nutz und Haustieren eines der häufigsten symbiotisch vorkommenden Bakterien.[1] Es kann aber auch krankheitserregend werden. So verursacht es als primärer Krankeheitserreger hämorrhagische Septikämie, welches aus wirtschaftlicher Sicht eine der bedeutendsten durch Bakterien des *Pasteurella* Genus verursachten Infektionen ist.[2] *P. multocida* kann ausserdem als sekundärer Krankheitserreger atropische Rhinitis in Schweinen auslösen, die vor allem bei Infektion in jungen Jahren eine bleibende Verformung des Gesichtes nach sich ziehen kann, da die Nasenmuschel infiziert wird und verstärkter Osteoklastogenese ausgesetzt ist.[3] In Menschen kommen Infektionen nur selten nach Bissen von Haustieren vor und ziehen neben einer Entzündung keine schwerwiegenden Symptome nach sich[4].

Die pathogenen Eigenschaften von *P. multocida w*erden durch das vom Bakterium produzierten Pasteurella multocida Toxin (PMT) ausgelöst. Dieses Toxin aktiviert heterotrimere G Proteine, welche in der Zellulären Signalübermittlung eine wichtige Rolle spielen, und löst somit downstream eine Reihe von Reaktionen in der Zelle aus. Hetrotrimere G-Proteine bestehen aus einer alpha, einer beta und einer gamma Untereinheit Sie besitzen einen inaktivierten Zustand in dem sie Guasoninediphosphat (GDP) in der alpha Untereinheit gebunden haben und eine aktive Form in der das GDP durch Guasoninetriphosphat ausgetauscht wird.[5] PMT deaminiert eine der Aminosäuren in der alpha Untereinheit. Spezifisch wird Glutamin zu Glutamat. Dadurch kann das gebundene GTP nicht mehr hydrolisiert werden, wodurch das heterotrimere G Protein durchgehend aktiv bleibt, es ist konstitutiv aktiviert.[6]

---

[1] Sara L. Cross (11.6.17) **Pasteurella Multocida Infection.** [https://emedicine.medscape.com/article/224920-overview| zuletzt besucht: 11.9.18

[2] Carter GR und De Alwis MCL (1989) **Haemorrhagic septicaema.**

[3] Dagmar Hildebrand, Klaus Heeg, Katharina F. Kubatzky (2010) ***Pasteurella multocida* Toxin-Stimulated Osteoclast Differentiation Is B Cell Dependent.**

[4] Richard B. Rimler (1998) **Encyclopedia of Immunology.** 2. Edition

[5] H.C. Korswagen, R.H.A. Pasterk (2001) **Heterotrimetric G Proteins.** in Enzyclopeida of Genetics

[6] Joachim H. C. Orth, Klaus Aktories (2010) **Pasteurella nultocida Toxin Activates Various Heterotrimetric G Proteins by Deamidation.** [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202810/] zuletzt besucht: 12.9.18

Für diesen Bericht sind vor allem zwei heterotrimere G Proteine wichtig, G_{13} und G_q. Durch die Aktivierung von G_{13} werden sogenannte *Rho guanine nucleotide exchange factors* (Rho- GEFs) stimuliert. Diese aktivieren dann wiederum eine Reihe von GTPasen der Rho Familie, wobei die bestbekannten und die in diesem Bericht behandelten RhoA, Rac1 und Rac2 sind.[7] Diese GTPasen sind für das Zytoskelett und vor allem für die Kontrolle von Aktin Filamenten von grosser Bedeutung.[8] G_q trägt ebenfalls zur Aktivierung der Rho-GEFs bei, stimuliert daneben aber auch den JAK-STAT Signalweg.[9] Dieser beeinflusst die Gen expression und kann zum Beispiel Makrophagen aktivieren.[10] Ausserdem wird über G_q Phospholipase C-β (PLCβ) aktiviert.[11] Diese spaltet ein Phospholipid in der Membran, was eine Ausschüttung von Ca^+ Ionen zur Folge hat.[12]

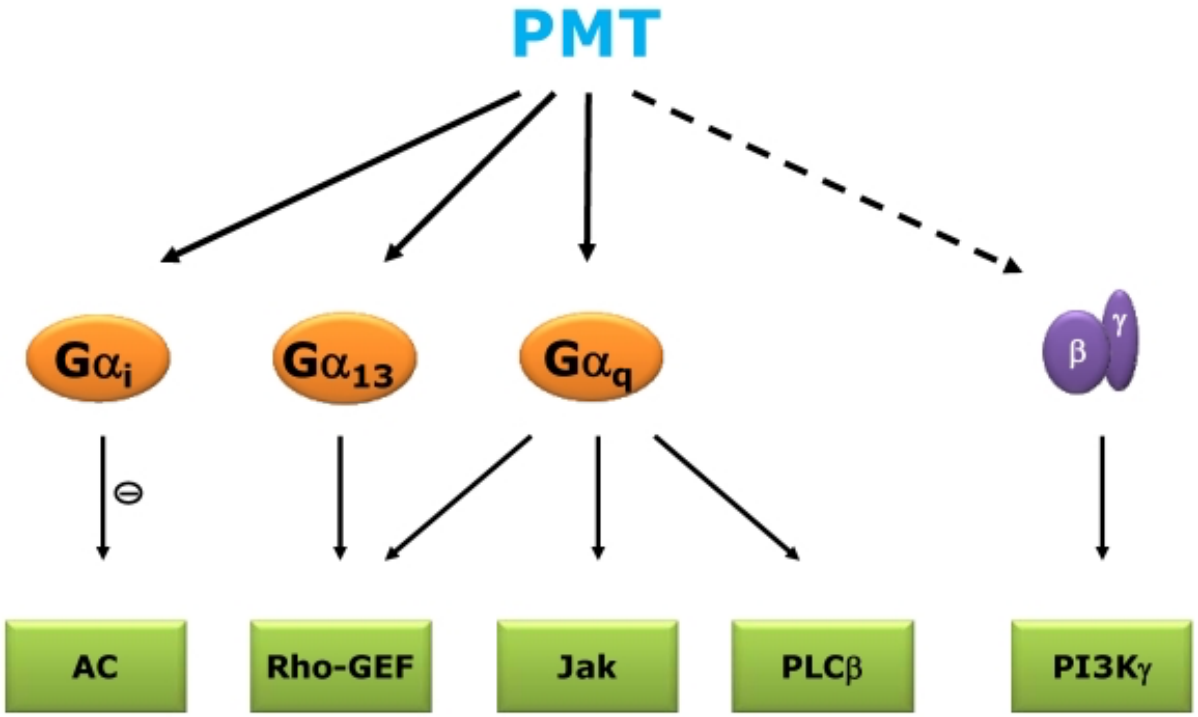


Abbildung 3.1: Durch PMT aktivierte G Proteine und ihre Downstream Effekte.[13]

---

[7] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2015) **Molecular Biology of the Cell.** 6. Edition S. 858

[8] ebenda S. 956-957

[9] Joachim H. C. Orth, Klaus Aktories (2010)

[10] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2015) S. 863-864

[11] Joachim H. C. Orth, Klaus Aktories (2010)

[12] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2015) S. 574

[13] Bildquelle: Joachim H. C. Orth, Klaus Aktories (2010)

Da wie beschrieben zum Beispiel bei der atropischen Rhinitis Osteoklasten, die Knochenmaterial resorbieren und aus der Fusion multipler Vorläuferzellen entstehen, eine Rolle spielen, wurde der Effekt von PMT auf Osteoklasten untersucht. Osteoklasten entstehen durch die Fusion von Vorläuferzellen und haben somit mehrere Nuclei. Als der Effekt von PMT auf Osteoklasten untersucht wurde, stellte sich heraus, dass sich die Vorläufer Zelllinie zwar zu Osteoklasten differenziert, diese aber deutlich kleiner sind und weniger Nuclei haben als die Osteoklasten in der Kontrolle. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die Überaktivierung der GTPasen RhoA, Rac1 und Rac2, die einen Einfluss auf das Zytoskelett haben, die Zellen weniger fusionsfähig werden. Andererseits könnte dieser Effekt auch durch eine über G_q ausgelöste Kaskade erklärt werden. Um herauszufinden, welche der beiden Erklärungen zutrifft. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zelllinien hergestellt, bei denen die RhoA, Rac1, Rac2 oder G_q konstitutiv aktiviert wurden. Wenn nun eine dieser Zelllinien ein ähnliches verhalten wie die Zellen die mit PMT behandelt wurden zeigen würde, wäre dies ein Indiz dafür, dass die entsprechende Signalkaskade für den Effekt des PMTs verantwortlich ist.

