

Protokoll Versuch 3:

Immunglobulin-Klassenwechsel in Zellkultur

Gruppe 4 (Susanne Duncker, Kristin Hofmann)

Einleitung

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, welche Stimulation von Milzzellen aus Wildtypmäusen notwendig ist, um den Immunglobulin-Klassenwechsel von IgM auf IgG1 durchzuführen. Hierzu nahmen wir Milzzellen aus C57Bl/6-Mäusen in Zellkultur und inkubierten sie mit verschiedenen Stimulantien, um am Ende der Inkubationszeit die Konzentration von IgG1 im Überstand zu messen.

Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und Methoden können im ausgeteilten Skript nachgelesen werden, Änderungen wurden protokolliert.

Versuchsdurchführung

Zu Beginn des Praktikums isolierten wir Thymus-, Milz- und Knochenmarkszellen aus einer Wildtypmaus (C57Bl/6-Maus). Mit den isolierten Milzzellen setzten wir zwei Zellkulturen an, eine für eine ELISA-Messung, eine für eine RNA-Isolation.

Für die RNA-Isolations-Ansätze stellten wir die Zellen auf 1×10^6 Zellen pro ml Medium ein und brachten je 5 ml, also 5×10^6 Zellen, in drei Wells einer Sechs-Well-Platte aus. In Well 1 waren die Zellen gänzlich ohne Stimulans, in Well 2 wurden als Stimulans noch zusätzlich 10 µg/ml LPS pipettiert, in Well 3 10 µg/ml LPS sowie 50 µl IL-4, ein Cytokin, das als Wachstumsfaktor wirkt und die Zellen somit zur Proliferation anregen sollte. Diese Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert.

Für die ELISA-Ansätze stellten wir die Zellen auf $2,5 \times 10^5$ Zellen pro ml Medium ein und brachten je 1 ml in drei Wells einer 24-Well-Platte aus. Auch hier enthielt Well 1 lediglich die Zellen, Well 2 zusätzlich 10 µg/ml LPS und Well 3 enthielt zusätzlich zu den 10 µg/ml LPS noch 10 µl IL-4 als Wachstumsfaktor. Auch diese Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert.

Zwei Tage später isolierten wir RNA aus den für diesen Zweck inkubierten Zellen und vermaßen sie photometrisch.

Die Isolation der RNA führten wir laut der Anleitung im Skript durch, wobei wir jedoch beim Abnehmen der oberen Phase nach der zweiten Zentrifugation den Ansatz, der mit LPS stimulierte Zellen enthielt, sowie den Ansatz, in dem die Zellen mit LPS und IL-4 stimuliert wurden, erneut zentrifugieren mussten, um die Überstände sauber abnehmen zu können. Der darauffolgende Waschschritt wurde mit 80 % Ethanol durchgeführt, nicht mit 75 % wie im Skript beschrieben. Die photometrische Vermessung der RNA wurde laut Skript durchgeführt und ergab die in Tabelle 1 aufgeführten Werte.

Zellen	RNA-Konzentration
Zellen ohne Stimulans	127 ng/µl
Zellen mit LPS	244 ng/µl
Zellen mit LPS & IL-4	179 ng/µl

Tabelle 1: Ergebnisse der photometrischen RNA-Messung

Nach zwei Tagen synthetisierten wir aus der isolierten RNA cDNA, wobei wir Primer verwendeten, die nur vom circle transcript, dem bei der Durchführung des Klassenwechsels entstehenden Plasmid, transkribierte RNA enthält, amplifizierten diese durch PCR und trugen sie zur Analyse auf ein Gel auf, welches unter „Ergebnis“ zu sehen ist.

Für die cDNA-Synthese sollten wir je 1 µg RNA verwenden, jedoch großzügig sein. Wir setzten ein:

Zellen ohne Stimulans:	10 µl → 1,27 µg
Zellen mit LPS:	5 µl → 1,22 µg
Zellen mit LPS & IL-4:	9 µl → 1,61 µg

Zu jedem Ansatz gaben wir 1 µl Oligo-dT-Primer dazu und füllten mit H₂O auf 12 µl auf. Die weiteren Schritte zur cDNA-Synthese erfolgten nach Anweisung im Skript.

Die PCR wurde ebenfalls nach der Anleitung im Skript vorbereitet und durchgeführt. Die amplifizierte cDNA wurde dann auf ein vorbereitetes 1%-Agarosegel aufgetragen, wobei folgendes Beladungsschema eingehalten wurde:

1 2 3 5 6 7 St amp amp/cam

1: 49 µl Mastermix + 1 µl cDNA aus Zellen ohne Stimulation

2: 49 µl Mastermix + 1 µl cDNA aus Zellen mit LPS-Stimulation

3: 49 µl Mastermix + 1 µl cDNA aus Zellen mit LPS- und IL-4-Stimulation

5: 49 µl Kontrollmastermix + 1 µl cDNA aus Zellen ohne Stimulation

6: 49 µl Kontrollmastermix + 1 µl cDNA aus Zellen mit LPS-Stimulation

7: 49 µl Kontrollmastermix + 1 µl cDNA aus Zellen mit LPS- und IL-4-Stimulation

St: Standard

amp: DNA aus Verdau von auf amp-Platten wachsende Bakterienkolonien (Versuch 1)

