



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

Zentrum für Infektiologie
Universitätsklinikum Heidelberg
AG Kubatzky
Prof. Dr. Katharina Kubatzky

David Reeg
Klasse 12
Gymnasium Isny
12.08. – 06.09.19

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Projektinformationen	
2.1 Einfluss des G _q -Proteins auf Osteoklastogenese und Metabolismus	2
2.2 Infektionen nach orthopädischen Implantaten	4
3. Methoden	
3.1 Durchflusszytometrie	5
3.2 MitoTracker-Assay und Zellproliferation	6
3.3 CellTiter Glo-Assay	7
3.4 TRAP-Assay	8
3.5 BCA-Assay	9
3.6 Western Blot	10
3.7 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qPCR	12
4. Ergebnisse	
4.1 MitoTracker-Assay und Proliferation	14
4.2 CellTiter Glo-Assay	15
4.3 TRAP-Assay Hoxb8	16
4.4 Western Blot Hoxb8	17
4.5 TRAP-Assay RAW	18
4.6 Western Blot RAW	18
4.7 qPCR	19
5. Diskussion	21
6. Rückblick und Fazit	24
7. Anhang	25
8. Quellenverzeichnis	28

Abkürzungsverzeichnis

GTP	Guanosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GEF	GTP-Austauschfaktor
GAP	GTPase aktivierendes Protein
G _{αq}	α-Untereinheit des G _q -Proteins
PLCβ	β-Isoform der Phospholipase C
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
DAG	Diacylglycerol
ERHBD	Hormonbindende Domäne des Östrogenrezeptors
TEP	Totalendoprothese
SA	<i>Staphylokokkus aureus</i>
SE	<i>Staphylokokkus epidermidis</i>
RAW	Name einer Zelllinie von Makrophagen
FACS	Fluorescence activated cell sorting
PBS	Phosphate buffered saline
BSA	Bovines Serum Albumin
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
TRAP	Tartratresistente saure Phosphatase
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
RANKL	Receptor activator of nuclear factor of activated B-cells ligand
TCA	2,4,6-Trichloranisol
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
cDNA	complementary DNA
RT	Reverse Transkriptase
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E

1. Einleitung

Bis zu meinem Abitur im Sommer 2019 besuchte ich das Gymnasium im baden-württembergischen Isny. Mein Interesse lag schon seit der Mittelstufe auf den Naturwissenschaften, in der Oberstufe entwickelte sich jedoch eine besondere Begeisterung für die Biologie. Durch meinen Lehrer auf den Wettbewerb aufmerksam gemacht, nahm ich deshalb am Auswahlverfahren zur Biologieolympiade 2019 teil, wobei ich die dritte Runde in Kiel erreichte. Hier bekam ich vom Förderverein der IBO die Möglichkeit, ein einmonatiges Praktikum im Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Heidelberg zu absolvieren. Dieser Fachbereich gehört dabei gemeinsam mit verwandten Gebieten, etwa der Virologie, zum Institut für Infektiologie, welches sich als Teil des sogenannten Theoretikums der Universität im Neuenheimer Feld befindet. Das Praktikum durfte ich in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kubatzky antreten, deren Forschungsschwerpunkt auf dem Toxin des Bakteriums *Pasteurella multocida* (PMT) liegt. Untersucht werden dabei hauptsächlich die Effekte des Toxins auf die Osteoklastogenese sowie dessen Auswirkungen auf diverse intrazelluläre Signalwege.

Während des Praktikums durfte ich an zwei Projekten mitarbeiten, wobei sich ersteres um die Einflüsse eines G-Proteins, dem sogenannten G_q-Protein, auf zelluläre Abläufe wie den Stoffwechsel drehte. Ziel war es, herauszufinden, ob sich mittels dieses Moleküls die beobachteten Effekte des PMTs auf Osteoklastogenese und Metabolismus erklären lassen. Hierfür wurden zahlreiche Versuche, beispielsweise hinsichtlich der Differenzierungsfähigkeit oder Proteinexpression, durchgeführt. Das zweite Projekt befasste sich mit von zwei Bakterienarten, *Staphylokokkus aureus* und *Staphylokokkus epidermidis*, verursachten Infektionen nach dem Einsetzen orthopädischer Implantate. Die Absicht ist, die Hintergründe der durch die Infektion induzierten Verschiebung der Knochenhomöostase in Richtung Knochenabbau aufzuklären. Bei mehreren durchgeführten Experimenten, etwa bezüglich der Genexpression, durfte ich dabei die Kontrollproben ansetzen.

2. Projektinformationen

2.1 Einfluss des G_q -Proteins auf Osteoklastogenese und Metabolismus

Im Mittelpunkt des Praktikums stand die Untersuchung des sogenannten G_q -Proteins, welches zu der Familie der heterotrimeren G-Proteine zählt. Zentrale Eigenschaft dieser für viele Signaltransduktionswege essenziellen Moleküle ist die Zusammensetzung aus drei Untereinheiten, der sogenannten α -, β - und γ -Untereinheit. Die Regulation der Aktivität heterotrimerer G-Proteine erfolgt über die Bindung von Guanosindiphosphat (GDP) bzw. Guanosintriphosphat (GTP). Während im inaktiven Zustand GDP an einen Komplex aus allen drei Untereinheiten gebunden ist, führt die Aktivierung über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) zum Austausch von GDP durch GTP, welcher unter Beteiligung von GTP-Austauschfaktoren (GEFs) abläuft. Die Folge ist eine Destabilisierung des Heterotrimers, welche letztlich die Dissoziation des Proteins in eine GTP-gebundene α - sowie eine $\beta\gamma$ -Untereinheit bewirkt. Beide sind nun in der Lage, verschiedene intrazelluläre Signalwege zu beeinflussen. Da es sich bei der α -Untereinheit im Regelfall um eine allosterisch regulierte GTPase handelt, führt die Aktivierung durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) zur Hydrolyse von GTP zu GDP. Das G-Protein verfällt somit wieder in den inaktiven Zustand, wobei die Reassoziierung der Untereinheiten zu einem Heterotrimer erfolgt.¹

Strukturell setzt sich die α -Untereinheit des G_q -Proteins ($G_{\alpha q}$) größtenteils aus einer C-terminalen GTPase- sowie einer N-terminalen helikalen Domäne zusammen. Während erstere Voraussetzung für die GTP-Hydrolyse ist, wird letztere sowohl mit einer Verstärkung der Hydrolyse-Aktivität als auch mit der spezifischen Bindung an Zielproteine in Verbindung gebracht. Weiterhin von zentraler Bedeutung sind die drei sogenannten switch-Regionen (switch I, II und III), welche durch Konformationsänderungen Einfluss auf die Affinität der Untereinheit für GTP bzw. GDP nehmen können. Zusätzliche Regionen ermöglichen den Kontakt mit anderen Proteinen sowie GAPs, posttranslationale Modifikationen am N-Terminus dienen der Membranlokalisation von $G_{\alpha q}$.²



Abbildung 2.1: Domänenstruktur der α -Untereinheit des G_q -Proteins

Lineare Darstellung des Aufbaus von $G_{\alpha q}$. Von zentraler Bedeutung sind die zwischen der helikalen und der GTPase-Domäne verorteten Switch-Regionen, in welchen Konformationsänderungen stattfinden, um GDP bzw. GTP binden zu können.

¹ Berg, Jeremy et al. (2018): *Stryer Biochemie*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, Berlin. S. 472-482.

² Sánchez-Fernández, Guzman et al. (2014): *$G_{\alpha q}$ signalling: The new and the old*. Cellular Signalling, 26: 833-848.

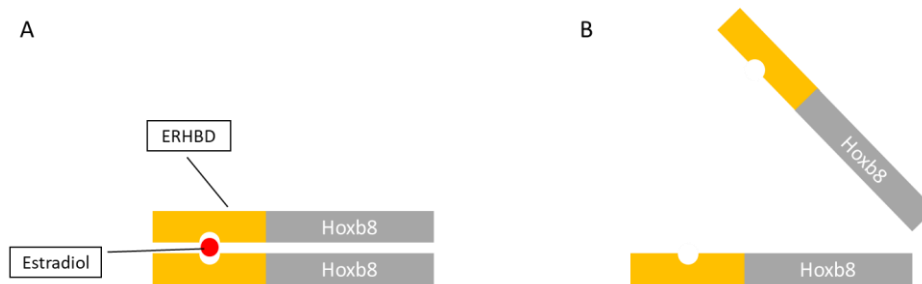


Abbildung 2.2: Regulation der Differenzierung in Hoxb8-Zellen

Mit ERHBD fusionierte Hoxb8-Transkriptionsfaktoren. (A) Das Vorkommen von Estradiol führt zu einer Komplexbildung, welche den Transkriptionsfaktor inhibiert – die Differenzierung der Zellen ist gestoppt. (B) Ohne Estradiol liegen die Hoxb8-Faktoren einzeln vor und können im Zellkern wirken, wodurch die Differenzierung beginnt.

Allein die GTP gebundene α -Untereinheit des G_q -Proteins interagiert mit mehr als 20 verschiedenen Zielproteinen, beispielsweise ist sie in der Lage, die β -Isoformen der Phospholipase C ($PLC\beta$) zu aktivieren. Diese hydrolysieren Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), wobei sowohl IP_3 als auch DAG als bedeutende *second messenger* fungieren. Weiterhin konnte eine $G_{\alpha q}$ -vermittelte Aktivierung von sogenannten Rho-GTPasen nachgewiesen werden, welche Einfluss auf Zelladhäsion, -migration oder Ablauf des Zellzyklus nehmen.³

Neben diesen schon seit längerer Zeit bekannten G_q -abhängigen Signalwegen konnten Untersuchungen von C. Benincá *et al.* (2014) die Lokalisation des Heterotrimers an der äußeren sowie das Vorkommen der α -Untereinheit an der inneren Mitochondrienmembran eindeutig belegen. Versuche mit $G_{\alpha q}$ -Knockouts zeigten, dass dieses entscheidenden Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien, beispielsweise die Ausprägung der Cristae, nehmen kann. Zusätzlich wurde eine Verringerung des zellulären Adenosintriphosphat (ATP)-Gehalts sowie ein herabgesetztes Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) in den Mitochondrien festgestellt, sofern die Expression von $G_{\alpha q}$ verhindert war.⁴

Um die Auswirkungen des G_q -Proteins spezifisch auf die Osteoklastogenese sowie den Immunmetabolismus untersuchen zu können, wurden Hoxb8-Zellen als Modell herangezogen. Hoxb8-Transkriptionsfaktoren kontrollieren Zellwachstum und -differenzierung. Besonderes Merkmal der genutzten Zellen ist, dass in ihnen diese Transkriptionsfaktoren mit der hormonbindenden Domäne des Estradiol-Rezeptors (ERHBD) zu einem Komplex fusioniert sind (Abb. 2.2). Somit wird eine gezielte Steuerung der Differenzierung der Zellen ermöglicht, da diese nur initiiert werden kann, sofern kein