4. Methoden

4.1 Herstellung von G_q Wildtyp (WT) und G_q konstitutiv aktivierter Zelllinien

Um die Effekte der konstitutiven Aktivierung durch PMT zu erforschen wurden zwei Gensequenzen in die parentalen Zellen eingefügt. Es wurde mit einer künstlichen Zelllinie gearbeitet, die fast kein G_q exprimiert hat. Die Zellen der Zelllinie sind Vorläuferzellen, welche sich zu Makrophagen und Osteoklasten differenzieren können. Die Arbeit mit einer künstlichen Zelllinie ist Ressourcen sparender als die Zellen einer Maus zu entnehmen. Die erste hergestellte Zellinie exprimierte die WT Version des G_q Proteins, dieser Zellltyp kann in Experimenten als Kontrolle verwendet werden. Die zweite enthielt eine mutierte Version in der das Protein, wie in Anwesenheit von PMT, konstitutiv aktiviert wurde (G_q Mutante). Statt wie im Fall von PMT Glutamin durch Glutamat auszutauschen, wurde Glutamat durch Leucin ersetzt. Daneben enthielten beide transfizierten Gensequenzen einen Teil, der Puromycin Resistenz vermittelte und eine Sequenz die für die Herstellung eines Rezeptors für humanes CD4 (hCD4) sorgte. Um diese Gensequenzen in die parentalen Zellen einzufügen, wurde eine Reihe von Schritten benötigt.

Zuerst wurden HEK Zellen auf drei Wells einer 6-Well Platte in *Dulbecco's modified Eagle Medium* angesetzt mit 500'000 Zellen pro Well. Nach 24 h im Inkubator (37 °C, 5% CO_2) konnte die Transfektion durchgeführt werden. Dazu musste zuerst der DNA mix aus folgenden Bestandteilen gemischt werden.

211.5 µl H_2O

3.75 µl pCl-eco

3.75 µl DNA Konstrukt

31 µl $CaCl_2$

250 µl HBS

So enthielt man drei Lösungen. Eine mit einer Mock Sequenz zur Kontrolle, auf der keine richtigen Gensequenzen waren, eine Sequenz mit dem WT und eine mit der Mutante. Diese Lösungen wurden nach einem Medium Wechsel auf jeweils ein Well mit HEK Zellen pipettiert. Das Ca^{2+} regierte mit den Phosphaten in der DNA und es bildete sich ein Präzipitat, das auf die HEK Zellen aufsetzte und von ihnen aufgenommen wurde. Nach 6 h im Inkubator, wurde wieder ein Medium Wechsel durchgeführt, womit auch die Lösung entfernt wurde. Anschliessend wurden die Zellen für 48 h inkubiert (37 °C, 5% CO_2). Da sich auf den aufgenommenen Sequenzen neben den beschriebenen Elementen auch Sequenzen für die Herstellung eines Viruses befanden, stellten die HEK Zellen in dieser

Zeit einen Virus her, der die einzufügenden Sequenzen enthielt und gaben ihn in den Überstand ab. Nach 48 h wurde dieser Überstand abgesaugt und über Nacht bei -80 °C eingefroren.

Am Folgetag wurden jeweils 200'000 parentale Zellen in Falcon tubes zentrifugiert (5 min, 1300 rotations per minute (rpm)) und der Überstand abgesaugt. Anschliessend wurde das Pellet in 750 µl der am Vortag hergestellten Virusüberstände aufgenommen und es wurden 2 µl Polybren zugegeben, das die Aufnahme der Viren vereinfacht. Danach wurden die Zellen für 2 h bei 1800 rpm und 37 °C zentrifugiert. Somit wurden die Zellen mit dem Virus infiziert. Dann wurden die Zellen in 10 ml frischen Medium in drei Flaschen ausgebracht und für 48 h inkubiert (37 °C, 5% CO_2).Das Medium bestand aus:

RPMI 1640

10% FCS

1% P/S

20 ng/ml GM-CSF

1 µM Estradiol

Danach wurden zu jeder der drei Flaschen 50 µl Puromycin (1.5 mg/ml) hinzugegeben. Dieses sollte alle Zellen töten, die die Gensequenzen nicht aufgenommen hatten und somit auch die Resistenz nicht besassen. Die Selektion der Zellen dauerte eine Woche.. Welcher Anteil dieser Zellen die Gensequenz aufgenommen hatte, konnte dann mithilfe einer Durchflusszytometrie überprüft werden.

Dieselbe Methode wurde verwendet um Zelllinien mit konstitutiv aktiviertem RhoA, konstitutiv aktiviertem Rac1 und konstitutiv aktiviertem Rac2 herzustellen. Auch hier wurde Glutamin durch Leucin ersetzt

4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Unterscheidung der Zellen, die den fluoreszenzgekoppelten hCD4 Rezeptor haben und denen die ihn nicht haben, da man messen kann ob der anti-hCD4 Antikörper an der Zelloberfläche bindet oder nicht. Da diesen Rezeptor nur Zellen haben die die Gensequenzen aufgenommen haben, kann man dadurch bestimmen, welche Zellen die G_q WT Sequenz respektive die G_q Mutante Sequenz aufgenommen haben.

Zuerst wurden jeweils 250'000 Zellen des WT und der Mutante sowie 250'000 parentale Zellen als negativ Kontrolle dreimal gewaschen, indem sie zentrifugiert wurden (30 s, 13000 rpm), der Überstand abgesaugt wurde und dann 300 µl Phosphate buffered saline

(PBS) auf die Zellen draufgegeben wurden. Dann wurden die Zellen in je 100 µl blocking buffer (2% Bovine serum albumin (BSA) in PBS) für 10 min resuspendiert. Dieser Schritt ist wichtig, damit der Antikörper nicht unspezifisch an andere Proteine auf der Zelloberfläche ausser hCD4 bindet. Indem man die Zellen im proteinreichen blocking buffer resuspendiert bevor man den Antikörper hinzugibt, bindet der Antikörper eher unspezifisch an eines der Proteine in der Lösung als an eines auf der Zelloberfläche. Dann kamen 2 µl des Antikörpers anti-hCD4 hinzu. Dann wurde alles für 45 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen wieder dreimal mit PBS gewaschen, um all den Antikörper, der nicht an die hCD4 Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden hatte, loszuwerden. Anschliessend wurden die Messungen durchgeführt. Die Zellen lagen im Durchflusszytometrie Gerät vereinzelt vor und und passierten nacheinander den Detektor. Der Antikörper kann die Strahlung absorbieren und dann eine ganz bestimmte Frequenz emittieren. Das Gerät bestrahlt die Zellen und misst die resultierende Strahlung mit zwei Detektoren. Ein Oberer Detektor misst die von der Zelle gebrochene Strahlung. Dies ist ein Indikator für die Komplexität der Zelle. ein seitlicher Detektor misst die Strahlung die vor und hinter den Zellen vorbeikommt, was auf die Grösse der Zellen schliessen lässt. Ausserdem wir die vom Antikörper emmitierte Strahlung gemessen, weswegen markierte Zellen leuchtintensiver erscheinen.

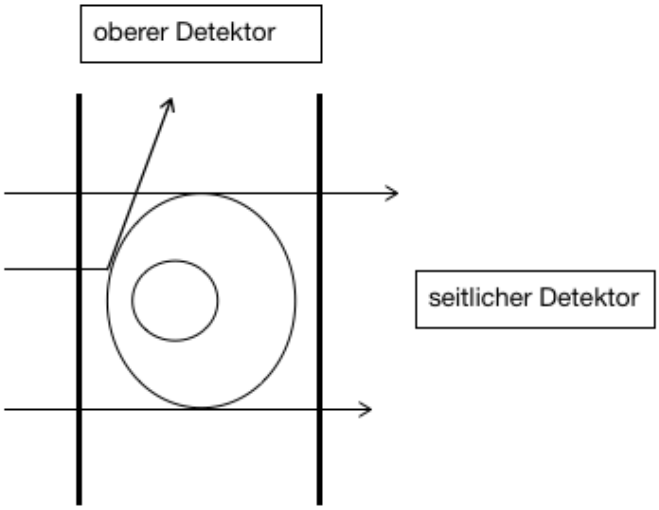


Abbildung 4.1: Die Detektoren und die Strahlen in einem Durchflusszytometrie Gerät.

