

**Versuchsanleitungen
für das Praktikum des Mastermoduls
Ernährung und Immunologie**

Inhalt:

Seite

2

Allgemeines:

Zellkultur und Zellzahlbestimmung

Versuch 1:

7

Messung der Aktivierung von Makrophagen über die Ausschüttung von Zytokinen

Versuch 2:

9

Zell-Vitalitätstest: Zytotoxizität von Schimmelpilzgiften

Versuch 3:

10

Durchflusszytometrische Identifizierung von Leukozyten

Versuch 4:

14

Immunofluoreszenzfärbung von Serotonin (5-HT) immunoreaktiven Zellen im Mausduodenum

Versuch 5:

15

Einfluss von sekundären Pflanzenstoffen (β -Carotin) auf die IgE vermittelte Zytokinexpression von Mastzellen

Versuch 6:

17

Lebendkeimzahlbestimmung von Bakterien aus probiotischem und nicht-probiotischem Joghurt

Allgemeines:

Das Praktikum zielt vorrangig auf den Erwerb immunologischer Grundkenntnisse ab, in die Aspekte der Ernährung eingebracht werden. Ziel des Praktikums ist es, immunkompetente Zellen, Mechanismen der Immunabwehr und wichtige Messmethoden zur Charakterisierung immunkompetenter Zellen und ihrer Funktionen kennen zu lernen.

Neben der Messung der **Zytotoxizität von Schimmelpilzgiften** (Deoxynivalenol) werden Sie die **Stimulierbarkeit von Makrophagen mit LPS** anhand der Produktion von TNF bestimmen. Sie untersuchen den **Einfluss von sekundären Pflanzenstoffen** (β -Carotin) auf die IgE vermittelte Aktivierung von Mastzellen und Sie erhalten Gelegenheit zur Bestimmung von Leukozytensubpopulationen im peripher-venösen Blut des Menschen mit der **Durchflusszytometrie**. Sie fertigen **immunhistologische Färbungen** an und Sie bestimmen die Lebendzellzahl von **Bakterien in Joghurts**.

Zellkultur:

Als Zellkultur wird das Kultivieren von Zellen höherer eukaryotischer Lebewesen bezeichnet. Mit diesen kultivierten Zellen können dann verschiedenste Untersuchungen, vor allem die Messung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen und Reihenversuche, ohne Beteiligung von Tierexperimenten durchgeführt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Versuchsdurchführung unter gleichbleibenden Bedingungen gewährleistet ist und man so zu reproduzierbaren Ergebnissen gelangt. Auch interindividuelle Unterschiede entfallen, da genetisch identische Klone eines Ursprungsindividuums verwendet werden.

Im Praktikum eingesetzte Zelllinien und Zellkultur:

- RAW 264.7: Bei den „Raw cells“ handelt es sich um eine adhärente, durch den Abelsonschen Leukemievirus transformierte Makrophagenzelllinie, die ursprünglich aus einer adulten, männlichen Maus isoliert wurde.
- CACO-2: Diese adhärente Kolonkarzinomzelllinie wurde Mitte der 70er Jahre aus dem Dickdarmtumor eines 72jährigen Kaukasiers isoliert und für die Zellkultur etabliert. Sie eignet sich besonders für Untersuchungen am Darmepithel, da diese Linie konfluente, ausdifferenzierte Zellschichten mit Bürstensaum, Tight junctions und Desmosomen auszubilden vermag.
- RBL-2H3: Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die zwischen 1973 und 1975 von Eccleston et al. aus Wistar-Ratten isoliert wurde, welche an Leukämie erkrankt waren. Die Zellen schütten in Folge einer IgE-vermittelten Reaktion Histamin aus und werden als Mastzelllinie verwendet.

Kulturbedingungen:

Alle Zellen werden bei 5% CO₂, 37° C und ca. 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

RAW 264.7: Kulturmedium: DMEM (**D**ulbecco's **m**odified **E**agle **m**edium) mit fötalem Kälberserum (FCS, 10%) und 1% Penicillin/Streptomycin.

CACO-2: Kulturmedium: DMEM (**D**ulbecco's **m**odified **E**agle **m**edium) mit NaHCO₃/Phenolrot, fötalem Kälberserum (FCS, 20 %) und 1 % Stammlösung nicht-essentieller Aminosäuren (NEAS)

RBL-2H3: Kulturmedium: DMEM (**D**ulbecco's **m**odified **E**agle **m**edium) mit fötalem Kälberserum (FCS, 10%) und 1% Penicillin/Streptomycin.

Um die temperaturempfindlichen Komplementfaktoren des Serums zu denaturieren, wurde das aus Kälbern gewonnene Serum vor Ansetzen des Mediums 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert.

Zelltransfer:

Waschlösung: sterile, Phosphat-gepufferte (50 mM, pH 7,4) isotonische Kochsalzlösung (9 g/L), **p**hosphate-**b**uffered saline (PBS)

Trypsin-/EDTA-Lösung: 0,5 g Trypsin und 0,2 g EDTA in 100 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)

Trypanblaulösung: 5 g/L in PBS

Das Kulturmedium und die Waschlösung werden vor dem Zelltransfer auf 37°C erwärmt. Alle Arbeiten mit Zelllinien werden im Sterilraum (Reinluft-Arbeitsplatz, „Flow“) durchgeführt.

Resuspendierung adhärenter Zelllinien (RAW 264.7 Zellen, CACO-2 Zellen, RBL-2H3 Zellen)

Zum Entfernen des überstehenden, verbrauchten Mediums wird die Zellkulturflasche senkrecht gestellt, leicht auf die der Zellschicht abgewandte Seite gekippt und mit einer sterilen 5 ml/10 ml-Pipette abgesaugt. Achten Sie hierbei darauf, das Medium nicht in den Ansaugapparat gelangen zu lassen und mit der Pipettenwand nicht den Flaschenhals zu berühren. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS-Lösung durch dreifaches, leichtes Schwenken der Kulturflasche gewaschen. Das Waschmedium wird dabei jedes Mal analog zum Kulturmedium entfernt.

Für **CACO-2** und **RBL-2H3**-Zellen gilt anschließend folgendes:

Nach Zusatz von 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung wird die Kulturflasche für ca. 5-10 min bei CACO-2 Zellen bzw. ca. 3 min bei RBL-2H3 Zellen im Brutschrank inkubiert. Gegen Ende der Inkubationszeit wird überprüft, ob sich die Zellen bereits vom Boden gelöst haben und sich die Schlieren im Medium gelöst haben. Die Trypsinierung wird durch den Zusatz von 10 ml serumhaltigem Medium abgebrochen. Zur Vereinzelung der Zellen müssen die Zellen gut durch mehrfaches vorsichtiges Aufziehen mit der Pipette suspendiert werden.