³ Sánchez-Fernández, Guzman et al. (2014): *G α_q signalling: The new and the old*. Cellular Signalling, 26: 833-848

⁴ Benincá, Christiane et al. (2014): *A new non canonical pathway of G α_q protein regulating mitochondrial dynamic and bioenergetics*. Cellular Signalling, 26: 1135-1146

Estradiol vorliegt.⁵ Die Effekte des G_q-Proteins wurden anhand von drei unterschiedlichen Modifikationen verglichen: Eine unveränderte Zellreihe, in der Folge als Hoxb8 parental aufgeführt, diente zur Überprüfung der normalen Auswirkungen als Kontrolle. Zusätzlich wurden mittels retroviraler Transduktion zwei weitere, genetisch modifizierte Zellreihen etabliert. In den als Hoxb8 G_q bezeichneten Zellen wird das Zielprotein überexprimiert, indem über pMX IRES CD4 Puro-Plasmide zusätzliche Gensequenzen für dieses eingeschleust wurden. Die dritte Zellreihe, Hoxb8 G_q QE, imitiert hingegen den Effekt des *Pasteurella multocida*-Toxins (PMT) auf die G_{αq}-Untereinheit: Während PMT die Deamidierung eines Glutamins in der switch II-Region des Proteins hervorruft, wurde im Modell auf genetischer Ebene der Austausch des entsprechenden Glutamins gegen Glutamat veranlasst. Die Folge beider Einflüsse ist eine Konformationsänderung der switch-Region, welche dazu führt, dass dauerhaft GTP gebunden bleibt, wodurch das Protein konstitutiv aktiviert wird. Ziel war somit, herauszufinden, ob sich die beobachteten Effekte des PMT auf die Osteoklastogenese über einen G_q-vermittelten Signalweg erklären lassen.

2.2 Infektionen nach orthopädischen Implantaten

Das operative Einsetzen orthopädischer Implantate, etwa Knie- oder Hüfttotalendoprothesen (TEPs), birgt hinsichtlich postoperativer Infektionen viele Risiken. Besonders häufig sind für diese die Erreger *Staphylokokkus aureus* (SA) oder *Staphylokokkus epidermidis* (SE) verantwortlich, welche sich in Form eines Biofilms auf dem implantierten Fremdkörper anlagern. Die Folge ist zumeist die Entstehung einer chronischen Infektion, wobei das Immunsystem oftmals nicht in der Lage ist, diese effizient zu bekämpfen. Ein großes, daraus resultierendes Problem ist die mit der Interaktion von Immunzellen und Osteoklasten zusammenhängende vermehrte Resorption von Knochensubstanz in den betroffenen Gebieten. Dies kann zum Beispiel eine Lockerung des Implantats nach sich ziehen, wodurch ein weiterer operativer Eingriff unausweichlich wird.⁶

Absicht der Forschung ist es daher, herauszufinden, auf welche Weise eine chronische Infektion die Verschiebung der Knochenhomöostase zugunsten des Knochenabbaus bewirkt, um neue Ansätze für therapeutische Maßnahmen zu entwickeln. Als Modell für die dabei durchgeführten Versuche dienten sogenannte RAW-Zellen, ein spezieller Makrophagentyp. Das Grundprinzip aller Experimente bildete die Stimulation der Zellen mit verschiedenen Medien. Eingesetzt wurden etwa durch Kultivierung von SA und SE gewonnene Überstände sowie weiteren Substanzen, denen ein potentieller Einfluss auf den Infektionsverlauf zugeschrieben wird.

⁵ Di Ceglie, Irene et al. (2017): *Genetic modification of ER-Hoxb8 osteoclast precursors using CRISPR/Cas9 as a novel way to allow studies on osteoclast biology*. Journal of Leukocyte Biology, 101: 957-966

⁶ Seebach, Elisabeth und Katharina Kubatzky (2019): *Chronic implant-related bone infections – can immune modulation be a therapeutic strategy?* Frontiers in Immunology, 10: Article 1724

3. Methoden

3.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse und Sortierung von Zellen gemäß ihrer Größe, Struktur oder spezifischer Oberflächenmarker. Anwendung fand das Zytometer etwa zur Überprüfung des Zustandes der zu Beginn des Praktikums aufgetauten Zellen oder zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität der unterschiedlichen Hoxb8-Zelltypen (MitoTracker-Assay, Kapitel 3.2).

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Streuung des Lichts durch Zellen, welche einzeln einen Laserstrahl passieren. Je nach ihrer Beschaffenheit unterscheidet sich die Brechung des Laserstrahls, was von verschiedenen Detektoren innerhalb des Geräts wahrgenommen wird. Die Größe der Zelle kann somit durch das sogenannte Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) festgestellt werden, dessen Intensität durch einen FSC-Detektor erfasst wird. Gleichermäßen kennzeichnend für die Komplexität bzw. Granularität einer Zelle ist das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), das auf einen SSC-Detektor trifft. Die so über eine Zellpopulation gewonnenen Informationen ermöglichen bereits deren Darstellung in einem zweidimensionalen (2D-) Histogramm, auf dem die Zellen gemäß ihrer Größe und Komplexität aufgetragen werden. Darüber hinaus verfügen FACS-Geräte über weitere Detektoren, welche durch Fluoreszenz emittiertes Licht unterschiedlicher Wellenlängen erfassen können. Dies ermöglicht eine zusätzliche Unterscheidung der Zellen anhand von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern, welche an spezifische Oberflächenmarker binden. Das Vorliegen eines Fluoreszenzsignals beweist somit das Vorkommen des jeweiligen Markers auf der Zelle, wohingegen das Fehlen dessen Nichtexistenz nahelegt.⁷

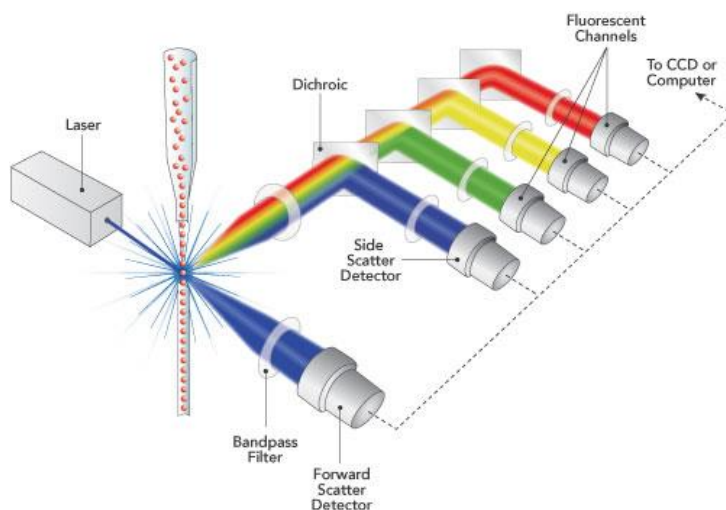


Abbildung 3.1: Durchflusszytometer

Schematischer Aufbau Durchflusszytometer. Die Zellen passieren einzeln den Laserstrahl, wobei die Brechung des Lichts von dem FSC- und dem SSC-Detektor erfasst wird. Zusätzliche Fluoreszenz-Detektoren ermöglichen weitere Untersuchungen.

⁷ Gstraunthaler, Gerhard und Toni Lindl (2013): *Zell- und Gewebekultur*. Springer-Verlag Deutschland GmbH, Berlin. S. 212-214.

Ein Einsatzzweck des FACS war die Kontrolle des Zustandes der Hoxb8-Zellen, nachdem sie zu Beginn des Praktikums aufgetaut wurden. Hierfür müssen von den parentalen, den G_q sowie den G_q QE-Zellen 2,5 x 10⁵ Zellen entnommen und in Eppendorf-Röhrchen überführt werden. Im Anschluss erfolgt ein dreimaliges Waschen mit phosphate buffered saline (PBS), wobei sich jeder Schritt aus einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 30 Sekunden, dem Absaugen des Überstandes sowie dem Resuspendieren der Zellpellets in je 500 µl PBS zusammensetzt. Nach Abschluss des Waschens müssen die Proben nochmals unter identischen Bedingungen zentrifugiert werden, um das PBS durch je 100 µl 2%-iges Bovines Serum Albumin (BSA) in PBS ersetzen zu können. Dabei ist es notwendig, die Ansätze für 10 Minuten auf Eis zu inkubieren. Zweck dieses Schrittes ist die Minimierung des Risikos einer unspezifischen Bindung der fluoreszenzgekoppelten Antikörper. Diese, in dem Fall hCD4-Antikörper, können im Anschluss in einem Volumen von 1,5 µl in jedes Proben-Röhrchen gegeben werden. Der Bindungsvorgang benötigt ungefähr 60 Minuten und sollte erneut unter Lichtausschluss auf Eis stattfinden. Abschließend erfolgt erneut ein dreiteiliger Waschgang mit PBS, wobei überschüssige Antikörper entfernt werden, sowie der Transfer der Proben in FACS-Gefäße.

3.2 MitoTracker-Assay und Zellproliferation

Der MitoTracker-Assay ermöglicht die Überprüfung der mitochondrialen Aktivität in Zellen und wird mithilfe des FACS-Gerätes durchgeführt.

Benötigt werden je Probe 2 x 10⁶ Zellen, die in Falcon-Röhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert werden. Im Anschluss erfolgt das Absaugen der Überstände, das Resuspendieren der Zellpellets in einem Milliliter High Glucose-Medium (Anhang) sowie der Transfer in Eppendorf-Röhrchen. Nach 30 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator werden in jede Probe 10 µl MitoTracker (Verdünnung 1:1000 mit PBS) pipettiert, woraufhin eine erneute, dreißigminütige Inkubation notwendig ist. Abschließend müssen die Zellen dreimal mit 500 µl PBS gewaschen und in FACS-Gefäße überführt werden.

Da dieses Vorgehen, insbesondere bei mehreren Proben, sehr zeitintensiv ist, wurde getestet, ob der Assay auch ohne die drei Waschschrte nach der MitoTracker-Inkubation durchgeführt werden kann. Nachdem die Ergebnisse dies bestätigten, wurden die Zellen bei den im Folgenden beschriebenen Ansätzen ohne zusätzliches Waschen direkt im FACS analysiert.

Um die Rolle des G_q-Proteins im mitochondrialen Metabolismus sowie dessen Auswirkungen auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurde mit den Hoxb8-Zelltypen ein spezieller Versuchsansatz vorbereitet, welcher über mehrere Tage hinweg einerseits die verschiedenen G_q-Varianten vergleicht und andererseits den Einfluss mehrerer Glucosekonzentrationen auf die Zellen darstellen soll.