Die Zelllinien mit konstitutiv aktiviertem RhoA, Rac1 und Rac2 wurden auch mittels einer Durchflusszytometrie überprüft.

4.3 Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) assay

Während des TRAP assays werden die Zellinien dazu stimuliert, sich zu Osteoklasten zu entwickeln. Damit wurde die Fähigkeit von den parentalen Zellen (positiv Kontrolle), den RhoA Zellen, den Rac1 Zellen und den Rac2 Zellen überprüft, sich zu Osteoklasten zu differenzieren. Pro Zelllinie wurden 400'000 Zellen entnommen und zentrifugiert (5 min, 1300 rpm). Dann wurden sie zweimal mit PBS gewaschen (5 min, 1300 rpm). Dann wurden auf jede Zelllinie 2 ml BMDM Medium pipettiert und die Lösung wurde in zwei Proben à 1 ml auf eine 24 Well Platte gegeben. Eine Probe wurde nur mit M-CSF stimuliert (25 ng/ml), die andere mir M-CSF und RANK Ligand (RANKL) (50 ng/ml). M-CSF ist ein Faktor der hier, wie zum Beispiel auch im menschlichen Körper, bewirkt, dass die Zellen zu Makrophagen differenzieren, während der Zusatz von RANKL die Weiterentwicklung zu Osteoklasten zur Folge hat[14]. Die Differenzierung dauerte dann 7 Tage, wobei am 3. und am 5. Tag restimuliert wurde, indem 500 µl Medium abgenommen wurden und mit frischen Medium, M-CSF und RANKL ersetzt wurden. Nach einer Woche konnte dann die Färbung vorgenommen werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt und pro Well eine Fixierungs Lösung bestehend aus:

112 µl Citrat Lösung

290 µl Acetone

36 µl 37% Formaldehyde

Auf die Zellen gegeben und 30 s bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann wurde die Lösung wieder abgesaugt und bidestilliertes Wasser (37 °C) auf die Zellen gegeben. Danach wurde die Färbe Lösung mithlife des Sigma Aldrich; Leuckocyte Acid Phosphatase (TRAP) Kit vorbereitet. Dazu wurden zuerst pro Well:

400 µl bidestilliertes Wasser (37 °C)

4.4 µl Naphtol AS-BI Phosphat Lösung

17.6 µl Acetat Lösung

gemischt. Dann wurden pro well

4.4 µl Sodium-nitrit Lösung (Kit)

4.4 µl Fast Garnet GBC Standard Lösung (Kit)

vermischt und für 2 min bei RT inkubiert und anschliessend der Staining Lösung beigegeben. Diese wurde dann auf 37 °C aufgewärmt und nach Absaugen des Wassers auf die Zellen pipettiert (400 µl/Well). Diese wurden dann für 30 min bei RT inkubiert.

[14] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2015) S. 850

Anschliessend wurde die Lösung abgesaugt und die Zellen dreimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen, indem 400 µl Wasser zuerst hinzupipettiert und dann abgesaugt wurden. Dann konnten nach Trocknen über Nacht die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet werden. Osteoklasten erscheinen als grosse, lila angefärbte Zellen.

4.4 Western Blot

Mithilfe des Western Blots kann festgestellt werden, ob bestimmte Proteine in einer Zelle vorhanden sind. Dafür müssen die Zellen zuerst lysiert werden. Dafür werden die Zellen zuerst zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie in 300 µl Lyse Buffer resuspendiert und für 45 min bei 4 °C inkubiert werden. Dann wurden die Zellen für 20 min bei 15'000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abgenommen.

Anschliessend wurde ein Bicinchoninic acid assay (BCA)-Assay durchgeführt. Dafür wurden 10 µl des Überstands 1:5 verdünnt und in eine 96 Well Platte gegeben. Daneben wurden Proben einer Kalibrationsgeraden mit 10 µl der BSA-Konzentrationen 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625 [µg/ml] angelegt. Dann wurde in alle Wells BCA Reagent zugegeben. Dieser verfärbt sich in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Diese Färbung kann mittels eines ELISA readers nach 30 min Inkubation bei RT gemessen werden und mittels der Kalibrationsgeraden kann dann die Konzentration berechnet werden.

Anschliessend werden 15 µg Protein mit 7 µl Western Blot buffers vermischt und mit bidestilliertem Wasser auf 28 µl aufgefüllt. Die Proben wurden dann während 2 min bei 95 °C gekocht und bei -80 °C über Nacht eingefroren.

Die Lösungen wurden dann auf ein Gel geladen. Daneben wurden 10 µl der ColorPlus prestained Protein Ladder geladen. Dann wurde das Gel für 90 min bei 120 V laufen gelassen.

Das Gel wurde dann zum Blotten auf vier Whatmann papers und eine Membran gelegt und auf das Gel kamen nochmals vier Whatman papers. Dann wurde das Ganze während 1 h 112 mA ausgesetzt. Wegen des Stroms wandern die Proteine, die durch die Gelelektrophorese nach Gewicht aufgetrennt wurden, aus dem Gel auf die Membran. Anschliessend wurde die Membran während 1 h in 5% BSA in Tris bufferd saline with tween (TBST) gelegt, bevor der primäre Antikörper hinzugefügt wurde. Dieser bindet spezifisch an das Protein, das man detektieren will. Durch das Einlegen in BSA wird unspezifisches Binden verhindert. Dann wurde die Membran über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die primären Antikörper, die nicht an Proteine

gebunden hatten durch dreifaches Waschen mit TBST entfernt. Dabei wurde die Membran pro Waschschritt in frisches TBST gelegt welches nach 10 min ausgetauscht wurde. Dann kam des sekundäre Antikörper auf die Membran. Dieser bindet an den primären Antikörper und macht diesen später sichtbar, da er and Meerretichperoxidase gekoppelt ist, welche Peroxid unter Fluoreszenz umsetzt. Anschliessend wurde wieder dreimal mit TBST gewaschen. Dann wurden die Membranen entwickelt, indem sie zuerst während 1 min in die Western Bright™ Reagenz gelegt wurden und eine Kamera dann die emittierte Strahlung aufnahm und sichtbar machte. Gezeigt sind die negative dieser Bilder. Daher gilt, dass je dunkler die Bande, desto mehr Protein war in der Zelle enthalten.

5. Resultate

5.1. Versuche mit G_q WT und G_q Mutante

5.1.1. Durchflusszytometrie

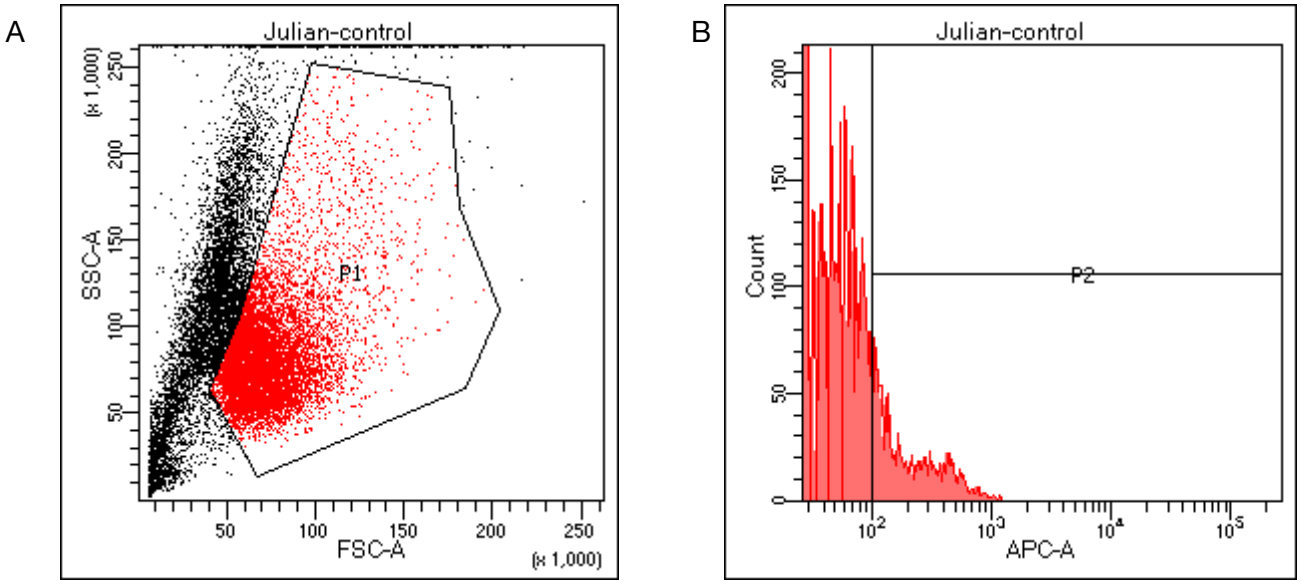


Abbildung 5.1.1.1: [A] Grösse (x-Achse) und Komplexität (y-Achse) der parentalen Zellen. Die rot markierten Zellen sind vorwiegend lebende Zellen, währenddem die nicht markierten, schwarzen vorwiegend tot oder apoptotisch und somit nicht relevant sind. [B] Verteilung der Leuchtintensitäten der rot markierten Zellen.

