

Gleichzeitige Bestimmung des Verhältnisses von N-Ras zu Interleukin-2 Expression auf mRNA und Proteinebene

Isabel, Leuenberger, BMA 17-20 B

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

DBMR Department for BioMedical Research, Zytometrielabor

1. Zusammenfassung

Interleukin-2 (IL-2) ist ein Zytokin welches die Proliferation und Differenzierung von Zellen fördert. IL-2 aktiviert verschiedene Signalwege, darunter auch den RAS-Signaltransduktionsweg, welcher damit endet, dass die Zelle von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus übergeht. Die Aktivierung der Ras-Proteine in diesem Signalweg ist dabei entscheidend für die Entwicklung und Funktion der T-Lymphozyten, denn sie sind an der Regulation der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose beteiligt. Zu der Gruppe der Ras-Proteine gehört auch N-Ras. Aktivierende Mutationen von N-Ras kommen häufig in hämatopoetischen Tumoren beim Menschen vor. Aus diesem Grund wird in dieser Diplomarbeit mit Jurkat-Zellen gearbeitet. Sie sind einerseits gute Produzenten von IL-2 und es sind T-Lymphozyten aus einer akuten T-Lymphozyten-Leukämie. Das Ziel dieser Arbeit war die gleichzeitige Messung von Transkription und Translation von N-Ras und IL-2 innerhalb einer Zelle. Dies wäre mit dem PrimeFlow RNA Assay von ThermoFisher durchgeführt worden. Der Assay sollte die RNA- und Proteinexpression innerhalb einzelner Zellen aufzeigen. Für die Messung der Antikörpertitrationen der intrazellulären und Oberflächenmarker wurde das Durchflusszytometer CytoFLEX von Beckman Coulter benutzt. Während die optimale Konzentration des IL-2 – Antikörpers bei den Antikörpertitrationen ermittelt werden konnte, blieben die Signale beim N-Ras – Antikörper negativ. Mit Kompensations-Beads wurde der N-Ras – Antikörper kontrolliert. Die PBMC Gewinnung aus Vollblut war beim dritten Vorgehen erfolgreich. Die optimalen Konzentrationen der Oberflächenmarker konnten bis auf zwei Antikörper bestimmt werden. Das Problem mit dem N-Ras – Antikörper lag wahrscheinlich an den Jurkat-Zellen. Man ging am Anfang davon aus, dass nicht stimulierte Jurkat-Zellen genügend N-Ras exprimieren für die Detektion mittels Antikörper. Dies scheint nicht der Fall zu sein. Eine Aktivierung der Zellen ist daher auch für die Antikörpertitration notwendig.

Schlüsselbegriffe: Interleukin-2, N-Ras, Jurkat-Zellen, PrimeFlow

2. Einleitung

Interleukin 2

IL-2 ist ein Zytokin welches die Proliferation und Differenzierung von Lymphozyten fördert. Es aktiviert verschiedene Signalwege, darunter auch den RAS-Signaltransduktionsweg. Das Ergebnis ist die vermehrte Produktion von Cyclin D2, welche der Zelle es nun erlauben aus der G1-Phase in die S-Phase überzugehen. [1]

Jurkat-Zellen wurden ausgewählt, weil sie nach Stimulation gute Produzenten von IL-2 sind. [2]

N-Ras

N-Ras gehört zur Gruppe der Ras-Proteine. Ras-Proteine sind an der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von T-Zellen beteiligt. Häufig werden in hämatopoetischen Tumoren aktivierende Mutationen von N-Ras gefunden. [3]

Da Jurkat-Zellen T-Lymphozyten einer akuten T-Lymphozyten Leukämie sind, lässt es die Annahme zu, dass der N-Ras Signaltransduktionsweg verändert vorliegt.

PrimeFlow RNA Assay von ThermoFisher Scientific

Der Assay zeigt die RNA- und Proteinexpression innerhalb einzelner Zellen auf und ermöglicht so eine Analyse ihrer Korrelation. Mit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) können dabei bis zu vier RNA-Transkripte gleichzeitig nachgewiesen werden. [4]

