

Specifieke binding van eiwitten in neutrofiele granulocyten aan Toll-like receptor 1, 2, 4 en 6

MEDIATHEEK HOGESCHOOL VAN UTRECHT
FACULTEIT NATUUR EN TECHNIEK
F.C. DONDERSTRAAT 65
3572 JE UTRECHT
030 - 275 88 61

Naam stagiair	: G.S. Morren
Afstudeerrichting	: Institute of Life Sciences & Chemistry richting lifesciences
Stage/afstudeer plaats	: Sanquin locatie CLB, afdeling Bloedcel Research
Mentor	: Dr. R. van Bruggen
Periode	: September 2004 t/m mei 2005
Plaats	: Amsterdam
Datum	: 27-05-2005



the end is the beginnig, is the end

in Memoriam

7-2-2002

Mediatheek HvU



0300 522 8901

Specific binding of proteins in neutrophilic granulocytes to Toll-like receptor 1, 2, 4 en 6

Name stagiair	: G.S. Morren
Graduate direction	: Institute of Life Sciences & Chemistry direction lifesciences
Trainingship	: Sanquin location CLB, department Bloodcell Research
Tutor	: Dr. R. van Bruggen
Training period	: September 2004 till may 2005
Place	: Amsterdam
Date	: 27-05-2005

Voorwoord

Vanaf september 2004 heb ik gedurende 9 maanden stage gelopen bij Sanquin locatie CLB, te Amsterdam. Gelijktijdig heb ik mij in deze periode bezig gehouden met mijn afstudeer project. Dit is gedaan op de afdeling *Experimentele Immunohematologie* welke halverwege gefuseerd is met de afdeling *Bloedcel Research*. Het project is gedaan onder leiding van Dr. R. van Bruggen.

Graag wil ik hierbij een aantal mensen bedanken. Namelijk alle mensen van de afdeling Bloedcel Research (kamer P114), Dr. N.M. Kamerbeek en in het bijzonder Dr. Robin van Bruggen. Prof. Dr. D. Roos, Prof. Dr. T.W. Kuijpers en Dr. A. Verhoeven wil ik bedanken voor hun adviezen tijdens de werkbijeenkomsten. En uiteraard ook m'n ouders, broer en zus. Natuurlijk ook de vrienden, die naar al dat gezeur moesten luisteren als dingen de afgelopen negen maanden weer eens niet lukten. Vooral Alet, Eric en natuurlijk m'n meisje, Es wil ik hierbij nog bedanken voor het luisterende oor, en natuurlijk ook voor de nieuwe inzichten die ze me gegeven hebben.

Bedankt.

Samenvatting

Neutrofiele granulocyten spelen een belangrijke rol in het aangeboren immuunsysteem. Eén van de receptoren die tot expressie komt op **neutrofiele granulocyten** is de **Toll-like receptor**. **Toll-like** receptoren zijn weer onder te verdelen in **Toll-like** receptor 1 t/m 10, maar vooral **Toll-like** receptor 1, 2, 4 en 6 komen voor op **neutrofiele granulocyten**. Er is al zeer veel bekend over de signaaltransductie route van de **Toll-like** receptor, echter niet binnen **neutrofiele granulocyten**. Daarom is gekozen voor het onderwerp: specifieke binding van eiwitten in **neutrofiele granulocyten** aan **Toll-like** receptor 1, 2, 4 en 6. Dit wil zeggen welke eiwitten, uit de signaaltransductie route, binden aan de intracellulaire staart van **Toll-like** receptor 1, 2, 4 en 6.

Voor de praktische aanpak is met behulp van de intracellulaire staart van de **Toll-like** receptor een fusie-eiwit gemaakt en in *E. coli* tot expressie gebracht. Met dit **fusie-eiwit**, gekoppeld aan **glutathion** bollen zijn later pull-downs (eiwit bindings experimenten) gedaan. Met pull-down proeven kunnen hele eiwit complexen uit **lysaat** van neutrofielen "gevist" worden. Op deze manier kan bepaald worden welke eiwitten uit de signaaltransductie route van **Toll-like** receptoren binden aan de intracellulaire **Toll-like** receptor. Deze kunnen aangetoond worden met antilichamen tegen de verschillende eiwitten uit de signaaltransductie. Onbekende eiwitten kunnen met behulp van massaspectrometrie geïdentificeerd worden.