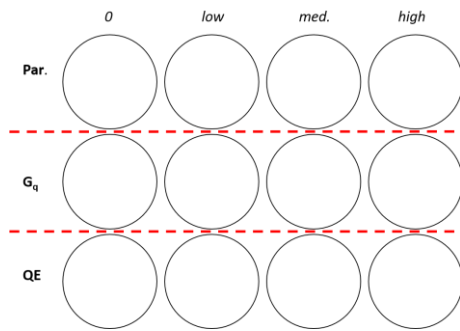


Abbildung 3.2: MitoTracker-Versuchsansatz

Ansatz für den MitoTracker-Assay. Die drei Zelltypen befinden sich in den Zeilen, die Spalten unterscheiden sich durch die Glucosekonzentration im Medium. In dieser Anordnung wurden drei 24-Well-Platten vorbereitet, um über die identische Anzahl an Tagen hinweg messen zu können.

Hierfür werden von jedem Zelltyp viermal 5×10^5 Zellen entnommen und in Falcon-Röhrchen bei 1300 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen der Überstandes müssen die Zellpellets jeweils in 10 ml Medium drei verschiedener Glucosekonzentrationen resuspendiert werden (Anhang). In der Folge werden in jedes Reaktionsgefäß 10 μ l β -Estradiol, in die entsprechenden Proben 500 μ l Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor (GM-CSF) und zu den G_q - bzw. G_q QE-Zellen 50 μ l Puromycin pipettiert. Während das Estradiol die weitere Zelldifferenzierung unterbindet, sorgt das Antibiotikum für eine Selektion der Zellen mit Plasmid, auf welchem die Gene für die jeweilige G_q -Variante liegen. Sind diese Vorbereitungen beendet, können die Zellen in einem Volumen von je einem Milliliter in drei 24-Well-Platten (day 1-3) ausgelegt werden (Abb. 3.2). Über einen Zeitraum von drei Tagen ist es nun möglich, den MitoTracker-Assay zeitsparend durchzuführen, da lediglich 10 μ l des Reagenz hinzugefügt und die Zellen für 30 Minuten inkubiert werden müssen. Nach Transfer in FACS-Röhrchen kann darauf direkt mit der Analyse begonnen werden. Um dabei nicht nur die mitochondriale Aktivität, sondern auch die Zellproliferation zu erfassen, darf jede Probe nur für einen festgelegten Zeitraum (30 Sekunden) im FACS gemessen werden, welches automatisch die den Laserstrahl passierenden Zellen zählt.

3.3 Der CellTiter Glo (CTG)-Assay

Ähnlich dem MitoTracker-Assay ist auch der CellTiter Glo-Assay dafür konzipiert, die metabolische Aktivität von Zellen zu überprüfen. Statt auf mitochondriale Stoffwechselprozesse fokussiert dieser sich jedoch auf das in den Zellen vorliegende ATP, wofür hier das natürlicherweise in Leuchtkäfern vorkommende Luciferin genutzt wird. In einer endergonen, also ATP-verbrauchenden, Reaktion kann dieses durch das Enzym Luciferase in Oxyluciferin umgesetzt werden, wobei Licht emittiert wird (Abb. 3.3). Das hierfür benötigte ATP stammt beim CTG-Assay aus den Zellen, welche für dessen Freisetzung lysiert werden müssen. Somit lässt sich von der Intensität des bei der Reaktion freigesetzten Lichts ein direkter Rückschluss auf den zellulären ATP-Gehalt ziehen. Um den CTG-Assay für die Hoxb8-Zellen über mehrere Tage hinweg unkompliziert durchführen zu können, wurde auch hier ein größerer Versuch angesetzt. Dabei werden auf einer 96-Well-Platte je Well 5×10^4 Zellen ausgelegt, wobei pro Zelltyp Triplikate zu pipettieren sind (Abb. 3.3).

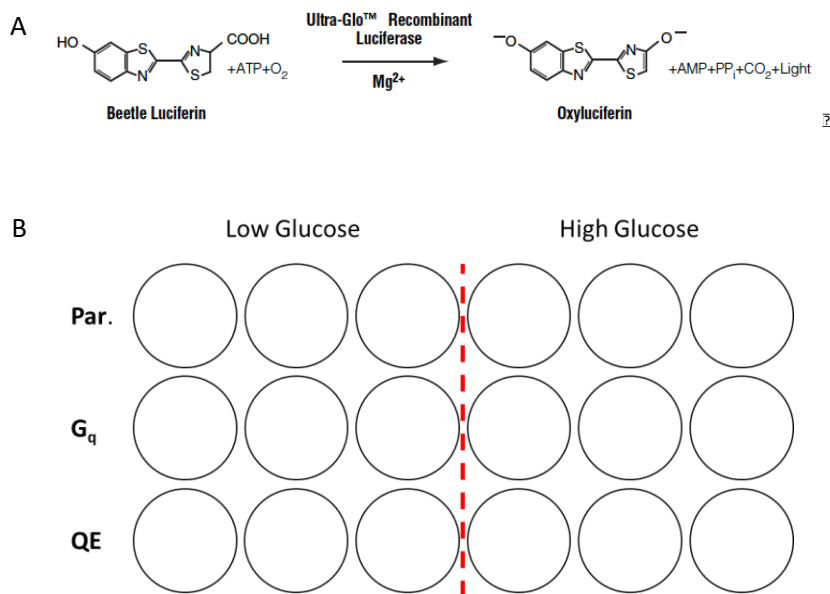


Abbildung 3.3: Grundprinzip und Versuchsansatz des MitoTracker-Assays

Prinzipien des CTG-Assays. (A) Dem Versuch zugrundeliegende Reaktion: Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin. (B) Hoxb8-CTG-Ansatz für einen Tag: Je Zelltyp und Glucosekonzentration im Medium werden Triplikate aufgetragen.

Gleichzeitig erfolgt eine Kultivierung der Zellen in zwei Medien unterschiedlicher Glucosekonzentrationen (Anhang), wobei der Ansatz wieder so ausgelegt ist, dass an drei Tagen gemessen werden kann.

Für die Durchführung des Assays müssen 50 µl der gewünschten Zellen in eine weiße 96-Well-Platte überführt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Im Anschluss werden 50 µl des CTG-Reagenz in jedes Well gegeben, woraufhin die Platte für zwei Minuten auf den Shaker gestellt werden sollte. Ist dieser Schritt beendet, kann die eigentliche Reaktion während einer zehnminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss ablaufen. Abschließend erfolgt die Messung der Intensität des freigesetzten Lichts mithilfe eines Luminometers.

3.4 TRAP-Assay

Der tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-Assay dient dem Nachweis eines speziellen Enzyms, der sogenannten tartratresistenten sauren Phosphatase, durch eine Farbreaktion. Diese wird von Osteoklasten sezerniert, um Knochensubstanz resorbieren zu können. Mithilfe des TRAP-Assays ist es also möglich, Osteoklasten unter dem Mikroskop eindeutig von anderen Zelltypen zu differenzieren.

Der TRAP-Assay wurde sowohl mit den Hoxb8-Zellen als auch mit den RAW-Makrophagen durchgeführt. Ziel bei ersteren war es, den Einfluss der jeweiligen G_q-Variante auf die Osteoklastogenese zu untersuchen, während mit den RAW-Zellen die Auswirkung der bakteriellen Medien sowie verschiedener anderer Stimuli auf diesen Prozess festgestellt werden sollte.

Für den TRAP-Assay bei den Hoxb8-Zelllinien müssen die Zellen resuspendiert und je Zelltyp in einer Zahl von 4×10^5 entnommen werden. Nach Zentrifugation bei 1300 rpm für fünf Minuten wird das überschüssige Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit jeweils 500 μ l PBS gewaschen. Ist dieser Schritt, der dem Entfernen des restlichen β -Estradiols und GM-CSFs dient, abgeschlossen, muss der Überstand entsorgt und das Zellpellet in BMDM-Medium (Anhang) resuspendiert werden. Auf das anschließende Auslegen in eine 24-Well-Platte folgt das Stimulieren der Ansätze. Hierfür müssen in jedes Well 25 ng/ml Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF) und in die RANK-Ligand (RANKL)-Spalte 50 ng/ml RANKL pipettiert werden. Die Differenzierungszeit liegt daraufhin zwischen fünf und sieben Tagen, wobei der Ansatz am dritten sowie am fünften Tag mit M-CSF und RANKL restimuliert werden muss.

Ist die Differenzierungsphase abgeschlossen, kann die Färbung erfolgen, für welche das Leukocyte Acid Phosphatase Kit von Sigma Aldrich eingesetzt wurde. In einem ersten Schritt wird das noch in den Wells vorliegende Medium abgesaugt und durch je 400 μ l Fixierlösung ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Sekunden wird diese ebenfalls entfernt und in jedes Well 1000 μ l bidestilliertes, auf 37 °C erwärmtes Wasser pipettiert. Der zweite wesentliche Schritt des TRAP-Assays ist in der Folge die eigentliche Färbung der Zellen, die mittels einer auf 37 °C vorgewärmten Färbelösung erfolgt. Von dieser werden, nach dem Absaugen des Wassers, jeweils 400 μ l in die einzelnen Wells gegeben. Damit die Farbreaktion vollständig ablaufen kann, muss der Versuchsansatz daraufhin für 30 bis 60 Minuten bei 37 °C inkubiert werden. Der Fortschritt der Reaktion lässt sich dabei mit dem Mikroskop kontrollieren, ist die Färbung abgeschlossen, kann die Lösung abgenommen werden. Nach dreimaligen Waschen mit bidestilliertem Wasser werden die Wells unter dem Abzug getrocknet, woraufhin der Erfolg der Osteoklastogenese mittels des Mikroskops untersucht werden kann.

3.5 BCA-Assay

Der Bicinchoninsäure-Assay ermöglicht das Ermitteln der Konzentrationen verschiedener Proteinlösungen. Dies ist etwa von zentraler Bedeutung, um Proben für den Western Blot vorbereiten zu können.

Für den Versuch verwendet wurde das Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher. Zu Beginn erfolgt dabei die Herstellung des BCA-Reagenz durch eine 1:50-Mischung der mitgelieferten Lösungen A und B. Die Menge ist dabei abhängig von der Anzahl der Proben, benötigt werden 100 μ l Reagenz pro befülltem Well. In der Folge werden die Protein-Proben mit PBS 1:5 verdünnt und als Duplikate zu je 10 μ l auf eine 96-Well-Platte aufgetragen (Abb. 3.4).

Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6	Sample 7	Sample 8	Sample 9	Sample 10	Sample 11	Sample 12
Standard 2000	Standard 1500	Standard 1000	Standard 750	Standard 500	Standard 250	Standard 125	Standard 62,5	Standard 31,25	Standard 15,6	PBS	PBS
Standard 2000	Standard 1500	Standard 1000	Standard 750	Standard 500	Standard 250	Standard 125	Standard 62,5	Standard 31,25	Standard 15,6	PBS	PBS

Abbildung 3.4: Pipettierschema des BCA-Assays

Auftragungsschema für die 96-Well-Platte. Die unteren zwei Zeilen enthalten BSA bekannter Verdünnungen (Anhang), damit die Konzentration der oben aufgetragenen Proben anhand einer Standardkurve ermittelt werden kann.