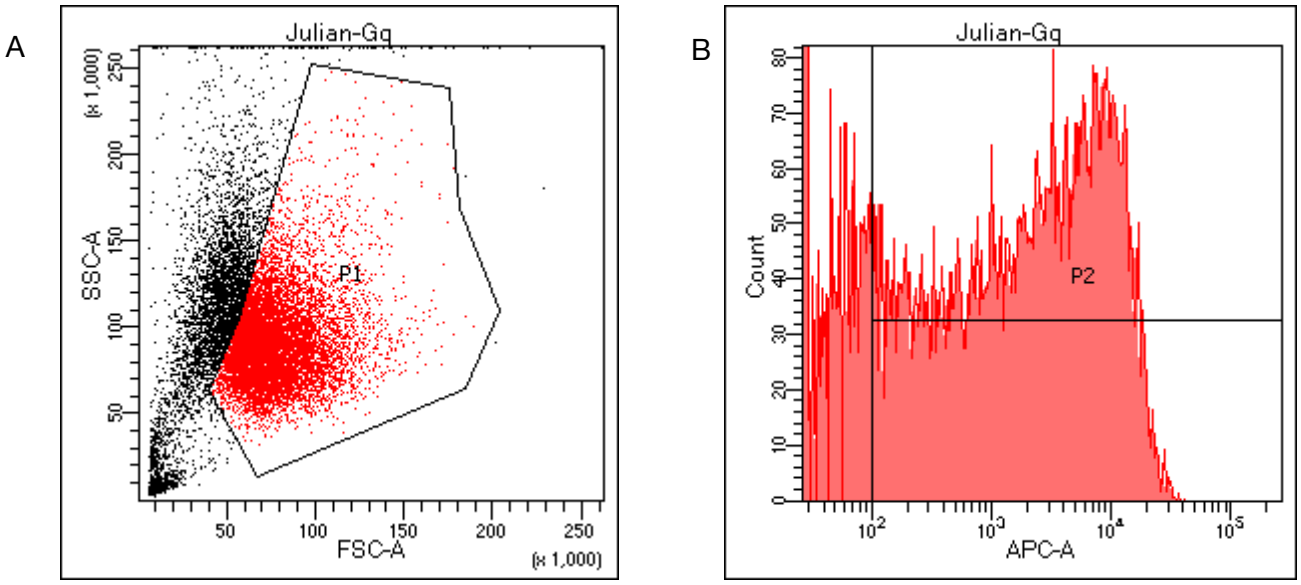


Abbildung 5.1.1.2: [A] Grösse und Komplexität der G_q WT Zellen. [B] Verteilung der Leuchtintensitäten der markierten Zellen.

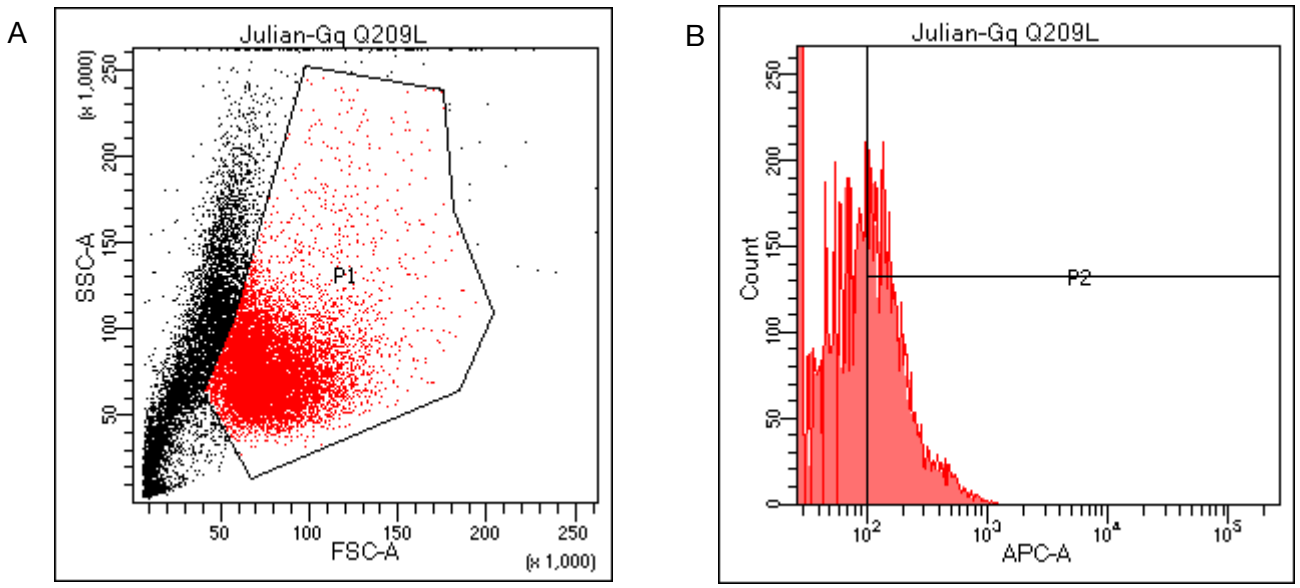


Abbildung 5.1.1.3 [A] Grösse und Komplexität der G_q Mutante Zellen. [B] Verteilung der Leuchtintensitäten der markierten Zellen.

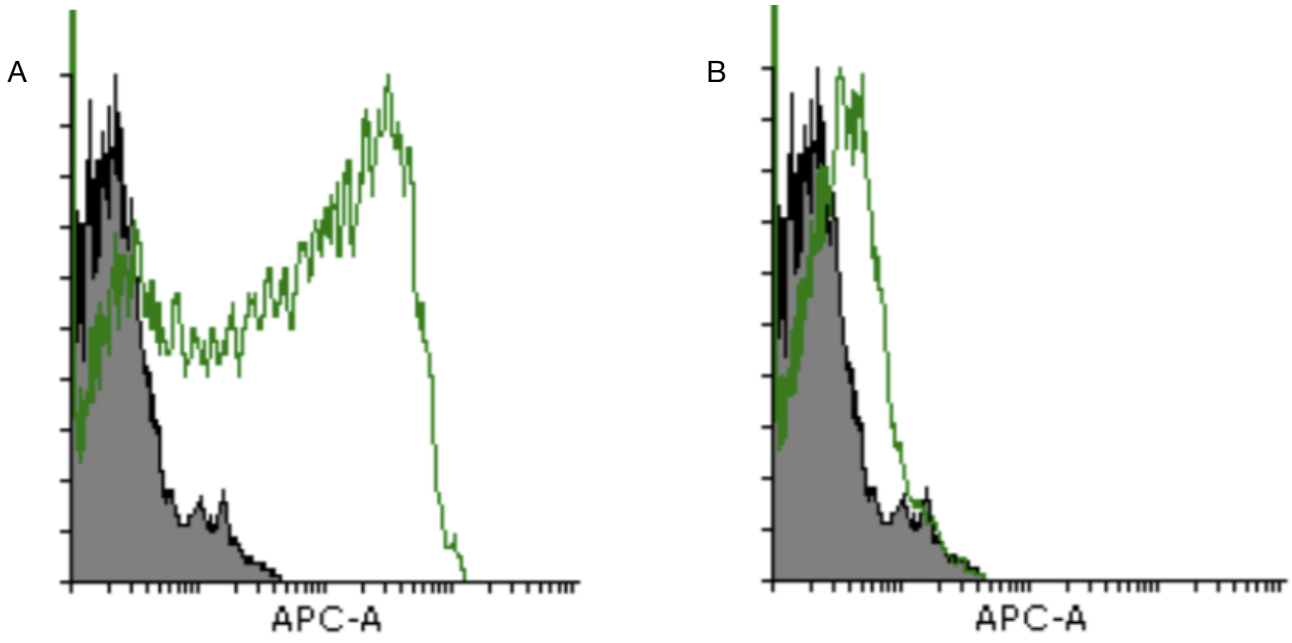


Abbildung 5.1.1.4 [A] Skalierte Überlagerung der Leuchtintensitäten der parentalen Zellen (grau) und G_q WT Zellen (grün), x-Achse: Leuchtintensität, y-Achse: Anzahl.
[B] Skalierte Überlagerung der Leuchtintensitäten der parentalen Zellen (grau) und G_q Mutante Zellen (grün).