Er is voor het induceren van fusie-eiwitten gebruik gemaakt van een expressie kit. Volgens de gebruikte expressie kit zou een verdunning gemaakt moeten worden van een primaire *E. coli* cultuur, wij hebben echter aangetoond dat de primaire cultuur in plaats van de verdunning geïnduceerd dient te worden. De inductie wordt gestart bij een OD₆₀₀ tussen de 0.4 en 0.6, aangezien de bacteriegroei dan in de exponentiële groeifase zit. Ook is na optimaliseren van het inductie protocol gebleken dat na anderhalf uur induceren de optimale eiwit productie tot stand komt. DTT, DFP en protease remmers dienen vers toegevoegd te worden aan **eiwitlysaat** voor sonificeren, anders treedt er afbraak van het fusie-eiwit op.

Er is een methode opgezet om **GST-TLR** fusie-eiwitten tot expressie te brengen. Met deze fusie-eiwitten is succesvol een aantal pull-downs gedaan. Daarmee is aangetoond dat er een eiwit uit het **lysaat** van **neutrofiele granulocyten** bindt aan het intracellulaire gedeelte van **Toll-like** receptor 1 en 2, dit eiwit heeft een molecuulgewicht van ongeveer 25 kDa. Waarschijnlijk is dit het **TIR-associated** protein ofwel **TIRAP**, welke eenzelfde molecuulgewicht heeft.

Summary

Neutrophilic granulocytes play an important role in the inborn immunesystem. One of the receptors that is expressed on neutrophilic granulocytes are the **Toll-like** receptors, especially **Toll-like** receptor 1, 2, 4 and 6. A lot is known about the signal transduction pathway of **Toll-like** receptors however within neutrophilic granulocytes a lot is still unknown. Therefore we chose to study the subject: specific binding of proteins in neutrophilic granulocytes to **Toll-like** receptor 1, 2, 4 and 6. In other words, which proteins from the signal transduction pathway of **Toll-like** receptors bind to the **intracellular** tail of **Toll-like** receptor 1, 2, 4 and 6.

For the practical approach we made a fusion protein with the intracellular tail of the **Toll-like** receptor, and **express** it in *E. coli*. This fusion protein, coupled to glutathion beads, was later used for pull-downs (protein binding experiments). With pull-down experiments **entire** protein complexes can be "fished" out of lysate of neutrophilic granulocytes. By this manner there can be found which proteins in the signal transduction pathway of **Toll-like** receptors on neutrophilic granulocytes bind to the intracellular tail of **Toll-like** receptors. These can be detected with antibodies against the different proteins from the signal transduction pathway. Unknown proteins can be identified with **mass** spectrometry.

The expression kit used, suggested to make a dilution of the primary *E. coli* culture. However, after performing multiple experiments, the primary *E. coli* culture needed to be induced instead of the diluted cultures. The induction must be **started** at an OD₆₀₀ **between** 0.4 and 0.6, due to the exponential growth fase the bacteria are present in. By optimizing the induction protocol the **optimal** expression of protein was found at 1,5 hour. DTT, DFP and protease inhibitors need to be freshly added to the protein lysate to **prevent** degradation of the fusion protein.

A method was set up to **express** GST-TLR fusion proteins. With these fusion proteins several pull-down experiments have been performed. We showed that there is **protein** binding from the lysate of neutrophilic granulocytes to the intracellular **part** of **Toll-like** receptor 1 and 2, this protein has a molecular weight of about 25 kDa. This might be the TIR-associated protein (**TIRAP**), which has the **same** molecular weight.