Um die Konzentration später anhand einer Standardkurve ermitteln zu können, wird auch eine Verdünnungsreihe mit BSA in bekannten Konzentrationen hinzugefügt. Abschließend müssen vier Wells als Negativkontrolle mit 10 µl PBS befüllt werden. Nach Zugabe von je 100 µl des bereits angesetzten BCA-Reagenz wird der Versuchsansatz für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt daraufhin photometrisch mittels eines ELISA-Readers.

3.6 Western Blot

Der Western Blot wird verwendet, um Proteine spezifisch nachzuweisen und zu quantifizieren. Sowohl bei den Hoxb8-Zellen als auch bei den RAW-Ansätzen war das Ziel, die Synthese bestimmter, für den jeweiligen Kontext relevanter Proteine zu überprüfen.

Um einen Western Blot durchführen zu können, ist es zunächst notwendig, die Zellen zu lysieren, um die darin enthaltenen Proteine freizusetzen. Hierfür werden 5 ml jedes Zelltyps aus den Kulturflaschen entnommen und in Falcon-Röhrchen überführt. Nach der anschließenden fünfminütigen Zentrifugation bei 1300 rpm kann der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen werden. In der Folge wird das überschüssige PBS entfernt und die Zellen in 500 µl Lyse-Puffer (RIPA), welcher zum Schutz der Proteine mit PhosStop (Phosphatase-Inhibitor, 1:50) und einem Protease-Inhibitor (1:10) versehen ist, resuspendiert. Damit die Lyse vollständig abgeschlossen werden kann, müssen die Proben daraufhin für 45 Minuten bei 4 °C inkubiert werden. Den letzten Schritt bildet eine 20 Minuten dauernde Zentrifugation bei 4 °C, die dafür sorgt, dass Membranreste und anderer Zellschrott aus der Lösung entfernt werden. Der Überstand muss folglich abgenommen, in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren werden, während das Pellet zu verwerfen ist.

Um die Konzentration der so erhaltenen Proteinproben bestimmen zu können, wird der BCA-Assay (Kapitel 3.5) angewendet. In der Folge ist es möglich, jede einzelne Probe unter Verwendung von Lämmli-Puffer auf einen Proteingehalt von 10 µg bei einem Endvolumen von 20 µl einzustellen. In einem ersten Denaturierungsschritt werden die Proteinproben dann für zwei Minuten auf 95 °C erhitzt.

Sind diese Vorbereitungen abgeschlossen, können die gewünschten Proben zusammen mit einem Marker (NEB ColourPlus Prestained Protein Ladder) einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unterzogen werden. Hierfür ist es notwendig, 7 µl des Markers und 20 µl der vorbereiteten Proben auf ein Polyacrylamid-Gel aufzutragen. Durch das Anlegen einer Spannung von 120 V über eine Dauer von ungefähr 90 Minuten werden die Proteine ihrer Größe nach auf dem Gel aufgetrennt. Im nächsten Schritt erfolgt der eigentliche Blot, also der Transfer der nun aufgetrennten Moleküle von dem instabilen Gel auf eine Nitrocellulose-Membran. Dafür ist es zunächst nötig, vier Whatman-Papers, die Membran, das Gel und erneut vier Whatman-Papers übereinander zu legen, wobei sämtliche Bestandteile mit Blot-Puffer anzufeuchten sind. Im Anschluss erfolgt das Anlegen einer Spannung von ca. 130 V über 60 Minuten, was bewirkt, dass die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen werden.

Nach Abschluss des Blots kann eine Färbung der Membran mit 0,5% Ponceau-S in 3% 2,4,6-Trichloranisol (TCA) durchgeführt werden, um den Erfolg der SDS-PAGE und des Blots zu kontrollieren. Im nächsten Schritt muss die Membran für eine Stunde mit 5% BSA in Tris-buffered saline with Tween20 (TBST) geblockt werden, um das Risiko einer späteren unspezifischen Bindung der Primärantikörper zu minimieren. Entsprechend des zu detektierenden Proteins wird dieser daraufhin hinzugegeben und mit der Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Um unspezifisch gebundene bzw. noch frei vorliegende Primärantikörper zu entfernen, muss die Membran am darauffolgenden Tag dreimal für 10 Minuten mit TBST gewaschen werden. Die abschließende Färbung erfolgt mittels eines Sekundärantikörpers, welcher einerseits artspezifisch an die Primärantikörper bindet und andererseits mit einem Enzym, der sogenannten Meerrettichperoxidase, gekoppelt ist. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur werden überschüssige Sekundärantikörper in drei zehnmütigen Waschschrinen mit TBST entfernt. Die abschließende Entwicklung erfolgt mit dem WesternBright ECL Kit von Advansta, hierbei wird das in dem Kit enthaltene Peroxid von der an die Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase unter Fluoreszenz umgesetzt. Nach einer Reaktionszeit von einer Minute kann diese mittels einer speziellen Kamera aufgenommen und ausgewertet werden. Die freigesetzte Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge des untersuchten Proteins, d.h. je stärker die auf der Aufnahme zu sehende Bande, desto mehr Protein war in den Zellen vorhanden.

3.7.1 cDNA-Synthese aus mRNA

Ziel der Isolation von mRNA sowie deren reverser Transkription in cDNA ist es, in einem nächsten Schritt durch eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) die Expression bestimmter Gene überprüfen zu können. Durchgeführt wurde dieses Verfahren, um die Einflüsse verschiedener Stimuli auf die Differenzierung von RAW-Zellen in Osteoklasten zu untersuchen.

Hierfür werden zunächst auf einer 6-Well-Platte 7×10^5 Zellen pro Well ausgelegt und entsprechend stimuliert: Die hier angesetzte Negativkontrolle erhält keine Stimulation, während zu der Positivkontrolle jeweils 5 μ l RANKL pipettiert werden. Nach einer Differenzierungszeit von zwei Tagen müssen die Zellen mit PBS gewaschen, resuspendiert und in ein Eppendorf-Röhrchen werden. Eine Zentrifugation bei 13000 rpm für eine Minute erlaubt anschließend das Verwerfen des Überstandes, woraufhin die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufzubewahren sind. Die Isolation der RNA aus den so vorbereiteten Zellen wird mit dem innuPREP RNA MiniKit 2.0 von Analytik Jena durchgeführt, wobei die Lyse und Aufreinigung in drei Filtrationsschritten nach Herstellerprotokoll erfolgt. Im Anschluss ist es nötig, die Menge der isolierten RNA zu bestimmen, was mithilfe einer NanoDrop-Messung möglich ist. Den nächsten Schritt bildet die Synthese von cDNA aus den RNA-Proben. Hierfür wird ein Mastermix aus RNA-Template, Reaktionspuffer, Primern und weiteren Komponenten (Anhang) hergestellt. Pro RNA-Probe werden dabei zwei Ansätze vorbereitet: Zum einen die normale Zusammensetzung, bei der auch das für die cDNA-Synthese benötigte Enzym Reverse Transkriptase (RT) enthalten ist, zum anderen eine no-RT-Probe, bei der das Enzym fehlt. Die Absicht hinter diesem zusätzlichen Ansatz ist die Kontrolle der eigenen Arbeit – findet sich bei der späteren PCR DNA in den no-RT-Proben, so muss es sich dabei um genomische DNA handeln, wodurch eine eventuelle Kontamination direkt entlarvt werden kann. Die cDNA-Synthese läuft anschließend in einem Thermocycler ab, wobei die Proben zunächst für 60 Minuten bei 55°C und abschließend für fünf Minuten bei 99°C inkubiert werden. Bis zur weiteren Verwendung ist es nun erforderlich, die Proben bei -20°C zu lagern.

3.7.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um den Erfolg der zuvor beschriebenen cDNA-Synthese zu überprüfen, ist es sinnvoll, zunächst eine konventionelle PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchzuführen, da hierbei Verunreinigungen oder andere Probleme unkompliziert festgestellt werden können. Zu Beginn ist die Verdünnung der cDNA-Proben mit 20 μ l Wasser nötig, im Anschluss erfolgt die Herstellung eines Mastermix aus Primern, einer taq-Polymerase, Reaktionspuffer und anderen Bestandteilen (Anhang). Jeweils 2 μ l cDNA-Template werden in 23 μ l Mastermix pipettiert, woraufhin die PCR im Thermocycler ablaufen kann.

3.7.3 Gelelektrophorese

Um das Ergebnis der PCR zu kontrollieren, werden die amplifizierten Proben einer Gelelektrophorese unterzogen. Das Funktionsprinzip entspricht hier der SDS-PAGE (Kapitel 3.6), wobei lediglich ein anderes Gel sowie DNA statt Proteinen eingesetzt wird.

Zu verwenden ist ein zweiprozentiges Agarose-Gel, wobei zwei Gramm Agarose in 100 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer gelöst und aufgeköcht werden. Nach dessen Gießen und Aushärten können die Probenflaschen mit 20 µl der amplifizierten und angefärbten cDNA sowie einem Marker beladen werden, die Laufzeit beträgt anschließend etwa 60 Minuten bei 100 V. Die Auswertung der Elektrophorese erfolgt mittels UV-Licht.

3.7.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Eine qPCR ermöglicht Aussagen über die anfänglich vorhandene Menge an cDNA-Template. Grundlegend hierfür ist die Annahme, dass die Produktmenge direkt von der zu Beginn eingesetzten Template-Menge abhängig ist. Neben normalen dNTPs wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-GREEN verwendet, welcher nach Binden an einen DNA-Doppelstrang Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Je mehr Template ursprünglich also vorhanden war, desto früher hat die Fluoreszenzintensität einen bestimmten Schwellenwert erreicht.

Vor Ablauf der Reaktion ist die Herstellung eines Mastermix aus Wasser, Primern sowie dem qPCR BIO SyGreen-Mix HI-ROX erforderlich. Gemeinsam mit 2 µl des cDNA-Templates werden 18 µl Mastermix pro Well in eine 96-Well-Platte ausgelegt. Das verwendete qPCR-Programm (Anhang) benötigt für die Amplifikation zwei Stunden, woraufhin die Daten ausgewertet werden können.

4. Ergebnisse

4.1 MitoTracker-Assay und Proliferation Hoxb8

Nachdem die Versuchsansätze an drei einzelnen Tagen im FACS gemessen wurden, zeigt sich bezüglich der Auswirkungen der unterschiedlichen Glucosekonzentrationen auf die mitochondriale Aktivität der einzelnen Zellen, dass, bis auf wenige Ausnahmen bei den QE-Zellen, im glucoseärmsten Medium die intensivste Fluoreszenz nachweisbar ist (Abb. 4.1).