Die **RAW 264.7** Zellen werden nicht trypsinisiert. Sie werden nach den Waschschritten mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Anschließend werden auch hier 10 ml Medium zugegeben, um nach mehrmaligem Resuspendieren eine gleichmäßige Zellsuspension zu erhalten.

Ab diesem Schritt ist das Umsetzen aller Zelllinien identisch.

Die Zellen werden in ein steriles ‚Falcon‘-Röhrchen (50 ml) überführt und bei 400 g 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird in der Flow verworfen und die Zellen werden mit 2-10 ml Medium (je nach erwarteter Zellzahl) wieder aufgenommen. Zur Zellzahlbestimmung werden die Zellen durch mehrfaches Aufziehen mit der Pipette erneut suspendiert, bis keine Schlieren mehr auftreten.

Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung werden 20 µl der resuspendierten Zellen mit einer Kolbenhubpipette (Röhrchenhals **nicht** mit dem Pipettenschaft berühren!) in ein unsteriles Eppendorf-Hütchen pipettiert. Das Röhrchen mit den Zellen wird nach Abflammen des Röhrchenhalses und des Deckels verschlossen. Zu den 20 µl Zellsuspension werden 20 µl 0,5%ige Trypanblaulösung pipettiert und die Zellkonzentration wird in der Neubauer-Zählkammer (Abb.1) bestimmt.

Auszählen der Zellen nach der Methode von Neubauer:

Vor dem Auflegen des Deckglases wird die Neubauer-Zählkammer angehaucht. Anschließend wird das Deckglas mit leichtem Druck parallel zur Oberfläche an die Kammer gedrückt (Bruchgefahr!), bis Newtonsche Ringe erkennbar werden. Auf dem Mittelsteg werden zwischen Deckglas und Kammer (Abb. 1) ca. 10 µl der gut suspendierten Zell-Trypanblaususpension gegeben, bis das Volumen unter dem Deckglas gerade gefüllt ist. Unter dem Mikroskop (100-fache Vergrößerung: Objektiv 10×, Okular 10×) werden bei dieser Methode nacheinander vier Eck-Großquadrate mäanderförmig ausgezählt, von denen jedes in 16 Kleinquadrate unterteilt ist (Abb. 2a). Bei optimaler Verdünnung liegt die Anzahl in allen vier Großquadraten, die aus 16 Kleinquadraten bestehen, zwischen 80 und 200 Zellen. Beim Zählen darauf achten, dass Zellen, die auf den Linien liegen, nicht zweimal gezählt werden; dies kann dadurch vermieden werden, dass nur solche Zellen mitgezählt werden, die oben und links vom Betrachter auf den Linien liegen (Abb. 2b). Es werden nur die lebenden Zellen ausgezählt, die sich hell gegen den blauen Hintergrund abheben. Tote Zellen, deren Zytoplasma mit Trypanblau angereichert ist, werden ignoriert. Der Mittelwert der Zellzahlen in den einzelnen Großquadraten wird berechnet und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor 2 (1:2 Verdünnung mit der Trypanblaulösung) und der Volumenfaktor $1,0 \times 10^4$ multipliziert. Dies ergibt die Konzentration lebender Zellen pro mL Medium.

Legen Sie bei allen nachfolgenden Berechnungen die Formel

Zellkonzentration= Zellzahl/Volumen des Mediums (c = N/V)

zu Grunde! Der Schlüssel zu einer fehlerfreien Berechnung der Zellkonzentration ist, dass sich die Anzahl der Zellen in einer Vorlage nicht durch den Zusatz von frischem Medium ändert: vor der Verdünnung: $N_1=c_1 \times V_1$ und nach der Verdünnung: $N_2=c_2 \times V_2$; da $N_1=N_2 \Rightarrow c_1 \times V_1=c_2 \times V_2$; dabei ist: V_1 : das vorgelegte Volumen mit gewünschter Zellzahl; c_1 : die Konzentration der Zellen in der Vorlage; V_2 : das Endvolumen nach der Einstellung; c_2 : die gewünschte Zellkonzentration. Berücksichtigen Sie bitte, dass Sie nur das Differenzvolumen V_2-V_1 an Medium zupipettieren müssen.

Vorgehen:

1. Bestimmen Sie die Anzahl der einzusetzenden Zellen (z. B. $4,0 \times 10^5$ Zellen in 2 ml)
2. Bestimmen Sie die Konzentration der Zellen in Ihrer Zellsuspension mit der Neubauer-Zählkammer (s. o.) (Beispiel: 1×10^6 Zellen/mL)
3. Pipettieren Sie nun das Volumen Ihrer Zellsuspension, das die gewünschte Zellzahl (hier: $4,0 \times 10^5$ Zellen) enthält.

$V_z = \text{Gewünschte Zellzahl/Zellkonzentration}$
(hier: $4 \times 10^5 \text{ Zellen} / 1,0 \times 10^6 \text{ Zellen/mL} = 0,4 \text{ mL}$)
in die Vorlage (Falcon)

4. Pipettieren Sie das Differenzvolumen zum Endvolumen (hier: $2 \text{ mL} - 0,4 \text{ mL} = 1,6 \text{ mL}$) in Ihr Röhrchen.