Es ist ersichtlich, dass bei allen untersuchten Zelllinien ein Teil der Zellen tot oder apoptotisch und somit uninteressant ist. Es zeigt sich, dass bei den G_q WT Zellen viele

Zellen deutlich stärkere Leuchtintensitäten haben als die parentalen Zellen, was bedeutet, dass viele der Zellen die Gensequenz aufgenommen haben und exprimieren. Die Zellen mit der G_q Mutante Sequenz, sind nur wenig leuchtintensiver als die parentalen Zellen, was bedeutet, dass die Sequenz nur schwach exprimiert wird. Die Mock Zellen starben wie erwartet und wurden deswegen nicht weiter mit Durchflusszytometrie untersucht.

5.1.2. Western Blot

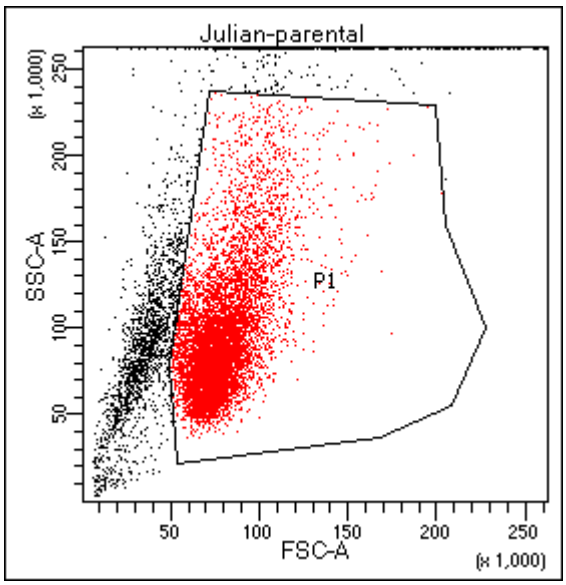
Abbildung 5.1.2.1. Mit anti-G_q (1:500) markierte G_q Proteine in parentalen Zellen (Spur 1), G_q WT Zellen (Spur 2) und Gq Mutante Zellen (Spur 3). Als sekundärer Antikörper wurde mouse (1:5000) verwendet.

Während bei den parentalen Zellen kein G_q zu sehen ist, exprimieren die G_q WT Zellen stark G_q, was wiederum zeigt, dass sie die Gensequenz aufgenommen haben und sie exprimieren. Dass auftreten von G_q bei der Mutante beweist, dass auch sie die Sequenz aufgenommen haben, sie aber anscheinend weniger exprimieren als der WT.

5.2. Versuche mit Rho A, Rac1 und Rac2

5.2.1. Durchflusszytometrie

A



B

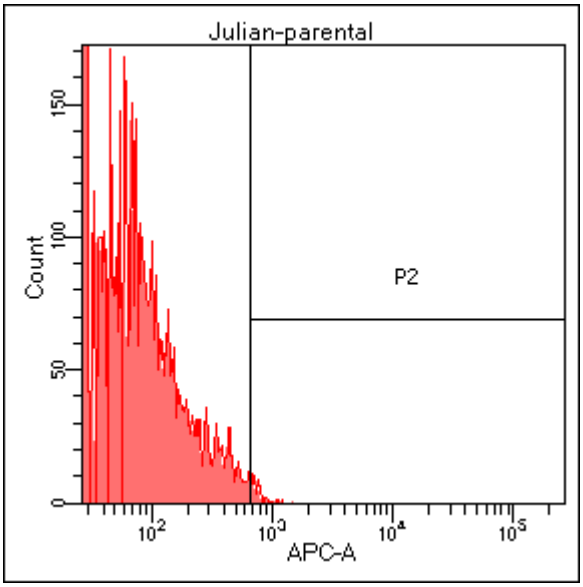
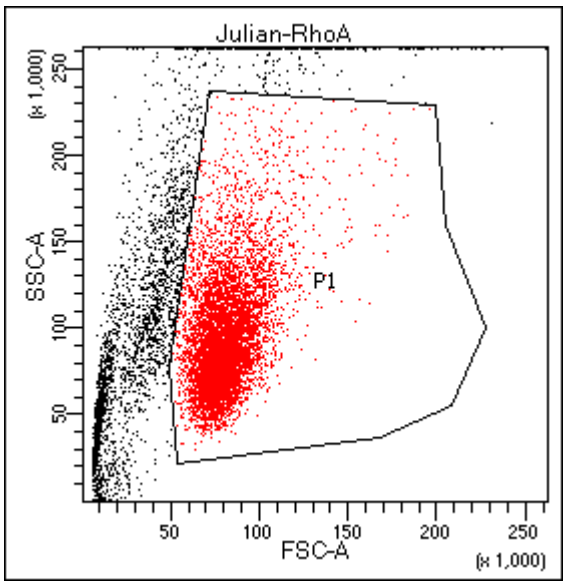


Abbildung 5.2.1.1. [A] Grösse und Komplexität der parentalen Zellen [B] Verteilung der Leuchtintensitäten der markierten Zellen.

A



B

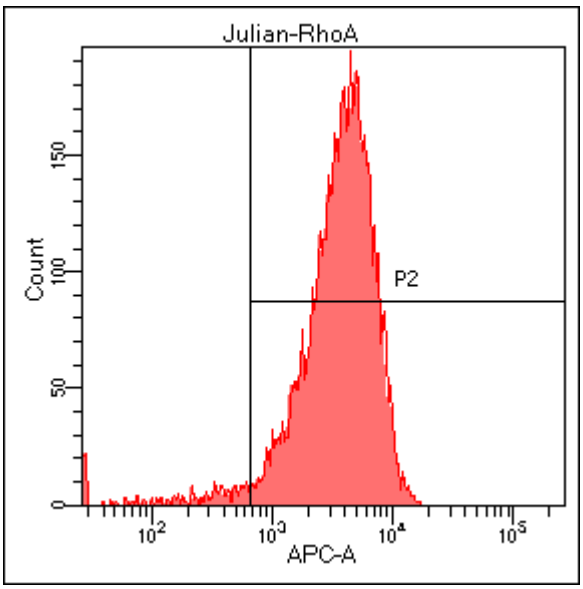
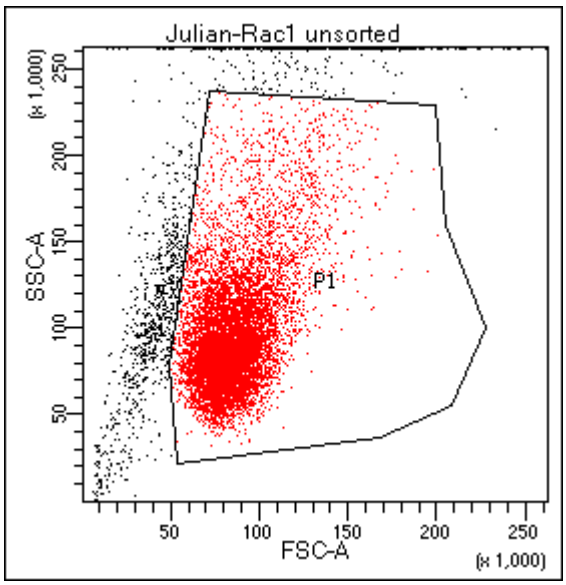


Abbildung 5.2.1.2. [A] Grösse und Komplexität der RhoA Zellen [B] Verteilung der Leuchtintensitäten der markierten Zellen.