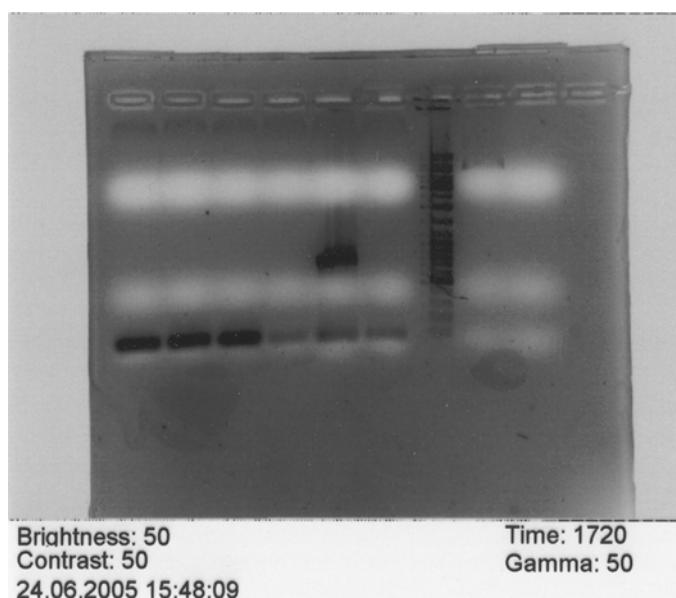
amp/cam: DNA aus Verdau von auf amp/cam-Platten wachsende Bakterienkolonien (Versuch 1)

Für den ELISA-Versuch beschichteten wir die Platten und inkubierten sie über Nacht.

Am nächsten Tag wurde der ELISA-Versuch exakt nach Skript fortgeführt, wobei stets die kürzest mögliche Inkubationszeit bei der entsprechenden Temperatur gewählt wurde. Am Schluss, nach der Substratzugabe, inkubierten wir für 45 min und vermaßen unsere ELISA-Platte dann am ELISA-Reader.

Ergebnis

Die amplifizierte cDNA ergab beim Gellauf folgendes Bild (Beladungsschema s. oben):



Die in jedem der sechs Ansätze deutlich sichtbare untere Bande stellt vermutlich überschüssigen Primer dar. In unseren ersten drei Ansätzen befand sich offensichtlich leider überhaupt keine DNA, und bei den drei Kontrollansätzen klappte leider auch nur der Ansatz, der die mit LPS stimulierten Zellen enthielt und zeigt, dass cDNA im Ansatz vorhanden ist.

Da die von uns erzielten Ergebnisse nicht auswertbar sind, hier das Gelbild von Gruppe 3:



Im Bild von Gruppe 3, das dem Beladungsschema unseres Gels entspricht, sieht man, dass jeder Kontrollansatz cDNA enthält.

In dem Ansatz, der lediglich B-Zellen enthielt (1) sowie im Ansatz, in dem die B-Zellen lediglich mit LPS stimuliert wurden (2), ist kein circle transcript, das den durchgeföhrten Klassenwechsel belegt, nachzuweisen. In Spalte 3 hingegen ist dieses Transkript als Bande sichtbar – der Nachweis, dass LPS zusammen mit IL-4 den Klassenwechsel in B-Zellen hervorrufen kann, ist somit erbracht.

Die vom Programm Softmax erstellte ELISA-Auswertung befindet sich als Anhang bei diesem Protokoll. Sie sollte zeigen, dass die Zellen, die sowohl durch LPS als auch durch IL-4 stimuliert wurden, IgG statt IgM sezernieren.

Unsere Daten zeigen, dass die IgM-Konzentration im Überstand der Zellen, die nur mit LPS stimuliert wurden, am höchsten ist, am zweithöchsten bei den Zellen, die auch mit IL-4 stimuliert wurden und bei den nicht stimulierten Zellen nahezu null ist (alle Daten können dem Diagramm im Anhang bei der IgM-Messung entnommen werden).

Bei den Zellen, in deren Überstand wir die IgG-Konzentration gemessen haben, zeigt sich, dass die sowohl mit LPS als auch mit IL-4 stimulierten Zellen am meisten IgG produzieren, gefolgt von den nur mit LPS stimulierten Zellen. Die Werte für die nicht stimulierten Zellen bewegen sich zunächst im Rahmen der Erwartungen, bis sie am Ende der Messreihe sehr unrealistische Werte ergeben.

Diskussion

Unsere fehlenden Ergebnisse bei der cDNA-Synthese lassen sich vermutlich auf Pipettierfehler unsererseits zurückführen, da das Fehlen von DNA in zwei von drei Kontrollansätzen sonst nicht zu erklären ist. Da im dritten Kontrollansatz keine DNA vorhanden ist, kann auch die zu erwartende Bande in Spalte 3 nicht zu sehen sein.

Die Daten der ELISA-Messung entsprechen den Erwartungen, die seltsamen Daten bei der IgG-Messung der nicht behandelten Zellen sind vermutlich auf Messfehler aufgrund der äußerst geringen Konzentrationen zurückzuführen.