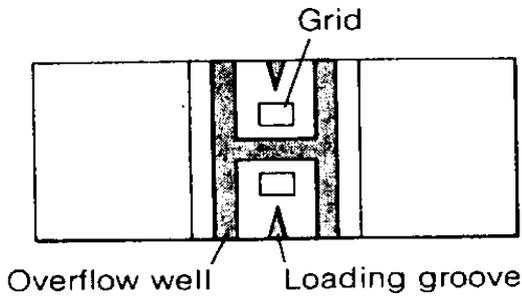


Abb. 1: Neubauer-Zählkammer

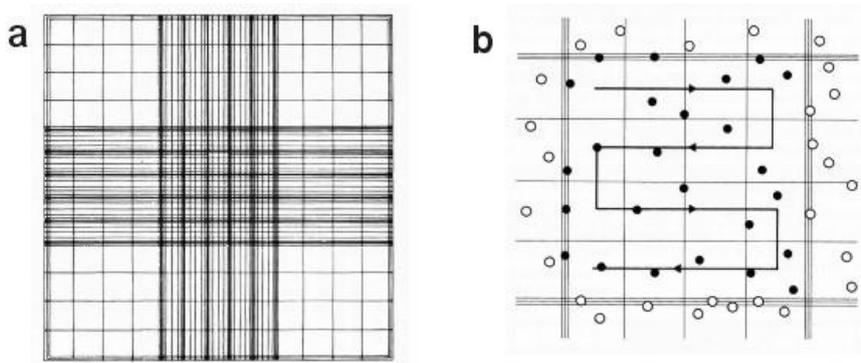


Abb. 2: a: Netzteilung einer Neubauer-Zählkammer mit 4 Großquadraten in den Ecken; b: Auszählen der Zellen (schwarz) in einem äußeren großen Quadrat der Zählkammer; Quelle: Lindl: Zell- und Gewebekultur (4.Auflage), Spektrum Akademischer Verlag

Kultivierung der Zellen

RAW 264.7-, CACO-2-, und RBL-2H3-Zellen werden liegend bei 37° C und 5% CO_2 kultiviert, wobei die Zufuhr der Umgebungsatmosphäre durch die Verwendung von gasdurchlässigen Schraubdeckeln oder durch Lockern der Deckel im Brutschrank sicherzustellen ist.

1. Messung der Aktivierung von Makrophagen über die Ausschüttung von Zytokinen

Die Messung der Konzentration eines gebildeten Immunmediators (Zytokins, hier Tumornekrosefaktor- α , TNF) durch Makrophagen gibt Aufschluss über das Ausmaß der Aktivierung dieser Zellen. Im vorliegenden Fall werden RAW Zellen mit dem Zellwandbestandteil eines gramnegativen Bakteriums (Endotoxin) stimuliert.

Versuchsdurchführung:

- Pipettieren Sie 100 μ L der entsprechenden Zellsuspension ($1,0 \times 10^5$ Zellen/mL Medium) in jeweils 16 wells (2 Spalten) einer Mikrotiterplatte, die Zellen von 2 bis 3 ProbandInnen auf einer Platte.
- Stellen Sie aus der Stammlösung eines Endotoxins (von *E. coli* K12, 1 mg/mL) zunächst eine Stammlösung mit 60 μ g/mL in Kulturmedium her; hieraus erstellen Sie eine dekadische Verdünnungsreihe mit 7 Verdünnungsstufen (6 μ g/mL; 600 ng/mL; 60 ng/mL; 6 ng/mL; 600 pg/mL; 60 pg/mL; 6 pg/mL) (Abb. 6). Stellen Sie zwei dieser Verdünnungsreihen für das gesamte Praktikum her.

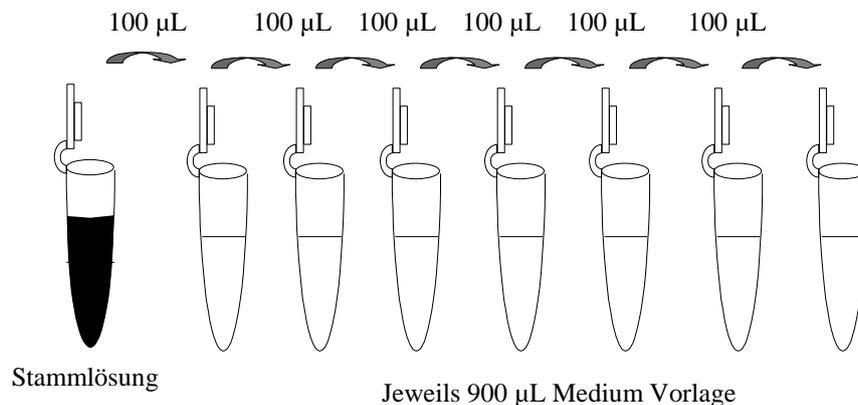


Abb. 3: Dekadische Verdünnungsreihe

- Pipettieren Sie jeweils 20 μ L der Endotoxin-Lösung mit einer identischen Konzentration in zwei benachbarte Wells mit der Zellsuspension. Zu zwei wells fügen Sie 20 μ L komplettes Medium zu.
- Nach maximal 16 h (Zeit zwischen Stimulation und Abbruch notieren!) pipettieren Sie 110 μ L der Lösung in ein vorher beschriftetes Ependorffhütchen, auf das Sie zuvor die Konzentration des zur Stimulation eingesetzten Endotoxins und Ihr Namenskürzel aufgeschrieben haben und frieren sie die Proben bei -20°C ein.
- Für die Durchführung des ELISAs, für den ein Probenvolumen von 100 μ L benötigt wird, verwenden Sie die Proben, die Sie nach folgendem Schema verdünnen müssen, damit diese messbar sind:

Eingesetzte Endotoxin-Konzentration	0	1 μ g/mL	10 μ g/mL	100 μ g/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	1 μ g/mL
Verdünnungsfaktor	unverdünnt	unverdünnt	2	2	5	5	5	5

ELISA – Protokoll

Vorbereiten der Platte

1. “Capture“-Antikörper mit PBS auf Arbeitskonzentration verdünnen. 96-well Platte mit 100 µl pro well des verdünnten “Primär-Antikörper“ bedecken. Platte abdichten und über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren.
2. Lösung aus jedem well abnehmen (auskippen), abklopfen und dreimal mit Waschpuffer waschen. Gewaschen wird durch Zugabe von etwa 200 µl Waschpuffer pro well unter Verwendung einer Spritzflasche oder einer Multipette. Die Entfernung der Lösung ist essentiell für ein gutes Ergebnis. Nach dem letzten Waschen wird der zurückgebliebene Waschpuffer gründlich durch Absaugen oder durch Abklopfen der umgedrehten Platten auf sauberem Papierhandtüchern entfernt.
3. Durch Zugabe von 300 µl Blockierpuffer pro well werden die freien unspezifischen Bindungsstellen gebunden und die Platte dazu für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Die Platte wie unter 2 waschen.