Afkortingen

DD	: Death Domain
fMLP	: N-formylated-methionine-leucine-phenylalanine peptide
GST	: Glutathion S-transferase
GST-TLR	: Glutathion S-transferase Toll-like receptor
HRP	: Horse Radish Peroxidase
IFN	: Interferon
IKK	: κ B kinase
IPTG	: Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside
IRAK-1	: IL-1R-geassocieerde proteïne kinase 1
IRF3	: Interferon-regulator factor 3
JNK	: Junk Kinase
LB_{amp.}	: LB medium met ampicilline resistentie
LB_{carb.}	: LB medium met carbanicilline resistentie
LBP	: LPS-bindings eiwit
LPS	: Lipopolysaccharide
LRR	: Leucine rijk domein
MAL/TIRAP	: MyD88-adaptor-like/TIR-associated protein
MKK6	: Map kinase kinase 6
MyD88	: Myeloïd differentiation factor 88
NEMO	: NF-KBessentiële modulator
OD₆₀₀	: Optical Density (600 nanometer)
PAMP	: Pathogen-associated microbial pattern
PGN	: Peptidoglycan
PRR	: Pattern recognition receptor
SOCS-1	: Suppressor van cytokine signaling-I
TAK-I	: Transforming growth factor-β-activated kinase
TIR	: Toll/IL-1 receptor
TIRAP	: TIR-associated protein
TLR	: Toll-like receptor
Tollip	: Toll/IL-1R interactie proteïne
TRAF-6	: TNF receptor-geassocieerde factor 6
TRAM	: Toll-receptor-associated molecule
TRIF	: TIR domein-bevattend adaptor inducerend IFN- β

Inhoudsopgave

1. Inleiding.....	1
1.1 Algemene inleiding	1
1.2 Inleiding immuunsysteem	1
1.3 Toll-like receptoren (TLRs).....	2
1.3.1 Basis structuur TLR	3
1.3.2 Signaaltransductie route	3
1.3.3 NF-KB.....	4
1.3.4 TLR4 signalering: MyD88-afhankelijk en MyD88-onafhankelijk	4
1.3.5 Adaptor eiwitten.....	4
1.3.6 Fagocytoses en TLRs	5
1.3.7 Co-stimulatie.....	6
1.3.8 Negatieve regulatie van TLR signalering.....	6
1.3.9 TLR 1, 2, 4 en 6.....	7
1.4 Project aanpak.....	7
2. Materiaal en methoden	10
2.1 polymerase chain reaction (PCR) intracellulaire staart TLR	10
2.2 Agarose gel electroforese.....	10
2.3 Zuiveren PCR produkt uit gel m.b.v. GFX PCR and GelBand Purification Kit van Amersham Biosciences catalogus nr. 27-9602-01.....	11
2.4 Kloneren PCR produkt in pENTR™/D-TOPO vector.....	12
2.5 Colony PCR.....	12
2.6 Minipreparaat m.b.v. "QIA prep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge" kit catalogus nr. 27106.....	13
2.7 Digestie minipreps	13
2.8 Sequenzen TLR insert	14
2.9 Maken LB-medium.....	14
2.10 Maken antibioticum resistente agar platen.....	15
2.11 Kloneren TLR vanuit pENTR™/D-TOPO vector in expressie vector via "E. coli expressie systeem met Gateway® Technology" catalogus nr. 11791-019	15
2.12 Transformeren GST-TLR expressie vector in E. coli BL21 cellen d.m.v. heatshock.....	16
2.13 Inductie GST-TLR m.b.v. IPTG en zuiveren van GST-TLR eiwit lysaat	16
2.14 GST-TLR pull-down op lysaat van neutrofielen.....	17
2.15 SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfaat polyacrylamide electroforese).....	18
2.16 Eiwit kleuring (coomassie)	19
2.17 Westernblotting.....	19
2.18 Detecteren met antilichamen	20
3. Resultaten	21
4. Discussie en conclusie.....	31
5. Literatuur	33
Bijlage 1: Tabellen immuunsysteem en Toll-like receptoren	
Bijlage 2: Gebruikte bacteriestammen/gemaakte constructen	
Bijlage 3: Protocollen	