Werden die APC-Werte (Fluoreszenzintensität) der Zellen aus den unterschiedlichen Medien gemittelt, so lassen sich die drei Zelltypen direkt miteinander vergleichen (Abb. 4.2 A): Während zu Beginn noch deutliche Unterschiede in der APC-Intensität feststellbar sind, relativieren sich diese am dritten Tag der Messung. Weiterhin auffällig ist das mit fortschreitender Zeit konstante Absinken der emittierten Fluoreszenz, wobei die parentalen Hoxb8-Zellen ebenso wie die G_q- und QE-Varianten betroffen sind.

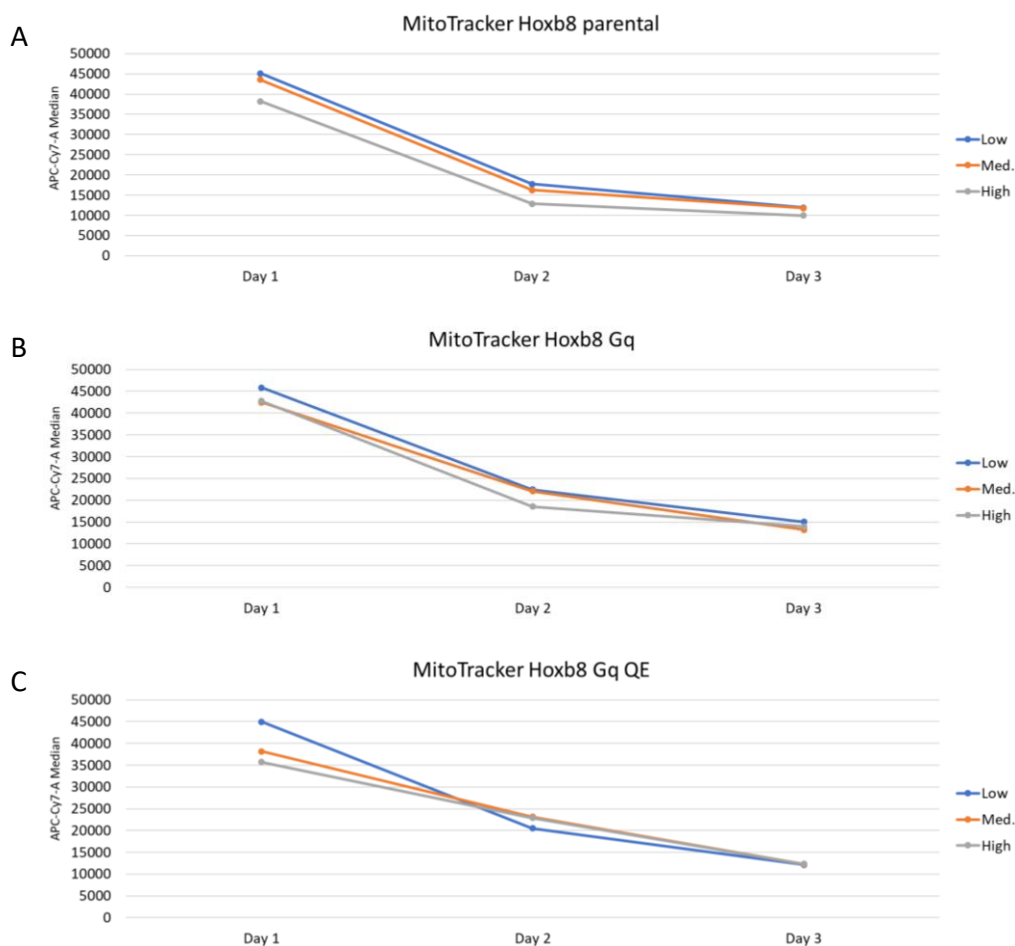


Abbildung 4.1: Ergebnisse des MitoTracker-Assays

Ergebnisse des MitoTracker Ansatzes bei den verschiedenen Hoxb8-Zelltypen (A, B, C). Die jeweilige Kurvenfarbe bezieht sich auf die Glucosekonzentration im verwendeten Medium.

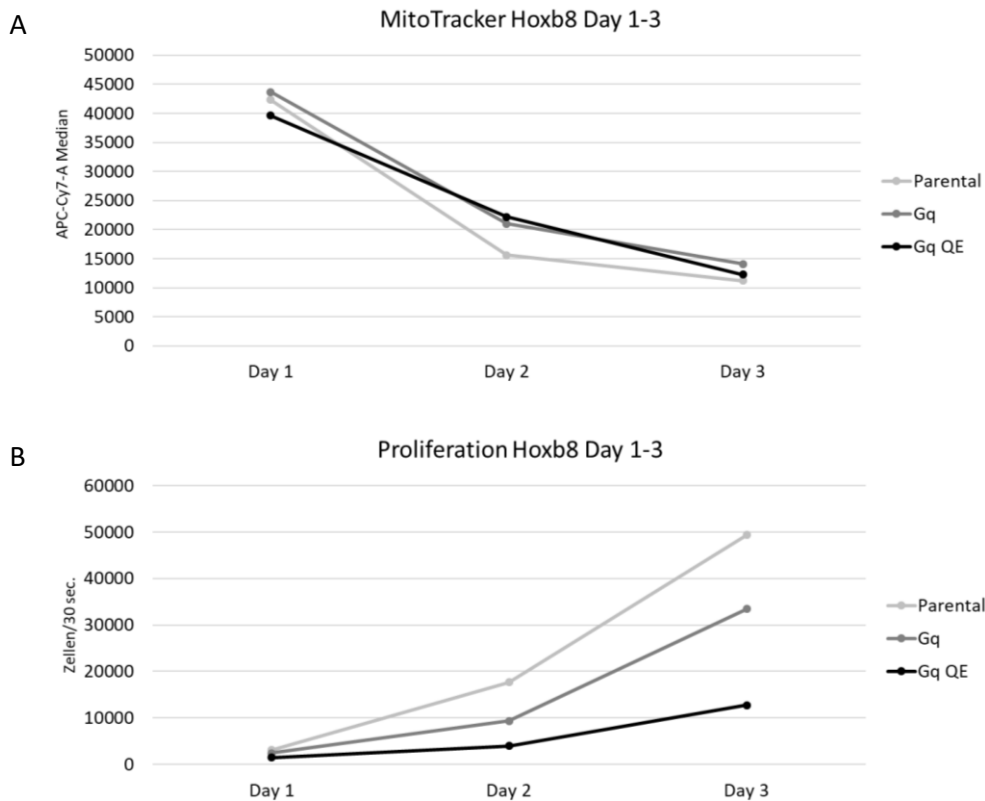


Abbildung 4.2: Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Zelltypen

Gemittelte MitoTracker-/Proliferationsergebnisse. (A) Vergleich der Mittelwerte aus den in Abbildung 4.1 dargestellten MitoTracker-Ergebnissen der drei Hoxb8-Zelltypen. (B) Ergebnisse der Proliferationsuntersuchung der einzelnen Hoxb8-Typen. Verwendet wurde die in Kapitel 3 erläuterte Zählmethode.

Hinsichtlich der Proliferation ist bei den verschiedenen Hoxb8-Typen festzustellen, dass die parentalen Hoxb8-Zellen am besten wachsen, während die QE-Zellen die geringste Proliferationsrate und somit das langsamste Wachstum aufweisen (Abb. 4.2 B). Die hier erhaltenen Ergebnisse decken sich mit dem unter dem Mikroskop sowie dem beim Ansetzen der Versuche gewonnen Eindruck über die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Populationen.

4.2 CellTiter Glo-Assay Hoxb8

Die Ergebnisse des CTG-Assays sind, trotz der Auftragung der Proben als Triplikate, sehr sensibel, schon geringfügige Pipettierfehler können das gemessene Resultat verfälschen. Dies spiegelt sich teils auch in den durch Abbildung 4.3 dargestellten Diagrammen wider, die Standardabweichung ist in manchen Fällen sehr groß. Dennoch lässt sich zumindest bei einer Mehrheit der Werte feststellen, dass die Zellen, welche in dem glucosearmen Medium kultiviert wurden, eine höhere Lichtfreisetzung als diejenigen aus dem glucosereichen Medium aufweisen. Weiterhin auffällig ist die an Tag zwei und drei bei den QE-Zellen gemessene niedrige Lumineszenz, die deutlich unterhalb jener der parentalen und G_q-Zellen liegt. Für wirklich belastbare Ergebnisse und belegbare Interpretationen müsste der Assay jedoch in jedem Fall mehrmals wiederholt werden.

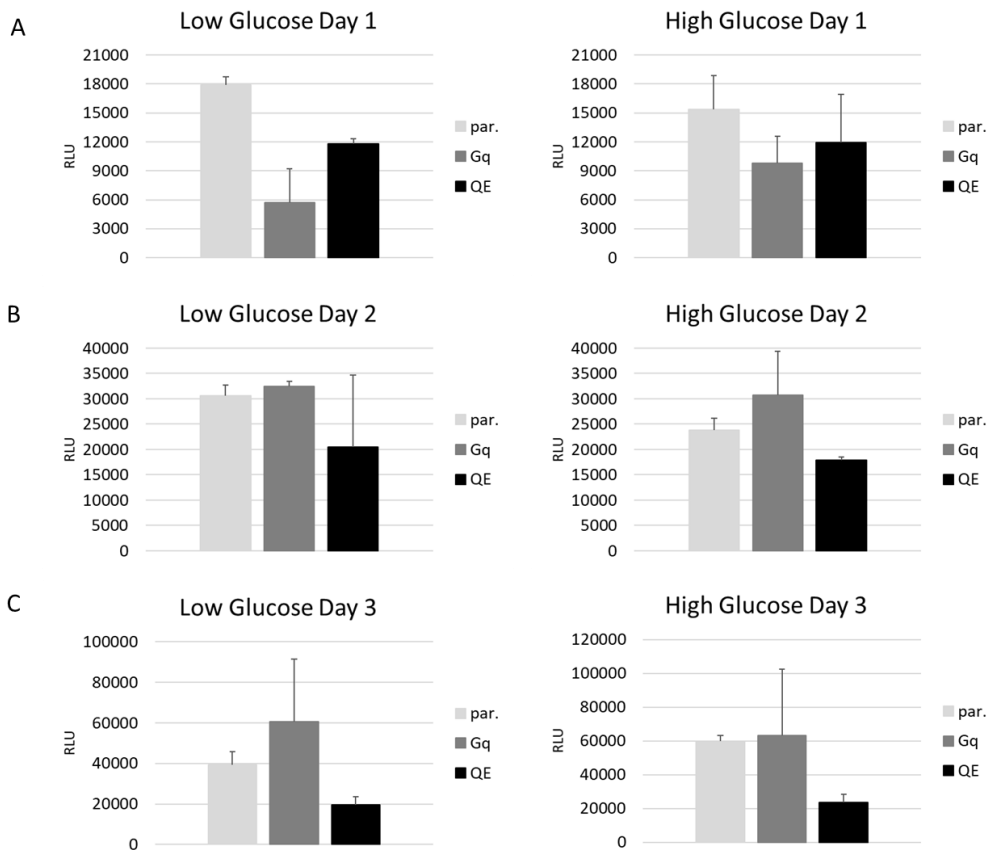


Abbildung 4.3: Ergebnisse des CTG-Assays

Ergebnisse des CTG-Assays über drei Tage hinweg. (A) Tag 1, (B) Tag 2, (C) Tag 3. Links sind die Ergebnisse der Zellen abgebildet, die in dem glucosearmen Medium kultiviert wurden, rechts jene der Zellen aus dem glucosereichen.