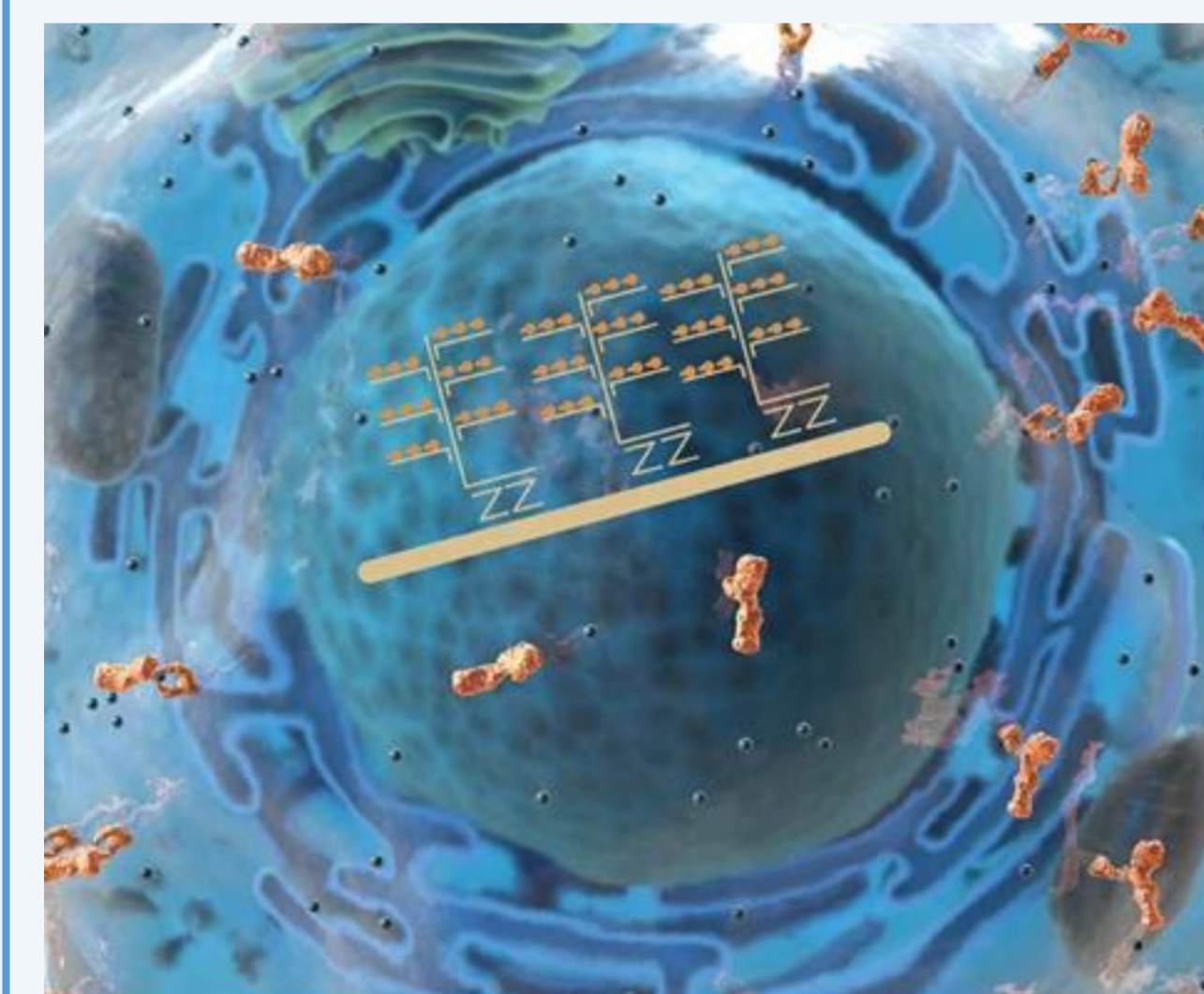


Abb. 2.1: PrimeFlow RNA Assay

3. Ziele und Fragestellungen

Zielsetzung 1: Gleichzeitige Messung von Transkription und Translation auf Einzelzellebene von N-Ras und IL-2 im Modellsystem einer akuten T-Zell-Leukämie (Jurkat-Zellen) und primären CD8+ T-Lymphozyten.

Fragestellung 1: Kann die mRNA- und Proteinexpression von N-Ras und IL-2 sowohl in einer Zelllinie als auch in primären Zellen gleichzeitig und zuverlässig auf der Einzelzellebene bestimmt werden? Entspricht die sub-zelluläre Verteilung der Expressionen den Erwartungen?

4. Material, Methodik, Vorgehen

In einem ersten Schritt wurden Jurkat-Zellen aufgetaut und kultiviert. Für die Zellkultur wurde dabei RPMI-1640 Medium verwendet welches zusätzlich 10% Fetales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B (P/S/A) enthielt. Zusätzlich wurde als Puffer phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) verwendet.