Messung

1. 100 µl Probe oder Standard (in Verdünnungsreagenz) werden in einer geeigneten Verdünnung in die wells gegeben. Platten werden mit Klebefolie bedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
2. Die Platte wird erneut wie unter Punkt 2. “Vorbereiten der Platte“ gewaschen.
3. Es werden 100 µl des „Detection“-Antikörpers in Verdünnungspuffer pro well gegeben. Die Platte wird mit einer neuen Klebefolie bedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Die Platte wird erneut wie unter Punkt 2. “Vorbereiten der Platte“ gewaschen.
5. Es werden 100 µl der Arbeitslösung mit Streptavidin-HRP in jedes well gegeben, die Platte erneut abgedeckt und für 20 Minuten unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung inkubiert.
6. Die Platte wird erneut wie unter Punkt 2. “Vorbereiten der Platte“ gewaschen.
7. Es werden 100 µl Substratlösung in jedes well gegeben. Es wird für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung inkubiert.
8. Es werden 50 µl Stopplösung in jedes well gegeben und die Platte leicht geklopft, um eine gründliche Mischung sicherzustellen.
9. Sofort danach wird die optische Dichte mit dem Mikroplattenleser bei 450 nm bestimmt. Als Korrekturwellenlänge kann 540 nm oder 570 nm verwendet werden. Durch den Abzug dieser Werte, werden optische Fehler der Platte ausgeglichen.

Wird nur bei 450 nm gemessen, können die Werte höher und weniger genau ausfallen.

Erstellen Sie eine Dosis-Wirkungskurve. Wie hoch ist die halbmaximale Konzentration des Endotoxins bei der Induktion der TNF Ausschüttung?

2. Zell-Vitalitätstest: Zytotoxizität von Schimmelpilzgiften

Das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) hemmt die Translation von mRNA zu Protein und ist sowohl für Lymphozyten als auch für Darmzellen ein starker Proliferationsinhibitor. Vor allem in der Tiermast ist das Auftreten von DON nach Getreideernten am Ende einer feuchten Wetterperiode aufgrund der Induktion von Immunschwächen gefürchtet. Im vorliegenden Versuch soll die halbmaximale effektive Dosis (ED₅₀) für die Proliferationsinhibition einer Darmzelllinie (CACO-2) bestimmt werden.

ACHTUNG: Trypsinierung der CACO-2 Zellen nicht zu früh abbrechen, damit die Zellen nicht zusammenhängen

Zell-Stammlösung: $4,0 \times 10^4$ CACO-2 Zellen/ml RPMI ohne Phenolrot und 20 % fötalem Kälberserum (FCS) + 1% L-Glutamin-Stammlösung (gut homogenisieren)

DON-Stammlösungen: Aus einer Ur-Stammlösung des Mykotoxins DON (500 µg/ml) wird eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 100 µg/ml, 20 µg/ml, 4,0 µg/ml, 0,8 µg/ml und 0,16 µg/ml in Kulturmedium hergestellt.

MTT-Lösung: 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid:
 $C_{18}H_{16}N_5SBr$, **lichtempfindlich** und **giftig: Handschuhe tragen!**
 5 mg/ml in RPMI ohne FCS/ohne Phenolrot

Aussaat: Die Aussaat erfolgt in 96-Well-Mikrotiterplatten. In einer 3-fachen Wiederholung nebeneinander werden in jede Vertiefung 100 µl Zell-Stammlösung, 20 µl DON-Stammlösung (mit PenStrep) und 80 µl Medium gegeben. Für jede Spalte wird eine andere DON-Stammlösung verwendet. In die sechste Spalte werden statt des DON-Zusatzes 20 µl Medium zupipettiert. Alle Arbeiten sind steril durchzuführen.

Versuchsansätze vorsichtig homogenisieren!

Nach einer Inkubation von ca. 96 Stunden bei 37°C im Brutschrank werden zur Messung der Vitalität 20µl der MTT-Lösung pro Well zugegeben. Nach drei Stunden Inkubation, während der das zugegebene MTT nur durch vitale Zellen zu einem Tetrazolium-Salz reduziert wird (Abb. 7), wird der Überstand abgenommen und anschließend 100µl Zellyselösung (Isopropanol mit 5% konz. Ameisensäure) pro Well zugesetzt. Es erfolgt 20-30 minütiges Schütteln der Mikrotiterplatte auf dem Taumler. Die Auswertung erfolgt photometrisch im Mikrotiterplattenleser bei einer Wellenlänge von 550 nm (Referenz-Wellenlänge 690 nm). Bei dieser Wellenlänge wird die Menge der zur Reduktion des MTT befähigten vitalen Zellen und die damit verbundene Blauverschiebung gemessen. Aus der Abhängigkeit der Extinktion des gebildeten Farbstoffes von der eingesetzten DON-Konzentration lässt sich die halbmaximale Wirkungsdosis berechnen.

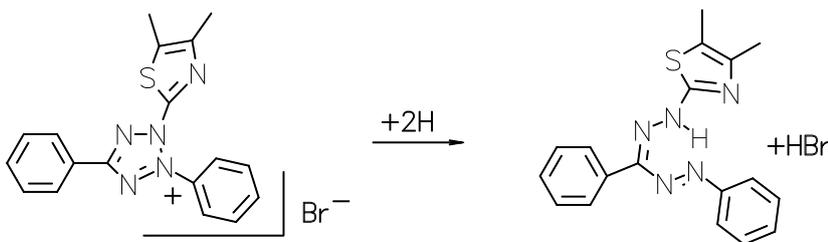


Abb. 4: Reduktion des MTT in den Mitochondrien vitaler Zellen

3. Durchflusszytometrische Identifizierung von Leukozyten

In diesem Versuch werden mit Hilfe der Durchflusszytometrie Leukozyten-Subpopulationen des peripher-venösen Blutes untersucht. Im Cytometer werden die durch dynamische Fokussierung vereinzelt Zellen von einem Laserstrahl definierter Wellenlänge bestrahlt (Abb. 8). Die Differenzierung findet sowohl aufgrund von morphologischen Eigenschaften der Zellen als auch durch Antikörpermarkierung von charakteristischen Proteinstrukturen der Zelloberfläche, sog. Oberflächenmarkern (CD-Marker: cluster of differentiation) statt.