4.3 TRAP-Assay Osteoklastogenese *Hoxb8*

Die Differenzierung in Osteoklasten scheiterte während des Praktikumszeitraums insgesamt dreimal, schließlich gelang bei zwei Ansätzen zumindest ein akzeptabler Erfolg. Während die stimulierten *Hoxb8* parental- und G_q -Zellen zwar nur wenige, jedoch teils sehr große Osteoklasten bildeten, fanden sich bei den QE-Zellen nur wesentlich kleinere und morphologisch divergierende Exemplare. Die im Anschluss durchgeführte TRAP-Färbung fiel bei den unstimulierten, undifferenzierten Zellen negativ aus, bei den mit RANKL behandelten Zellen zeigten sich häufige Rotfärbungen, welche das Vorliegen von Osteoklasten belegen (Abb. 4.4).

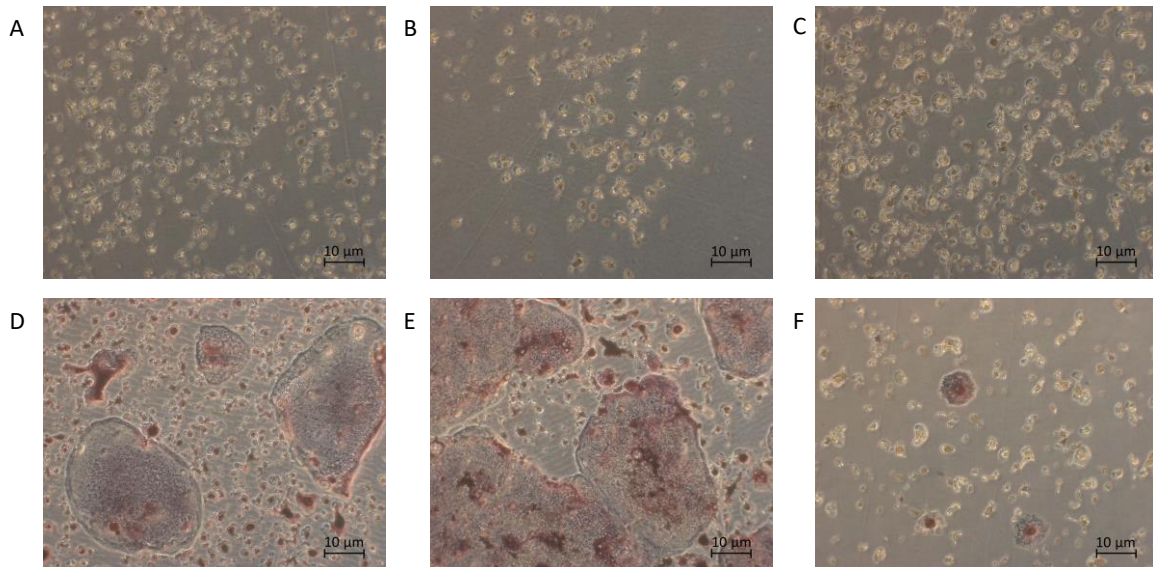


Abbildung 4.4: Ergebnisse des TRAP-Assays (Hoxb8)

Hoxb8 parental- (A), G_q - (B) und G_q QE-Zellen (C) ohne bzw. mit (D-F) RANKL-Stimulation.

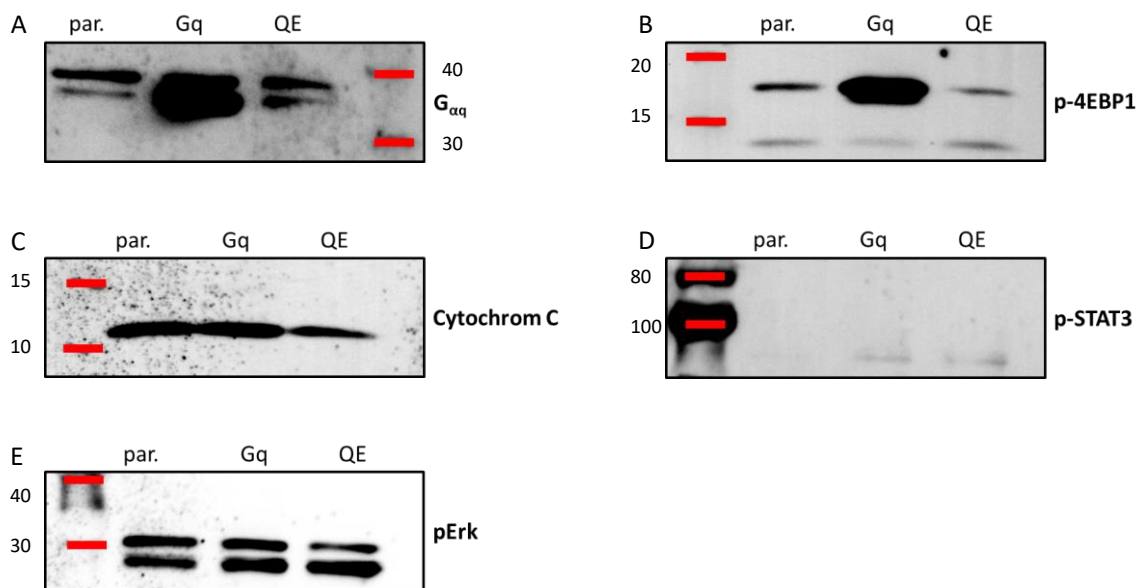


Abbildung 4.5: Ergebnisse der Western Blots (Hoxb8)

Ergebnisse der Western Blots von $G_{\alpha q}$, p-4EBP1, Cytochrom C, p-STAT3 und pErk. Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet (Gewichtsangaben in kDa).

4.4 Western Blot Hoxb8

Die Untersuchung der $G_{\alpha q}$ -, p-4EBP1, Cytochrom C-, p-STAT3 und pErk-Expression lieferte die in Abbildung 4.5 dargestellten Ergebnisse. Als Ladekontrolle wurde β -Actin verwendet.

4.5 TRAP-Assay Osteoklastogenese RAW

Im Gegensatz zu den TRAP-Assays mit den Hoxb8-Zellen funktionierte die Differenzierung bei der mit den RAW-Makrophagen angesetzten Kontrolle problemlos. Deutlich zu sehen sind die von der RANKL-Stimulation abhängigen morphologischen Unterschiede (Abb. 4.6).

4.6 Western Blot NFATc1

Anhand der Ladekontrolle, wofür gleichermaßen β -Actin verwendet wurde, ist deutlich zu erkennen, dass die Probenaschen gleichmäßig befüllt wurden. Betrachtet man jedoch die NFATc1-Banden, fällt auf, dass die Bande der RANKL-stimulierten Zellen wesentlich dünner erscheint als jene der unstimulierten Probe (Abb. 4.6).

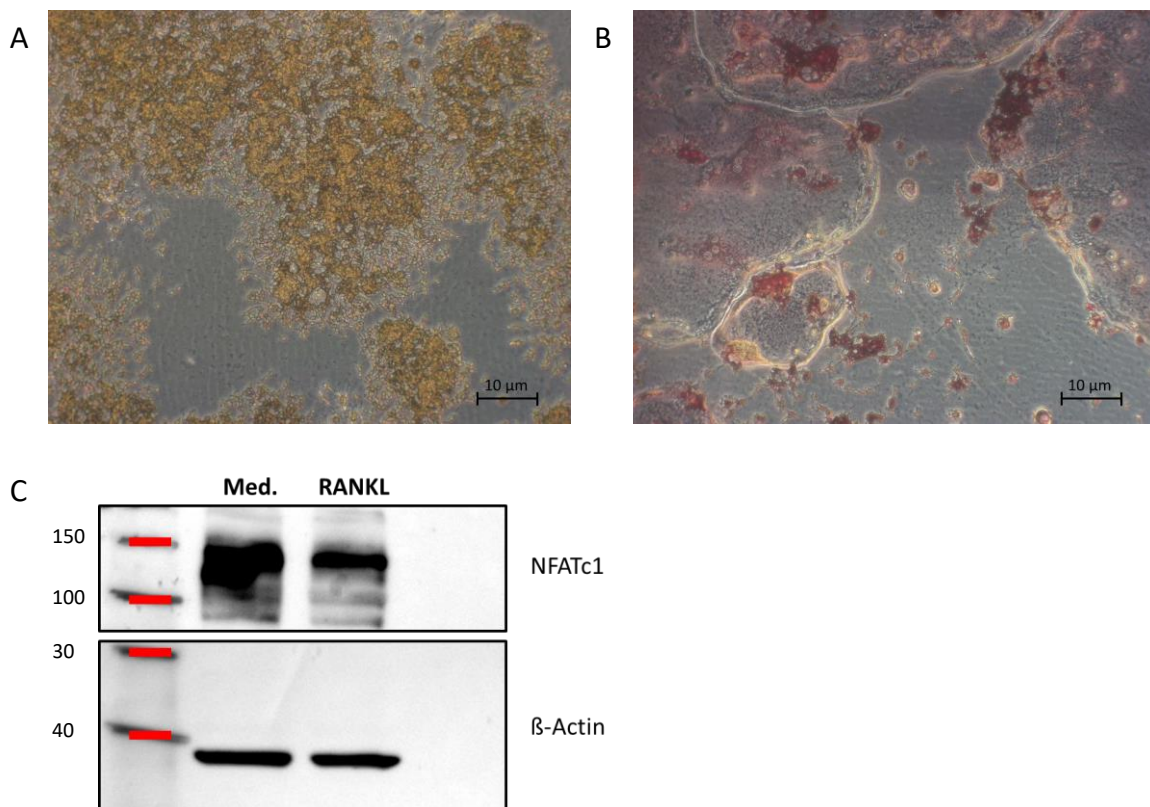


Abbildung 4.6 TRAP- und Western Blot-Ergebnisse (RAW)

Ergebnisse des RAW-TRAP-Assays sowie des NFATc1-Westernblots. (A) RAW-Makrophagen ohne RANKL-Stimulation. (B) RAW-Makrophagen mit RANKL-Stimulation, deutlich zu erkennen die Differenzierung in Osteoklasten. Die TRAP-Färbung ist hier positiv. (C) NFATc1 Western-Blot Ergebnisse (Gewichtsangaben in kDa)