A



B

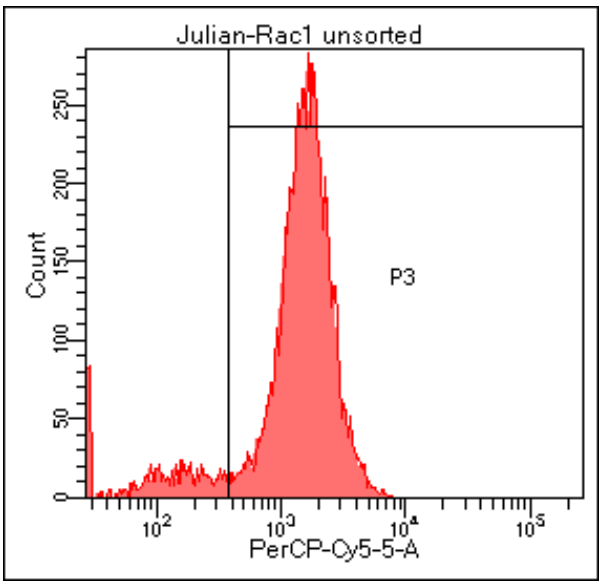
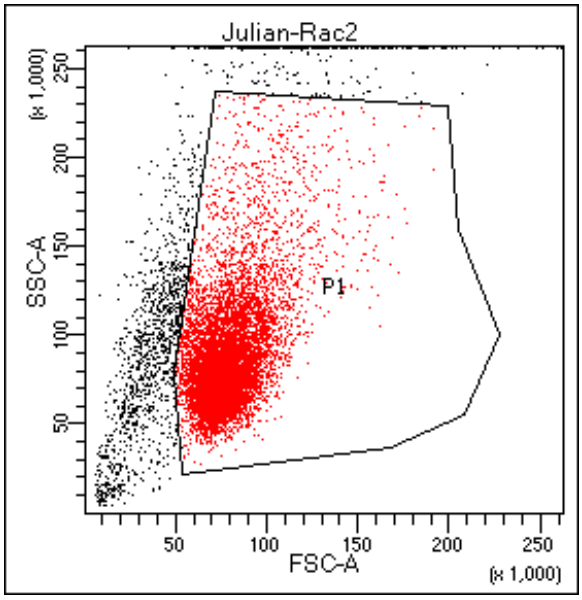


Abbildung 5.2.1.3. [A] Grösse und Komplexität der Rac1 Zellen [B] Verteilung der Leuchtintensitäten der markierten Zellen. Da ein etwas anderer Antikörper verwendet wurde, der eine andere Frequenz emittiert, ist auf der x-Achse ein anderer Kanal angegeben.

A



B

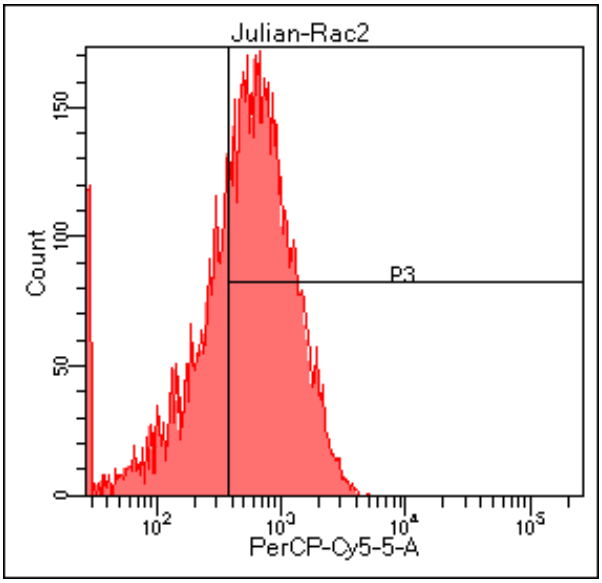


Abbildung 5.2.1.3. [A] Grösse und Komplexität der Rac1 Zellen [B] Verteilung der Leuchtintensitäten der markierten Zellen. Da ein etwas anderer Antikörper verwendet wurde, der eine andere Frequenz emittiert, ist auf der x-Achse ein anderer Kanal angegeben.

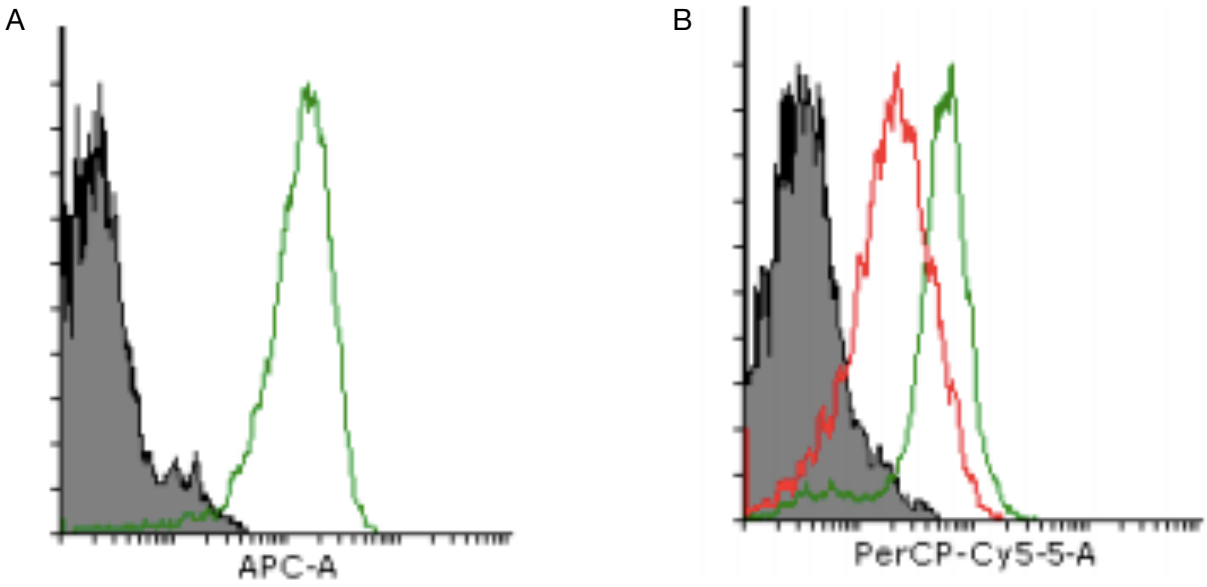


Abbildung 5.1.1.4 [A] Skalierte Überlagerung der Leuchtintensitäten der parentalen Zellen (grau) und RhoA Zellen (grün), x-Achse: Leuchtintensität, y-Achse: Anzahl.
[B] Skalierte Überlagerung der Leuchtintensitäten der parentalen Zellen (grau), Rac1 Zellen (grün) und Rac2 Zellen (rot).

Hier zeigen sich alle hergestellten Zelllinien deutlich leuchtintensiver als die parentalen Zellen. Somit enthält jeweils ein Grossteil der Zellen die entsprechenden Gensequenzen

5.2.2. Western Blot

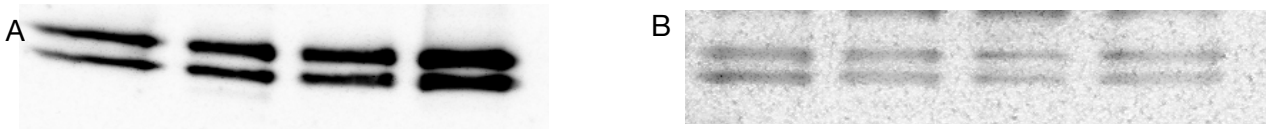


Abbildung 5.2.2.1. [A] Mit anti-Erk (1:1000) markierte Erk Proteine in parentalen Zellen, RhoA Zellen, Rac1 Zellen und Rac2 Zellen. [B] Mit anti-pErk (1:1000) markierte phosphorylierte, aktivierte Erk Proteine. Als sekundärer Antikörper wurde rabbit (1:10'000) verwendet.

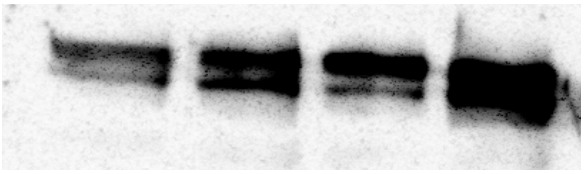
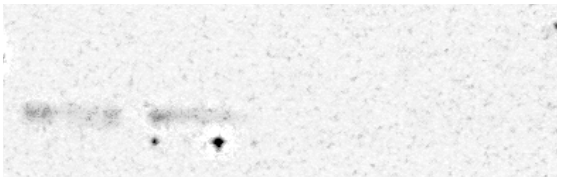
A  B 

Abbildung 5.2.2.2. [A] Mit anti-STAT3 (1: 1000) markierte STAT3 Proteine in parentalen Zellen (Spur 1), RhoA Zellen (Spur 2), Rac1 Zellen (Spur 3) und Rac2 Zellen (Spur 4). [B] Mit anti-pSTAT3 (1:1000)markierte phosphorylierte, aktivierte STAT3 Proteine. Als sekundärer Antikörper wurde rabbit (1:10'000) verwendet.