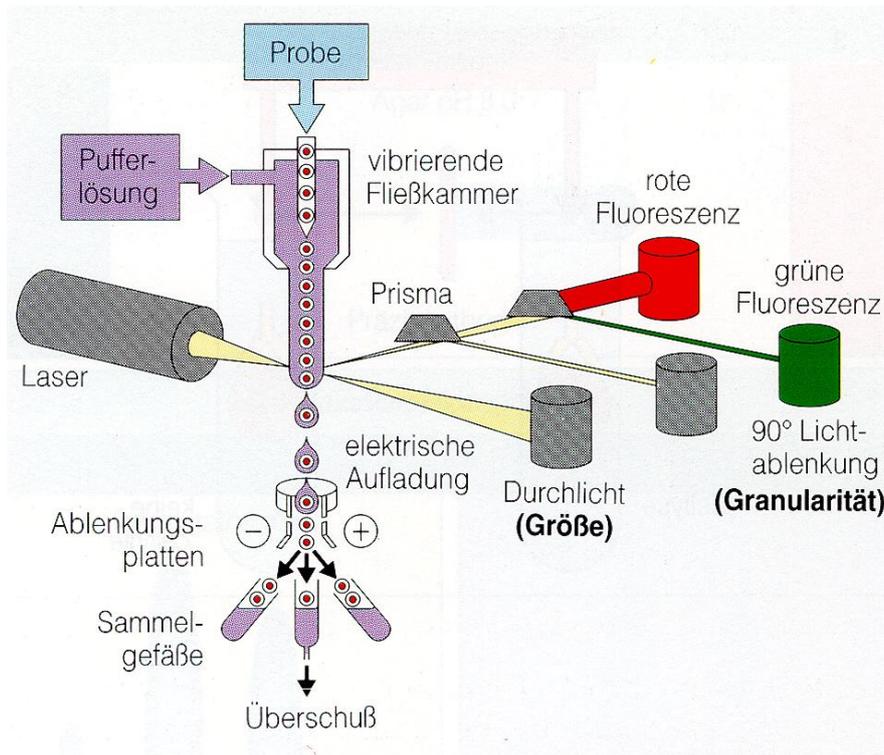


Abb. 5: Schematischer Aufbau und Funktion eines Durchflusszytometers

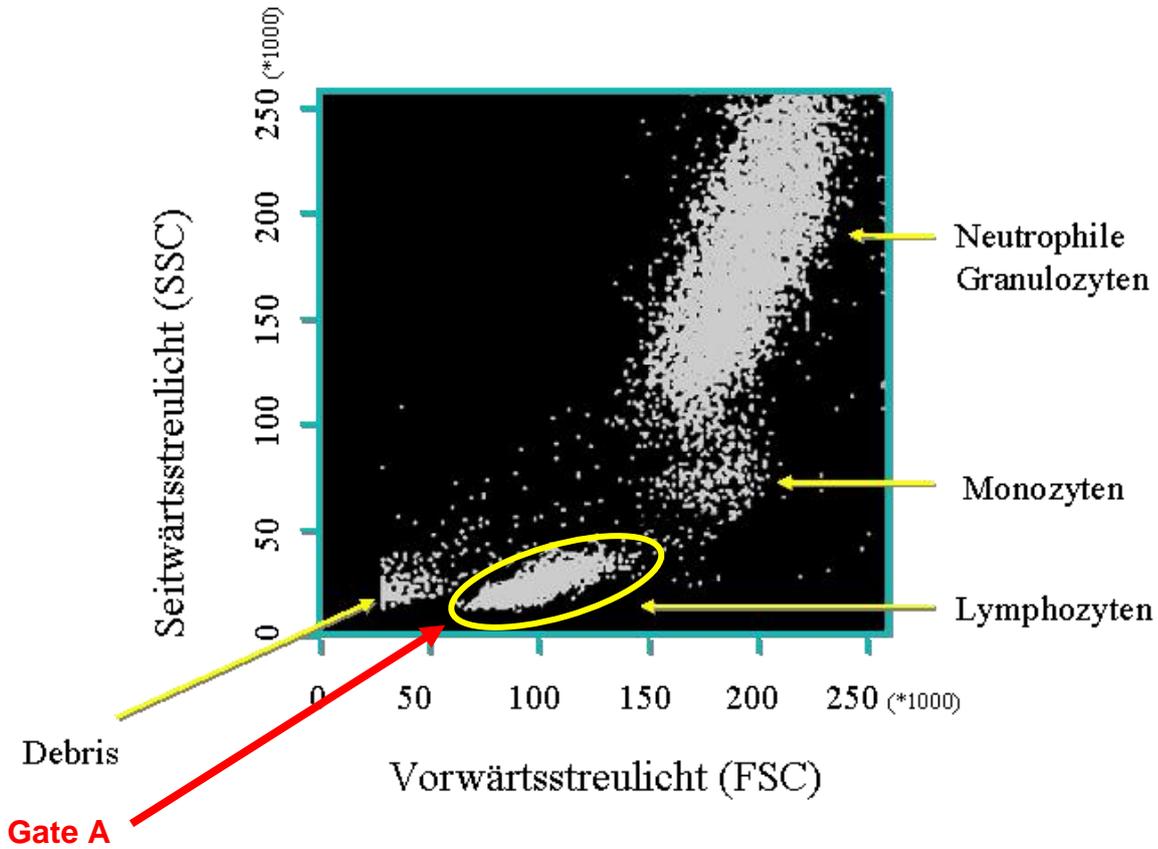
Morphologische Merkmale:

Die Größe der Zellen und damit die Menge an Cytoplasma entscheidet über die Lichtbrechung des Laserstrahls (Signal im „Forwardscatter“: FSC), die Granularität entscheidet über dessen (seitliche) Streuung (Signal im „Sidewardscatter“: SSC). Dadurch ist eine bedingt scharfe Trennung der Populationen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten möglich (Abb. 8).

Expression von Oberflächenmarkern:

CD-Marker haben meist die Funktion von Rezeptoren, die nach Stimulation durch ein äußeres Signal (Ligand, z. B. Zytokin wie IL-2) eine intrazelluläre Signaltransduktion initiieren. Durch mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte (monoklonale) Antikörpern lassen sich CD-Marker auf der Zelloberfläche kenntlich machen, die eng mit der Funktionalität der Zelle zusammenhängen (Tab. 2). Dies ermöglicht die Differenzierung morphologisch nicht unterscheidbarer Zellen (Abb. 9).