Für die Antikörpertitration der intrazellulären Marker wurden die Antikörper gegen IL-2 und N-Ras sowie der Antikörper BOBO-3 für die Markierung von Nukleinsäuren verwendet. Der BOBO-3 Antikörper musste dabei zuerst 1:100 vorverdünnt werden. Vor der Titration musste ebenfalls der N-Ras Antikörper markiert werden, dafür wurde das ThermoFisher APEX Pacific Blue Antibody Labeling Kit benutzt. Zur Kontrolle, ob die Antikörpermarkierung erfolgreich war, wurde die Titration des N-Ras Antikörpers zusätzlich mit Kompensation-Beads angesetzt.

Für die Antikörpertitration der Oberflächenmarker mussten zuerst PBMC aus Vollblut isoliert werden. Für die Gewinnung von PBMC aus Vollblut wurde das Vorgehen von BD Vacutainer CPT durchgeführt. Für eine schonende Gewinnung damit viele Zellen überlebten wurde statt PBS vorgewärmtes RPMI-1640 Medium +10% FCS +1% P/S/A verwendet. Für die Titration wurden die Antikörper gegen CD4, CD14, CD15, CD19, CD335 sowie die beiden Antikörper CD8 PE und CD8 PE-Cy5 verwendet.

Für die Messung der Antikörpertitrationen der intrazellulären und Oberflächenmarker wurde das Durchflusszytometer CytoFLEX von Beckman Coulter benutzt.

5. Ergebnisse/ Resultate

Folgende optimale Konzentrationen der Antikörper konnten ermittelt werden:

| Antikörper | Optimale Konzentration |
|------------------|------------------------|
| BOBO-3 iodide | 1:16'000 – 1:32'000 |
| IL-2 PE | 1:40 – 1:80 |
| N-Ras mit Jurkat | Signal negativ |
| N-Ras mit Beads | 1:20 – 1:40 |
| CD4 BV421 | 1:80 |
| CD8 PE | 1:160 |
| CD8 PE-Cy5 | Signal negativ |
| CD14 BV711 | Signal negativ |
| CD15 FITC | Signal negativ |
| CD19 BV786 | 1:160 |
| CD335 PE-Cy7 | 1:40 |

Tab. 5.1: Resultate der Antikörpertitrationen

6. Diskussion

N-Ras – Antikörper

Das Signal des N-Ras – Antikörper mit Jurkat-Zellen war bei jedem Versuch negativ. Der Verdacht, dass es an der Antikörpermarkierung liegt konnte mit der Kontrolle des Antikörpers mit Kompensations-Beads ausgeschlossen werden. Die Annahme, dass Jurkat-Zellen eine aktivierende Mutation von N-Ras haben ist entweder falsch oder man hätte die Jurkat-Zellen schon für die Antikörpertitration aktivieren und stimulieren müssen.

CD8 – Antikörper

Es wurden hier zwei Antikörper getestet welche das Labor bereits an Lager hatte. Die Wahl fiel nach der Titration auf den CD8 PE – Antikörper da dieser ein Signal hatte. Der CD8 PE-Cy5 – Antikörper war wahrscheinlich zu alt und hatte deshalb kein Signal mehr.

CD14 + CD15 – Antikörper

Beide Antikörper hatten kein Signal. Da diese Antikörper neu gekauft wurden, muss ein Fehler bei der Titration passiert sein. Die Titration dieser Antikörper hätte man wiederholen müssen.

Fragestellung

Aufgrund der SARS-CoV-2 Situation konnten entscheidende Arbeiten zur Beantwortung der Fragestellung nicht mehr durchgeführt werden. Die Fragestellung konnte nicht beantwortet werden.

Referenzen

- [1] DocCheck. (2009). *DocCheck Flexikon*. Abgerufen von <https://flexikon.doccheck.com/de/Interleukin-2>
- [2] Abraham, R. T., Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews / Immunology*, 2004, 301-308.
- [3] Perez de Castro et al. (2003). Ras Activation in Jurkat T cells following Low-Grade Stimulation of the T-Cell Receptor Is Specific to N-Ras and Occurs Only on the Golgi Apparatus. *Molecular And Cellular Biology*, 2004, 3485-3496.
- [4] ThermoFisher Scientific. (2017). PrimeFlow RNA Assay: Simultaneous detection of RNA and protein by flow cytometry.

Abbildungen

Abbildung 2.1: ThermoFisher Scientific. (2017). PrimeFlow RNA Assay: Simultaneous detection of RNA and protein by flow cytometry.

Tabellen

Tabelle 5.1: Resultate der Antikörpertitrationen (eigene Darstellung).