Es liegt sowohl mehr phospholiertes Erk als auch phosphoriliertes STAT3 in den parentalen und RhoA Zellen vor, als in den Rac1 und Rac2 Zellen. Je grösser der aktivierte Anteil der Erk Proteine desto stärker proliferiert die Zelle vereinfacht gesagt, da Erk Teil einer Kaskade ist, die Zellvermehrung unterstützt.[15] STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Zellproliferation verstärkt. Also deuten höhere Konzentrationen der aktivierten Form der beiden Proteine darauf hin, dass die Zellen glücklicher sind.

[15] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2015) S. 856

5.2.3. TRAP assay

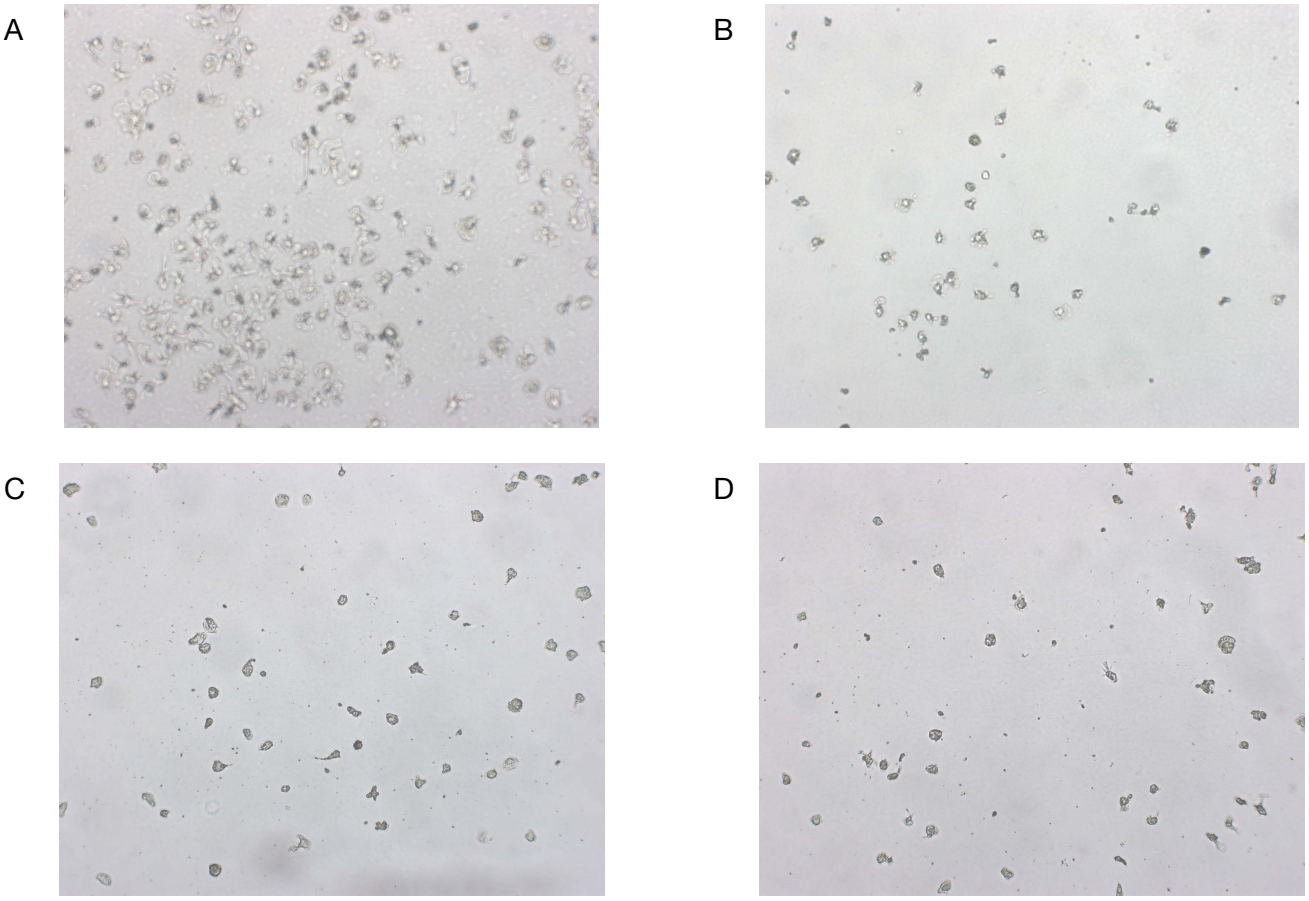


Abbildung 5.5.2.1. Nur mit M-CSF stimulierte parentale [A], Rho A [B], Rac1 [C], und Rac2 [D] Zellen.

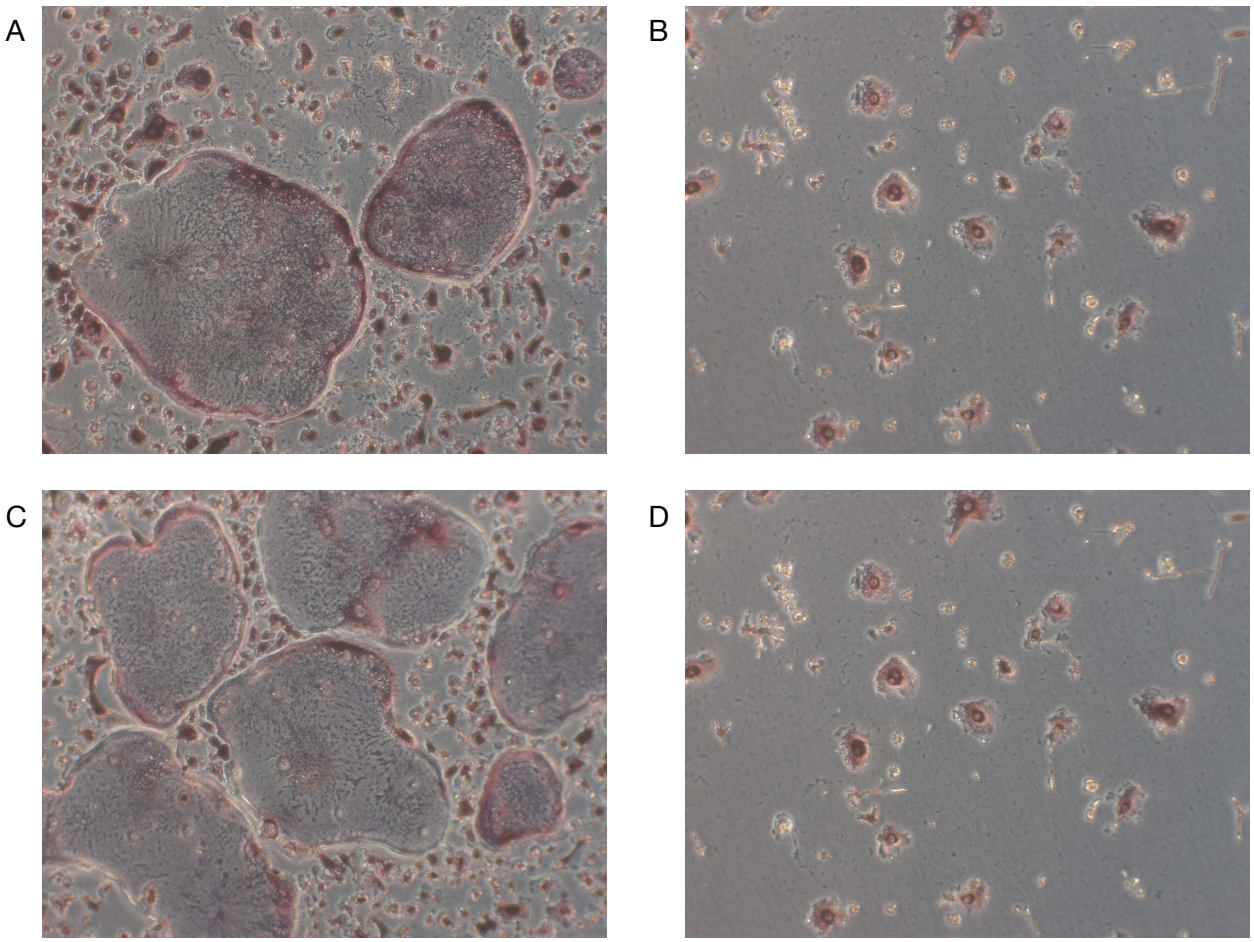


Abbildung 5.5.2.2. Mit M-CSF und RANKL stimulierte parentale [A], Rho A [B], Rac1 [C], und Rac2 [D] Zellen.