Lysiertes Blut im FSC und SSC



Zweifarbige Zellanalyse

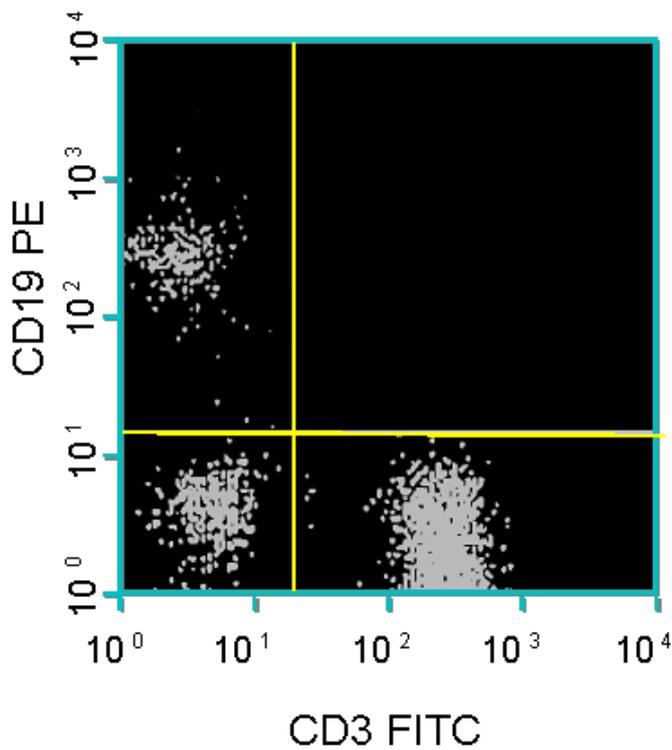


Abb. 6: Histogramme der durchflusszytometrischen Messung von Leukozyten des peripher-venösen Blutes; oben: FSC/SCC: zu erkennen sind die Lymphozyten, die Monozyten und Granulozyten. Das untere Diagramm beziehen sich ausschließlich auf Zellen, die im oberen Diagramm in Gate A eingefasst sind (Lymphozyten). Im linken unteren Diagramm sieht man die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten nach Markierung mit anti-CD3 (FITC, X-Achse) und anti-CD19 (PE, Y-Achse).

Ausprägung der Expression von Oberflächen- (CD-) Markern auf Leukozytensubpopulationen

Marker	Zelltyp					
	Monozyten	Lymphozyten				Granulozyten
		T-Helferzellen (T _H 1/T _H 2)	Cytotoxische Lymphozyten	B-Lymphozyten	NK-Zellen	
CD 3	-	+++	+++	-	-	-
CD 4	+	+++	-	-	-	-
CD 8	-	-	+++	-	-	-
CD 14	+++	-	-	-	-	(+)
CD 16/56	-	-	-	-	+++	-
CD 19	-	-	-	+++	-	-
CD 45	++	+++	+++	+++	+++	+++

Im Praktikum werden die folgenden Subpopulationen bestimmt:

Subpopulation	Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Antikörper:
T-Lymphozyten	CD3 FITC
T-Helferzellen	CD4 APC
Cytotoxische T-Zellen	CD8 PE
B-Zellen	CD19 APC
Natürliche Killerzellen	CD56/16-PE
Alle Leukozyten	CD45-PerCP

Vorgehensweise:

Lyse der Erythrozyten:

- Röhrchen beschriften
- Blut mischen; in jedes Röhrchen 100µl Vollblut auf den **Röhrchenboden** pipettieren.
- Je Probe 1 ml Lysis buffer zugeben,
- wenn Erythrozyten lysiert sind 1 ml PBS zugegeben und 5 min abzentrifugieren,
- Zellen in 1 ml PBS resuspendieren und 5 min abzentrifugieren,
- Zellen in 100 µl PBS resuspendieren und 2 µl Antikörper zugeben
- Probe vortexen und im Dunkeln bei 15 Min. bei RT inkubieren
- 1 ml PBS zugeben, 5 min abzentrifugieren
- Zellen in 0,3 ml PBS resuspendieren

Messung am Durchflusszytometer

Bitte werten Sie die erhaltenen Histogramme anhand folgender Fragen aus:

Messung Isotyp:

a) Wie groß ist der %uale Anteil der einzelnen Leukozytenpopulationen an allen **Leukozyten**?

	% ualer Anteil	Normwerte
Granulozyten		50 – 70 %
Lymphozyten		18 – 45 %
Monozyten		2 – 12 %
Summe:		

b) aus allen weiteren Messungen der Lymphozyten:

Wie groß ist der %uale Anteil der einzelnen Lymphozytensubpopulationen an allen **Lymphozyten**?

	% ualer Anteil	Normwerte
B-Lymphozyten		5-15 %
T-Helferzellen		35-65 %
Cytotoxische T-Zellen		17-35 %
NK-Zellen		2-20 %
Summe:		
T-Lymphozyten		75–93 %
CD4/CD8 ratio		1-3

c) Messung CD45/CD19:

Wie hoch ist der %uale Anteil der CD19-positiven Zellen an allen Leukozyten? _____%
 Vergleichen sie den Wert, den Sie für die Monozyten in der ersten Frage bestimmt haben.

d) Messung CD3/CD4:

Welche der Leukozytenpopulation(en) sind CD4 positiv? _____

e) Messung CD3/CD56/CD16:

Welche Zellpopulation(en) sind im CD16 positiv? _____

4. Immunofluoreszenzfärbung von Serotonin (5-HT) immunoreaktiven Zellen im Mausduodenum

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) wird aus Tryptophan synthetisiert und befindet sich zu über 90% im Gastrointestinaltrakt. Ein großer Anteil des Serotonins wird in enterochromaffinen Zellen synthetisiert und von diesen sekretiert.

Ziel der Serotonin-Immunofluoreszenzfärbung ist es, Serotonin immunoreaktive Zellen im Duodenum der Maus nachzuweisen.

Durchführung:

1. Die gefrorenen Schnitte 2 min trocknen lassen und für 10 min in 1xPBS waschen.
2. 10 min trocknen lassen.
3. Einzelne Schnitte mit DakoPen umkreisen und 2 min antrocknen lassen.
4. Schnitte in der Färbeschale mit Blocklösung (4% goat, 0,25% TritonX, 1xPBS) bedecken und 1 h bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Nach der Inkubation die Blocklösung von den Schnitten abkippen und auf Papier abtropfen lassen.
6. Die primäre Antikörperlösung pipettieren. Der rabbit Anti-Serotonin Antikörper ist im Verhältnis 1:1000 0,25% TritonX, 1xPBS anzusetzen. Die Schnitte 2 h bei Raumtemperatur inkubieren. ACHTUNG: 1 Schnitte sollte als Kontrollschnitt dienen und wird lediglich mit 1xPBS behandelt.
7. Nach der Inkubation, werden die Schnitte 3 x für 10 min in 1xPBS gewaschen.
8. Inkubiert wird mit dem sekundär Antikörper – anti-rabbit Alexa488. Den sekundär Antikörper 1:2000 in 0,25% TritonX, 1xPBS, verdünnen und die Schnitte weitere 2 h inkubieren.
9. Nach der Inkubation werden die Schnitte 3x für 10 min in 1xPBS gewaschen. Das Waschen erfolgt abgedunkelt da der Sekundärantikörper lichtempfindlich ist.
10. Die Färbung der DNA erfolgt mit DAPI dafür die Schnitte für 5 min mit DAPI-Lösung bedecken, welche 1:4000 in 1xPBS verdünnt ist.
11. Anschließend 1x für 10 min waschen.
12. Schnitte mit Medimount bedecken und ein Deckglas vorsichtig darauf setzen.
13. Anschließende Einweisung in die Immunofluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Färbungen.