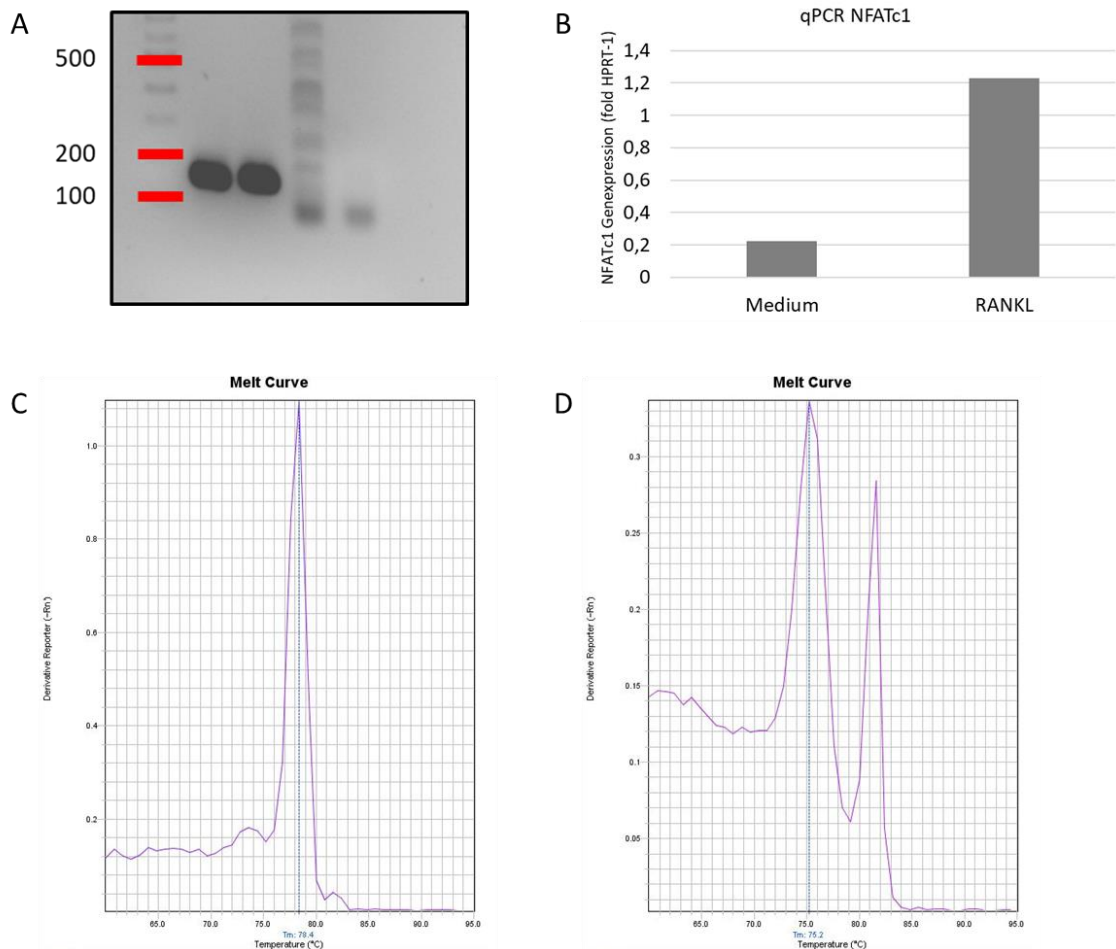


Abbildung 4.7: Ergebnisse der Probenvorbereitung sowie der qPCR

(A) Gelelektrophorese der cDNA-Proben: Medium, RANKL, noRT, H₂O (von links). (B) Ergebnis der qPCR: Die NFATc1-Expression erhöht sich in den RANKL-stimulierten Zellen um das Fünffache. (C) HPRT-1-H₂O-Schmelzkurve: Peak deutet auf Verunreinigung hin. (D) NFATc1-H₂O-Schmelzkurve: Diese Probe ist in Ordnung, sie weist zwei undefinierte Peaks auf, die nicht im Bereich der anderen Proben liegen.

4.7 qPCR NFATc1

Das Ergebnis der Untersuchung des Erfolgs der cDNA-Synthese mittels konventioneller PCR und anschließender Gelelektrophorese ist in Abbildung 4.7 dargestellt. Während die Medium- sowie die RANKL-Probe eine saubere Bande bei einer Länge zwischen 100 und 200 Basenpaaren bilden, finden sich in der noRT-Probe mehrere dünne Banden. Die Wasserprobe zeigt lediglich eine blasse und verschwommene Bande unterhalb jener der eigentlichen Proben.

Die Auswertung der qPCR ergab eine fünffache Induktion der NFATc1-Genexpression in den RANKL-stimulierten Zellen im Vergleich zu der Mediumkontrolle (Abb. 5.7). Betrachtet man jedoch die Schmelzkurven, welche zur Überprüfung der Reinheit angefertigt werden, zeigt sich ein deutlicher, im Bereich der anderen Proben liegender Peak bei der HPRT-1 (Gen für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1) Kontrollprobe, die eigentlich kein Template enthält.

Obwohl dies auf eine Verunreinigung hindeutet, liegt der Cycle-Threshold (ct)-Wert der Probe weit von denen der anderen Ansätze entfernt (Rohdaten Anhang). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse trotz der unpassenden Schmelzkurve in Ordnung sind - für tatsächlich belastbare Aussagen müsste die qPCR aber dennoch wiederholt werden.

5. Diskussion

5.1 G_q -Experimente

In den im Anhang dargestellten Fluoreszenz-Diagrammen zeigt sich deutlich, dass alle drei Zelltypen das Einbringen der verschiedenen G_q -Modifikationen sowie das Auftauen erfolgreich überstanden haben. Während die parentalen Hoxb8-Zellen keinerlei Fluoreszenz aufweisen, da sie kein Plasmid aufgenommen haben und somit auch kein hCD4 exprimieren können, lässt sich bei den G_q - sowie den G_q QE-Zellen ein deutliches Signal im APC-Cy7-A-Kanal feststellen. Die Aufnahme der Plasmide und die anschließende Puromycin-Selektion waren somit erfolgreich, in beiden Fällen liegen größtenteils Zellen mit der gewünschten Modifikation vor.

Bei Betrachtung der Ergebnisse des MitoTracker-Ansatzes zeigt sich zumindest an den ersten beiden Tagen, dass die parentalen Zellen zum Teil eine höhere mitochondriale Aktivität aufweisen als die G_q - und G_q QE-Zellen. Dies ist insofern interessant, als dass eigentlich das Gegenteil erwartet wurde: Wenn ein Knockout der $G_{\alpha q}$ -Untereinheit zu einem niedrigeren intrazellulären ATP-Gehalt sowie einem verringerten Membranpotential in den Mitochondrien führt, so sollte eine Überexpression bzw. konstitutive Aktivierung eigentlich eine erhöhte mitochondriale Aktivität nach sich ziehen.

Die Auswirkungen der Glucosekonzentration sind ebenso vorerst verwunderlich: Bei einem Großteil der MitoTracker-Messungen wiesen die Zellen, welche in der niedrigsten Glucosekonzentration kultiviert wurden, die höchste mitochondriale Aktivität auf. Gleichmaßen verhält es sich bei den CellTiter Glo-Ergebnissen, hier verfügen die Zellen aus dem glucoseärmeren Medium über eine höhere Lichtemission, respektiv also einen höheren intrazellulären ATP-Gehalt. Die Ursache hierfür lässt sich jedoch wohl recht simpel mittels des Glucose-Metabolismus erklären: Liegt Glucose in ausreichender Menge bzw. gar im Überschuss vor, so kann ein Großteil des benötigten ATPs trotz geringerer Effizienz direkt durch die Glykolyse gewonnen werden. Steht den Zellen jedoch nur wenig Glucose zur Verfügung, wird vermehrt Stoffwechsel in den Mitochondrien (Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung) ablaufen, um die vorhandenen Ressourcen möglichst ergiebig verwerten zu können. Für einen sinnvollen Vergleich zwischen den Auswirkungen der G_q -Modifikation auf den mitochondrialen Metabolismus muss dieser Anpassungsvorgang umgangen werden. In zukünftigen Versuchen ist es also notwendig, sicherzustellen, dass die Zellen in Hinsicht auf die ATP-Synthese größtenteils auf die in den Mitochondrien ablaufenden, von $G_{\alpha q}$ beeinflussten Stoffwechselschritte angewiesen sind.

Das Ergebnis der Untersuchung der G_q-Expression in den drei verschiedenen Zellreihen mittels eines Western Blots demonstriert deutlich, dass das Protein in den Hoxb8 G_q-Zellen drastisch überexprimiert wird. Erstaunlicherweise ist dies in den Hoxb8 QE-Zellen nicht der Fall, obwohl diese ebenfalls zusätzliche G_q-Gensequenzen enthalten - die Expression des konstitutiv aktivierten Proteins muss also herunterreguliert worden sein. Bezüglich der p-4EBP1-Expression lieferte der Western Blot ein ähnliches Bild: Während das Protein in den parentalen und QE-Zellen in nahezu identischer Menge exprimiert wird, lässt die Bande bei den G_q-Zellen auf ein weitaus größeres Vorkommen schließen. 4EBP1 wirkt als Translationsrepressor, indem es an den eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) bindet und so die Bildung des Translationskomplexes aus ribosomalen Untereinheiten und mRNA verhindert. Wird 4EBP1 jedoch phosphoryliert (p-4EBP1), löst es sich von eIF4E, wodurch die Translation wieder ablaufen kann. Im durchgeführten Western Blot wurde spezifisch diese phosphorylierte Form detektiert - deren geringes Vorliegen könnte also, insbesondere in den Hoxb8 QE-Zellen, in Zusammenhang mit der herunterregulierten Expression von G_q stehen. Der Western Blot zur Untersuchung von p-STAT3 zeigt, dass dieses bei den G_q- und QE-Zellen nur in sehr geringer Menge vorliegt, während es bei den parentalen Zellen nicht nachweisbar ist. Bezüglich Cytochrom C fällt auf, dass es in den parentalen und G_q-Zellen in vergleichbarer, in den QE-Zellen jedoch in geringerer Menge vorkommt. Das letzte untersuchte Protein, pERK, wird in den QE-Zellen weniger exprimiert als in den anderen beiden Hoxb8-Typen. Da insbesondere der ERK1/2-Signalweg starken Einfluss auf die Zellproliferation und den Zellzyklus nimmt, könnte dieser Mangel an aktivierten ERK-Proteinen mit der bereits beschriebenen, deutlich langsameren Entwicklung der QE-Zellen korrelieren.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass die Experimente mit dem G_q-Protein folgende Ergebnisse lieferten: Die G_q-Zellen unterscheiden sich von der QE-Variante in ihrer mitochondrialen Aktivität, der intrazellulären ATP-Menge sowie der Abundanz spezifischer Proteine. Ebenfalls konnte festgestellt werden, dass die QE-Zellen mit G_q-Mutation einerseits anders, andererseits schlechter differenzieren. Dabei war es jedoch nicht möglich, abschließend zu klären, ob die Effekte des PMT auf die Osteoklastogenese direkt mit den erhaltenen Resultaten zusammenhängen. Im nächsten Schritt sind daher noch weitere Versuche nötig, um einen eindeutigen Schluss ziehen zu können.