Bei den Zellen ohne RANKL entwickeln sich keine Osteoklasten, während sich bei den Zellen, welche mit RANKL stimuliert wurden bei den parentalen und bei der Rac1 Linie Osteoklasten entwickelten. Die Osteoklasten sind die grossen Zellen mit multiplen Zellkernen.

6. Diskussion

6.1 Versuche mit G_q WT und G_q Mutante

Beim WT zeigt die Durchflusszytometrie bezüglich der Leuchtintensitäten zwei verschiedene Populationen mit verschiedenen Maxima. Das Maximum links mit der kleineren Leuchtintensität deckt sich in etwa mit dem Maximum der parentalen Zellen. Diese Population hat die einzufügende Gensequenz mit dem hCd4 Rezeptor also nicht aufgenommen oder exprimiert denn hCD4 Rezeptor nicht. Das zweite Maximum mit der höheren Leuchtintensität wird durch den Teil der Zellen verursacht, die die Gensequenz aufgenommen haben. Da dieses Maximum höher ist, ist die Mehrzahl der Zellen G_q positiv. Um näher an 100% positive Zellen zu kommen und nur noch eine Population zu haben, könnte man die Zellen vom Durchflusszytometrie Gerät sortieren lassen, sodass es die positiven Zellen behält und die negativen wegwirft. Dies kann den Zellen allerdings schaden. Es hat auch schon geholfen, die Zellen einzufrieren und wieder aufzutauen. Die Zellen, die G_q WT exprimieren sind aber schon positiv genug, um Experimente mit ihnen anzusetzen.

Bei den G_q Mutante Zellen sieht das Ganze etwas anders aus. Hier gibt es nur ein Maximum, das dem parentalen Maximum gegenüber zwar leicht leuchtintensiver ist, aber bei weitem nicht so klar wie bei den WT Zellen. Da die getesteten Zellen aber in Puromycin überleben, während die Zellen mit der Mock Sequenz alle gestorben sind, müssten sie die Gensequenz allerdings haben. Es könnte sein, dass die Sequenz für das hCD4 nicht oder nur schwach exprimiert wird, die Gensequenz aber aufgenommen wurde. Der Western Blot zeigt, dass die Mutante Zellen mehr G_q herstellen, als die parentalen Zellen, die fast keines haben, aber bei weitem nicht so viel wie der WT, dessen Bande klar am dunkelsten ist. Auch das spricht dafür, dass die Gensequenz zwar aufgenommen wurde aber nur schwach exprimiert wird. Da bei der Mutante die Ergebnisse anders sind als erwartet, werden nochmals neue Zellen infiziert.

6.2 Versuche mit RhoA, Rac1 und Rac2

Bei der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass alle drei Zelltypen klar positiv waren, da alle aus nur einer Population bestehen, deren Maximum deutlich leuchtintensiver ist als das Maximum der parentalen Zellen. Somit konnten mit diesen Zelltypen aussagekräftige Experimente angesetzt werden.

Beim TRAP assay bildeten sich bei der positiv Kontrolle (parentale Zellen) Osteoklasten, während bei der negativ Kontrolle nur mit M-CSF keine Osteoklasten bildeten. Bei den

Rac1 Zellen bildeten sich ebenfalls Osteoklasten, während die RhoA und Rac2 Zellen starben. Die Ergebnisse der Rac1 und Rac2 Zellen, decken sich mit den Ergebnissen, der TRAP assays die bereits im Labor schon durchgeführt wurden. Bei den RhoA Zellen gibt es wechselnde Ergebnisse, da die RhoA Zellen manchmal sehr stark Osteoklasten bilden, während sie manchmal sterben. Die plausibelste Erklärung für dieses Phänomen ist, dass die Reaktion der RhoA Zellen davon abhängt, wie wohl sie sich beim Ansetzen des assays fühlen, d.h. wenn sie nicht zu dicht gewachsen sind, sondern noch genügend Raum und Nährstoffe haben, bilden sie Osteoklasten. Sind sie aber gestresst, sterben sie wegen der zusätzlichen Belastung. Um zu belegen warum die Zelltypen Osteoklasten bilden bzw. nicht bilden, müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden, da im Moment noch keine Literatur zu dem Thema vorhanden ist, die helfen könnte, dies definitiv zu erklären. Der Effekt des PMT konnte aber in keinem der Zelltypen repliziert werden, was nahelegt, dass er entweder durch das Zusammenwirken der einzelnen Kaskaden oder durch eine über G_q aktivierte Kaskade verursacht wird.

Beim Western Blot zeigte sich, dass der Anteil des pErk in den parentalen Zellen und den RhoA Zellen etwas höher ist als in den Rac1 und Rac2 Zellen. Die Kontrolle mit dem Erk Antikörper zeigte, dass beim Rac2 etwas mehr Protein auf die Membran geladen wurde als in den anderen Zelltypen, daher muss diese Bande mit dem pErk etwas abgeschwächt werden bevor sie verglichen werden kann. Beim STAT3 zeigten sich ähnliche Resultate wie beim Erk. Parentale und RhoA Zellen zeigten schwache Banden für phosphoriliertes STAT3, während Rac1 und Rac2 keine zeigten. Das legt nahe, dass die parentalen und RhoA Zellen etwas stärker proliferieren als die Rac1 und Rac2 Zellen. Dies könnte einerseits einfach eine Momentaufnahme sein, und die unterschiedliche Proliferation von unterschiedlichen Zelldichten bedingt sein. Andererseits könnte es aber auch mit den konstitutiv aktivierten Kaskaden zu tun haben. Um herauszufinden, was der Fall ist, müsste der Versuch mehrmals wiederholt werden

7. Fazit

Ich fand die Arbeit im Labor sehr spannend und vor allem die verschiedenen Methoden, die ich kennenlernen durfte, haben mich fasziniert. Ich habe während der 4 Wochen eine bessere Vorstellung davon erhalten, wie die Arbeit in der Forschung aussehen kann. Ich könnte mir nach Ende meines Medizinstudiums durchaus vorstellen, in die Forschung zu gehen und werde wahrscheinlich zu diesem Zweck bereits im 2. Studienjahr ein Modul zu dem Thema „Forschung in der Medizin“ wählen. Das Praktikum hat dafür gesorgt, dass ich diese Entscheidung um einiges besser informiert treffen kann.

Gesamthaft blicke ich sehr positiv auf die vier Wochen in Heidelberg zurück, da mir, wie bereits erwähnt die Arbeit aber auch die Stadt selbst sehr gefallen haben und ich möchte mich für diese Möglichkeit in aller Form bei Dr. Katharina Kubatzky bedanken.

8. Quellenverzeichnis

1. Sara L. Cross (11.6.17) **Pasteurella Multocida Infection**. [https://emedicine.medscape.com/article/224920-overview] zuletzt besucht: 11.9.18

2. Carter GR und De Alwis MCL (1989) **Haemorrhagic septicaema.**

3. Dagmar Hildebrand, Klaus Heeg, Katharina F. Kubatzky (2010) ***Pasteurella multocida* Toxin-Stimulated Osteoclast Differentiation Is B Cell Dependent.**

4. Richard B. Rimler (1998) **Encyclopedia of Immunology.** 2. Edition

5. H.C. Korswagen, R.H.A. Pasterk (2001) **Heterotrimetric G Proteins.** in Enzyclopeida of Genetics

6. Joachim H. C. Orth, Klaus Aktories (2010) **Pasteurella nultocida Toxin Activates Various Heterotrimetric G Proteins by Deamidation.** [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202810/] zuletzt besucht: 12.9.18

7. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter (2015) **Molecular Biology of the Cell.** 6. Edition S. 858