5. Einfluss von sekundären Pflanzenstoffen (β -Carotin) auf die IgE vermittelte Zytokineexpression von Mastzellen

Sekundäre Pflanzenstoffe wie Carotinoide werden mit einer immunsupprimierende, anti-inflammatorischen Wirkung in Verbindung gebracht. So führt z. B. die Fütterung von Mäusen mit β -Carotin zu einer Verminderung der allergische Sofort-Typ-Reaktion. In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass Carotinoide hemmend auf die Degranulation von Mausmastzellen wirken. Ziel dieses Versuchs ist, den Einfluss von β -Carotin auf die IgE-vermittelte Zytokinproduktion in RBL2H3 Mastzellen zu untersuchen. Dazu soll die mRNA Expression des Zytokins IL-4 mittels real-time PCR bestimmt werden. Die Stimulation von Mastzellen mittels Quervernetzung des IgE-Rezeptors (in den Praktikumsversuchen durch DNP verursacht) löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die eine Mediatorexpression, -produktion und -freisetzung bewirkt.

Durchführung:

Aussaat und Stimulation der Zellen:

Es wird eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/mL Medium eingestellt. Von dieser Zellsuspension werden je 300 μ l in 10 Vertiefungen (wells) einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen (24-wellplatte) pipettiert. In die wells 3-10 werden jeweils 3 μ l DNP-spezifisches IgE gegeben. Die Platte wird über Nacht im Begasungsbrutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wird β -Carotin zu den Zellen gegeben, und zwar:

in die wells 5 und 6: 5 μ M β -Carotin,

in die wells 7 und 8: 10 μ M β -Carotin und

in die wells 9 und 10: 20 μ M β -Carotin.

Nach 4-stündiger Inkubation wird das Medium durch Pipettieren vorsichtig entfernt. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen, indem zunächst das Medium aus den Vertiefungen abpipettiert wird. Anschließend werden 500 μ l PBS in jede Vertiefungen gegeben, die Platte wird kurz geschwenkt und das PBS aus den wells entfernt. Dieser Waschschrift wird ein zweites Mal wiederholt. Dann wird 300 μ l Stimulationspuffer in die wells gegeben und anschließend in die wells 3-10 3 μ l DNP pipettiert. Mit Hilfe des DNPs werden die Zellen stimuliert. Nach 90-minütiger Inkubationszeit wird der Zellüberstand aus den Vertiefungen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die in den Vertiefungen verbleibenden Zellen werden mit 350 μ l RLT-Puffer lysiert. Das Lysat wird in entsprechend beschriftete 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt.

Isolation von mRNA

Die mRNA wird mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit isoliert. Dazu werden die aus dem Stimulationsversuch lysierten Proben (s.o.) mit 350 μ l 70 % Ethanol versetzt, gemischt und die gesamten 700 μ l auf eine RNeasy-Säule gegeben. Die Proben werden für 20 s bei 8000 g ($g = rcf$) zentrifugiert, der Durchlauf wird verworfen. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt nach Zugabe von 700 μ l RW1-Puffer und zweimaliges Waschen mit je 500 μ l RPE-Puffer. Nach dem letzten Waschschrift werden die Proben 2 min bei 8000 g zentrifugiert. Anschließend werden die Säulen in ein neues Sammelröhrchen überführt und für 1 min bei 14000 g zentrifugiert. Die Säulen werden dann in vorher beschriftete 1,5 ml-Reaktionsgefäße gesetzt und die RNA mit 50 μ l RNase freiem H₂O von der Säule eluiert. Dann werden die Proben bei -20 eingefroren oder direkt für die „Reverse Transkription“ verwendet.

Reverse Transkription

Um aus der isolierte mRNA die cDNA zu gewinnen, werden 1 µl jeder RNA-Probe mit 9 µl ddH₂O verdünnt. Es wird ddH₂O verwendet das speziell für die Molekularbiologie aufbereitet wurde. 10 µl des RNA-ddH₂O-Gemisches werden mit 2,5 µl 5x first strand Puffer und 0,5 µl DNaseI versetzt und 15 min. bei 37°C inkubiert, um noch vorhandene genomische DNA aus der Probe zu entfernen. Der DNase-Verdau wird durch Zugabe von jeweils 1,25 µl 25 mM EDTA-Lösung gestoppt und die RNA durch 10 min Erhitzen bei 70 °C denaturiert. Nach kurzem Abkühlen der Proben auf Eis, erfolgt im Anschluss die reverse Transkription mittels

- 2,5 µl 5x first strand Puffer,
- 1,25 µl 100 mM Oligo dT Primer,
- 2 µl 5 mM dNTP,
- 1,25 µl 100 mM DTT,
- 0,125 µl SuperScriptIII reverse Transkriptase und
- 3,63 µl ddH₂O.

Das Umschreiben von einzelsträngiger mRNA zu complementärer DNA (cDNA) erfolgt für 1 h bei 50 °C. Anschließend werden die Proben bei -20 eingefroren oder direkt für die PCR verwendet.

Real-time PCR (polymerase chain reaction)

Die quantitative Expression eines Gens wird mittels real-time PCR bestimmt. Ein Mix aus 10 µl SYBR® Green PCR Master Mix, 8 µl ddH₂O (für die Molekularbiologie) und je 0,25 µl 200 mM forward und reverse Primer wird mit 1,5 µl cDNA-Probe in optical tubes im Biorad Multicolor Real-Time PCR Detection System IQ5 analysiert. Reaktionsproben ohne cDNA dienen als Negativkontrollen. Die Anzahl der verwendeten Zyklen beträgt 40. Jeder Zyklus setzt sich, nach einer initialen Denaturierung für 3 min bei 95 °C, aus den folgenden drei Phasen zusammen: der Denaturierung für 15 s bei 95 °C, der Primerhybridisierung für 30 s bei 56 °C und der Elongationsphase für 30 s bei 72 °C. Die Amplifikation von unspezifischen Fragmenten wird ausgeschlossen, indem für jede Probe die Schmelztemperatur bestimmt wird.

Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen der Transkription des Zielgens (IL-4) und eines nicht-regulierten *housekeeping genes* (GAPDH) mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Die Berechnung mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wird durchgeführt wie folgt:

1. $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Zielgen}} - \text{CT}_{\text{Referenzgen}}$
2. $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} - \text{höchster } \Delta\text{CT je Untersuchung}$
3. $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

Wie stark wird die IL-4 Expression durch die IgE vermittelte Stimulation in RBL Zellen induziert?

Wie stark inhibiert die Zugabe von β -Carotin diese Induktion?

Welche Konzentration von β -Carotin ist am wirksamsten?

6. Lebendkeimzahlbestimmung von Bakterien aus probiotischem und nicht-probiotischem Joghurt

Probiotische Lebensmittel („pro bios“ = für das Leben), insbesondere Joghurts, enthalten spezielle *Lactobacillus*-Stämme, die zur Förderung der Gesundheit beitragen können. Voraussetzung für eine gesundheitsfördernde Wirkung ist die Kolonisierung des menschlichen Darms. Eine Kolonisierung ist jedoch auf Grund des Fehlens von Adhärenzmechanismen nicht von Dauer, so dass die Milchsäurebakterien durch regelmäßigen Verzehr von Joghurt zugeführt werden müssen. Die Ansiedelung der Laktobazillen im Darm unterstützt die Aufrechterhaltung der Darmflora. Eine gesunde Darmflora, so wie ein leicht saurer pH-Wert, der durch die Laktobazillen hervorgerufen wird, ist wichtig für die Vorbeugung von Darminfektionen (z.B. Salmonellosen). Testreihen verdeutlichen außerdem, dass Laktobazillen das Immunsystem stärken. Im Praktikum wird die Lebendkeimzahl von *Lactobacillus*-Stämmen aus verschiedenen probiotischen und nicht-probiotischen Joghurts bestimmt.

Material:

MRS-Agarplatten

Blutagarplatten

Anaerocult

0,9% NaCl

Joghurt

Gelbe Pipettenspitzen, blaue Pipettenspitzen, Eppendorf-Cups (alles steril)

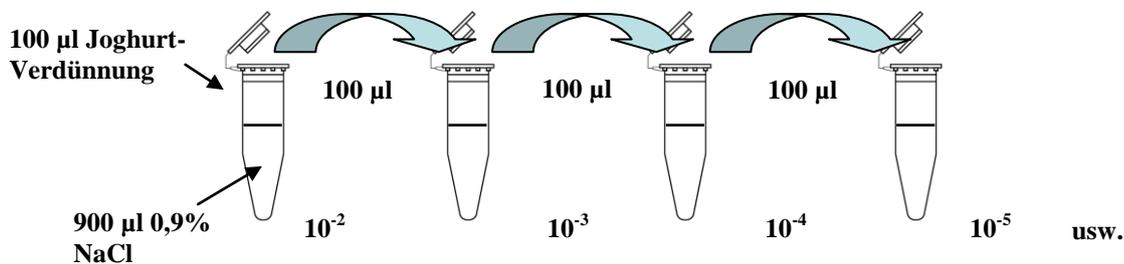
Durchführung:

MRS-Agarplatten: Pulver für 500 ml Agar einwiegen, in eine 1l-Schottflasche geben und 500 ml Wasser sowie ein Magnetrührstäbchen hinzugeben. Kurz rühren lassen und dann autoklavieren. Nach dem Autoklavieren die Agarplatten gießen. Der Agar sollte dafür ca. 60 °C haben

0,9% NaCl: NaCl für 100 ml Lösung einwiegen, in eine 250 ml Schottflasche geben und autoklavieren.

Verdünnungsreihe zur Keimzahlbestimmung:

Stellen Sie eine Verdünnungsreihe des Untersuchungsmaterials in steriler 0,9%iger NaCl-Lösung bis zur Stufe 10^{-7} her. Der Joghurt ist bereits 1:10 verdünnt (10^{-1}).



Bearbeiten Sie alle Schritte in einer Steril-Werkbank. Verwenden Sie für jeden Verdünnungsschritt eine neue Pipettenspitze und mischen Sie die Suspension vor dem Weiter-Verdünnen jedes Mal gründlich.

Plattieren Sie jeweils 50 µl der Verdünnungsstufen 10⁻¹ bis 10⁻³ auf einer gedrittelten Platte und der Verdünnungsstufen 10⁻⁴ bis 10⁻⁷ auf einer geviertelten Platte aus. Das Ausplattieren erfolgt sowohl auf MRS- als auch auf Blutagarplatten. Die Agarplatten werden zusammen mit einem Anaerotest-Indikatorstäbchen und dem angefeuchteten Anaerocultreagenz-Päckchen in eine Tüte gepackt. Alle Platten werden 48h bei 37°C im Brut-Schrank bebrütet.

Auswertung:

Zählen Sie die KBE und bestimmen Sie die Keimzahl pro ml. In manchen Joghurtsorten treten verschiedene Kolonie-Arten auf.

Tragen Sie zunächst die Zahl der Kolonien, die auf dem Agar angewachsen sind, in die Tabelle ein. Berechnen Sie dann die dazugehörigen Keimzahlen pro 1 ml Kultur.

$$\text{KBE/ml} = \text{Keimzahl/ml} = \text{Koloniezahl} / (\text{Verdünnungsstufe} \times \text{aufgetragenes Vol. [ml]})$$

Joghurt:									
Verdünnungsstufe		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	KBE/ml
MRS-Agar									
Blutagar	klein*								
	groß*								
	gesamt*								

*Berechnung jeweils für kleine, große und alle Kolonien

Joghurt:									
Verdünnungsstufe		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	KBE/ml
MRS-Agar									
Blutagar	klein*								
	groß*								
	gesamt*								

*Berechnung jeweils für kleine, große und alle Kolonien

Wie viele verschiedene Kolonie-Arten können Sie auf dem Blutagar erkennen?.....

Wie ist das Verhältnis zwischen der Keimzahl der Lactobazillen und der Gesamtkeimzahl?.....