5.2 RAW-Experimente

Die Aufnahmen des TRAP-Ansatzes zeigen deutlich den Erfolg der angesetzten Kontrollprobe: Die mit RANKL stimulierten Zellen differenzierten in Osteoklasten, welche sich eindeutig anhand der Mehrkernigkeit und der positiven TRAP-Färbung identifizieren lassen, während bei der unstimulierten Probe keine Veränderung festzustellen ist.

Die Kontrolle im Western Blot zur Untersuchung der NFATc1-Expression lässt erkennen, dass NFATc1 in den unstimulierten Proben in wesentlich größerer Menge vorliegt als in den RANKL-Ansätzen. Im scheinbaren Widerspruch hierzu stehen die qPCR-Ergebnisse: Wie in Kapitel 4 dargelegt, ergeben diese eine fünffache Induktion der NFATc1-Expression in den RANKL-Proben gegenüber den unstimulierten Zellen. Somit wäre zu erwarten, dass auch mehr Protein in den RANKL-stimulierten Zellen zu finden ist, obwohl die genaue Regulation der Translation für dieses Protein noch wenig bekannt ist. Die geringere detektierte Proteinmenge lässt sich jedoch mit der Beschaffenheit von NFATc1 erklären: Im inaktivierten Zustand befindet es sich zum Großteil im Cytoplasma, während es nach Aktivierung in den Zellkern transportiert wird, um dort als Transkriptionsfaktor wirken zu können. Dabei spielt es eine Schlüsselrolle in der Differenzierung der Zellen, zahlreiche osteoklastenspezifische Gene, beispielsweise TRAP, werden von NFATc1 reguliert. Während sich das Protein also in den unstimulierten Zellen in inaktivierter Form im Cytoplasma befindet, führt die RANKL-Stimulation zur Aktivierung und Positionswechsel in den Zellkern. Dieser ist bei der vor dem Western Blot durchgeführten Lyse jedoch deutlich schwerer zu zerstören als die äußere Zellmembran, weshalb sich schließlich ein vermeintlich höherer NFATc1-Gehalt in der unstimulierten Probe wiederfindet. Um dieses Problem eindeutig umgehen zu können, wäre ein Primärantikörper nötig, welcher spezifisch das phosphorylierte NFATc1 detektieren kann – ein solches Protein ist aber momentan noch nicht verfügbar.

6. Rückblick und Fazit

Zusammenfassend kann ich somit sagen, dass das Praktikum äußerst spannend war und mir sehr viel Spaß gemacht hat. In den vier Wochen in Heidelberg lernte ich zahlreiche Methoden und Arbeitstechniken kennen, wobei es besonders interessant war, bereits aus der Schule bzw. der Wettbewerbsvorbereitung bekannte Verfahren praktisch durchführen zu können. Ich wurde von allen Mitarbeitern der AG direkt sehr freundlich aufgenommen und durfte nach umfangreicher Einführung sogar relativ selbstständig arbeiten. Somit erlangte ich einen breiten Einblick in die Abläufe im Labor, wobei neben der Freude über geglückte Versuche natürlich auch Misserfolge und Enttäuschungen Teil des Alltags waren. Dabei wurde mir bewusst, wie viel Frustrationstoleranz, Geduld und Ausdauer für die Forschung nötig sind. Bezüglich meines künftigen Studienfachs Medizin kann ich festhalten, dass mich das Praktikum in meiner Wahl bestärkt hat. Die großartigen Erfahrungen im Labor haben mir gezeigt, dass ich mir nach dem Studium durchaus gut vorstellen kann, neben dem Beruf als Arzt auch in der Forschung tätig zu werden.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeitern AG Kubatzky bedanken, hauptsächlich aber bei Frau Prof. Dr. Kubatzky und Frau Dr. Seebach, welche das Praktikum betreut haben und bei allen Fragen und Problemen ansprechbar waren. Besonderer Dank für die freundliche Aufnahme in ihre WG gilt auch IBO-Alumna Martina Heller. An den Förderverein richte ich ein großes Dankeschön für die Ermöglichung dieses spannenden Praktikums.

7. Anhang

7.1 Zellkulturmedien

Hoxb8

Low Glucose (Standardmedium): RPMI 1640 (10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin)

Medium Glucose: RPMI 1640 + 0,6 g Glucose/500 ml (10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin)

High Glucose: RPMI 1640 + 1,2 g Glucose/500 ml (10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin)

TRAP-Assay: DMEM High Glucose (10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin)

RAW

DMEM High Glucose (10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin)

7.2 TRAP-Lösungen

Fixierlösung (Volumina für ein Well):

112 µl Citratlösung (Kit)

290 µl Aceton

36 µl 37% Formaldehyd

Fast Garnet-Lösung (Volumina für ein Well):

4,4 µl Natriumnitrat-Lösung (Kit)

4,4 µl Fast Garnet GBC Standard-Solution (Kit)

Färbelösung (Volumina für ein Well):

400 µl Bidestilliertes Wasser (37°C)

4,4 µl Naphthol AS-BI Phosphate solution (Kit)

17,6 µl Acetat-Lösung (Kit)

8,8 µl Tartrat-Lösung (Kit)

8,8 µl Fast Garnet Solution

7.3 BSA-Standardkonzentrationen für BCA-Assay

2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 µg/ml

7.4 cDNA-Synthese-Mastermix

Mengenangaben und Volumina für eine RNA-Probe

0,1 µg RNA Template

0,5 µl Oligo dt (10 µM)

4 µl 5x reaction buffer

0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor

2 µl 10 mM dNTP-Mix

1 µl RevertAid RT

Restvolumen bis 20 µl: Nucleasefreies Wasser

7.5 PCR-Mastermix

Volumina für eine cDNA-Probe

2,5 µl 10x buffer

1,5 µl MgCl₂

0,25 µl dNTPs

0,5 µl Taq-Polymerase

0,25 µl fw-Primer

0,25 µl rv-Primer

17,75 µl H₂O

7.6 PCR-Programm

95 °C (3 min.)

95 °C (30 sec.)

60 °C (30 sec.)

72 °C (40 sec.)

Zykluswiederholung 35x

72 °C (10 min.)

8 °C

7.7 qPCR-Programm

95 °C (120 sec.)

95 °C (5 sec.)

60 °C (20 sec.)

Zykluswiederholung 40x

95 °C (15 sec.)

60 °C (60 sec.)

95 °C (15 sec.)

7.8 Durchflusszytometrie Rohdaten hCD4

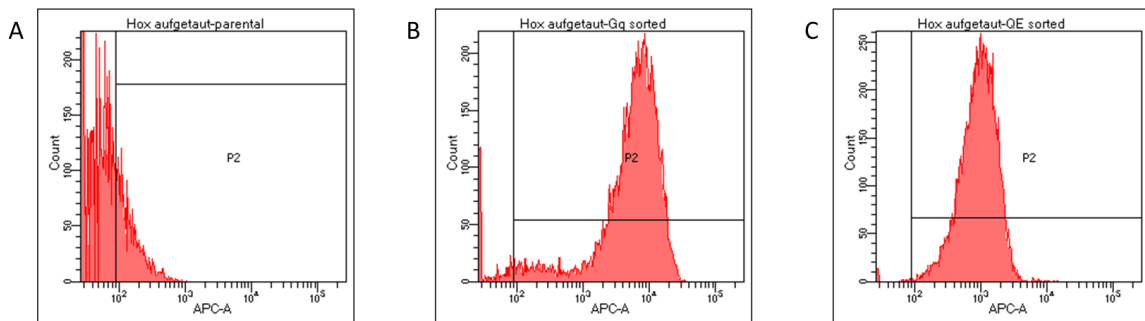


Abbildung 7.1: Rohdaten der Zellkontrolle nach dem Auftauen

(A) APC-A Intensität Hoxb8 parental. (B) APC-A Intensität Hoxb8 G_q. (C) APC-A Intensität Hoxb8 G_q QE

7.9 Rohdaten qPCR

	NFATc1 1	NFATc1 2	NFAT mean	HPRT-1 1	HPRT-1 2	HPRT mean
Medium	19,7234306	19,7363796	19,7299051	18,9294701	17,5614624	17,5614624
RANKL	16,7166805	16,8380775	16,777379	17,0941849	17,059227	17,0767059
no RT	34,7073669	37,1109276		31,1422424	31,2322063	
H2O	34,7647705	34,1720352		30,8136711	31,5886536	
	dCT	1/2 ^{dCT}	*100	fold induction		
Medium	2,16844273	0,22245066	22,2450658			
RANKL	-0,2993269	1,23057014	123,057014	5,53187909		

Abbildung 7.2: Berechnung der NFATc1-Induktion

Rohdaten der qPCR und Rechenweg für die Berechnung der NFATc1-Induktion.

8. Quellenverzeichnis

8.1 Literaturquellen

- [1] Berg, Jeremy et al. (⁸2018): *Stryer Biochemie*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, Berlin.
- [2] Sánchez-Fernández, Guzman et al. (2014): *G_{αq} signalling: The new and the old*. Cellular Signalling, 26: 833-848
- [3] Benincá, Christiane et al. (2014): *A new non canonical pathway of G_{αq} protein regulating mitochondrial dynamic and bioenergetics*. Cellular Signalling, 26: 1135-1146
- [4] Di Ceglie, Irene et al. (2017): *Genetic modification of ER-Hoxb8 osteoclast precursors using CRISPR/Cas9 as a novel way to allow studies on osteoclast biology*. Journal of Leukocyte Biology, 101: 957-966
- [5] Seebach, Elisabeth und Katharina Kubatzky (2019): *Chronic implant-related bone infections – can immune modulation be a therapeutic strategy?* Frontiers in Immunology, 10: Article 1724
- [6] Gstraunthaler, Gerhard und Toni Lindl (⁷2013): *Zell- und Gewebekultur*. Springer-Verlag GmbH Deutschland, Berlin

8.2 Abbildungen

Abbildung 3.1

http://konstanzkalifornien.de/wp-content/uploads/2017/07/flow-cytometry_500.jpg

(aufgerufen am 04.10.2019)

Abbildung 3.3 A

https://s3-us-west-2.amazonaws.com/oww-files-thumb/7/7a/CellTiterGlow_F1320109.jpg/750px-CellTiterGlow_F1320109.jpg

(aufgerufen am 04.10.2019)