1. Inleiding

1.1 Algemene inleiding

Sanquin verzorgt op non-profit basis de bloedvoorziening en bevordert transfusie-geneeskunde, zodanig dat wordt voldaan aan de hoogste eisen van kwaliteit, veiligheid en doelmatigheid. Sanquin levert producten en diensten, verricht wetenschappelijk onderzoek en verzorgt onderwijs, opleidingen, bij- en nascholing. De afdeling binnen Sanquin waarin ik mijn onderzoek doe, is Bloedcel Research, welke voor 1 januari Experimentele Immuno Hematologie heette. En de groep waarin ik zit onderzoekt killings processen in neutrofiele granulocyten. Binnen deze groep werken verschillende kleinere groepen aan een bepaald project. Het project waar ik aan gewerkt heb, maakte deel uit van een nieuw te starten onderzoekslijn, onder supervisie van mijn stage begeleider, Dr. R. van Bruggen.

De doelstelling van het onderzoek is; onbekende eiwitten, in neutrofiele granulocyten, binden aan de intracellulaire staart van Toll-like receptor 1, 2, 4 en 6. Dit gebeurt door met de Toll-like receptor te "vissen" in neutrofielen lysaat. Door de samenstelling van de buffer te veranderen, kunnen hele complexen uit de signaaltransductie route m.b.v. de Toll-like receptor uit het lysaat "gevist" worden. Deze kunnen vervolgens met behulp van antilichamen tegen een eiwit uit het complex (eiwitten uit de signaaltransductie route) aangetoond worden, de onbekende eiwitten kunnen bepaald worden door massaspectrometrie.

1.2 Inleiding immuunsysteem

Onze omgeving bevat een grote variëteit aan infectieuze microbes; virussen, bacteriën, funghi, protozoa en multicellulaire parasieten. Deze kunnen ziekte veroorzaken, en als ze ongecontroleerd blijven groeien zullen ze uiteindelijk hun gastheer doden. De meeste infecties zullen van korte duur zijn en laten weinig permanente schade achter. Dit komt door het immuunsysteem, welke strijdt met infectieuze agentia. Omdat micro-organismen in veel verschillende vormen voorkomen is er ook een grote variatie aan immuunresponsen nodig, om elk type infectie te bestrijden. Bij elke immuunrespons zal als eerste een pathogeen of ander lichaamsvreemde agens herkend moeten worden. Het immuunsysteem kan onderverdeeld worden in het adaptieve immuunsysteem (verworven of specifiek) en het aangeboren immuunsysteem (natuurlijk of niet-specifiek)^{tab 1(bijlagen)}

Het grootste verschil tussen het adaptieve en het aangeboren immuunsysteem is, dat het adaptieve immuunsysteem hoog specifiek voor een infectieus agens is. Het adaptieve immuunsysteem zal bij een tweede contact met eenzelfde agens de immuunrespons verbeteren, deze zal sneller optreden. Dit systeem onthoudt het infectieuze agens, en kan er zo voor zorgen dat ziekte een tweede keer voorkomen kan worden. Het aangeboren immuunsysteem heeft dit niet. Een immuunrespons wordt vooral geproduceerd door leukocyten en wel op de volgende manieren:

- Fagocyten en aangeboren immuunrespons.
- Lymfocyten en adaptieve immuunrespons.
- Interactie tussen lymfocyten en fagocyten.

Een belangrijke groep binnen de leukocyten zijn de fagocyterende cellen, zoals monocyten, macrofagen en segmentkernige granulocyten. Deze cellen binden aan

micro-organismen, internaliseren en doden ze. Omdat ze primitief niet-specifiek herkennen, kunnen een grote variatie aan micro-organismen binden. Ze zijn de "first line of defense" tegen infectie.

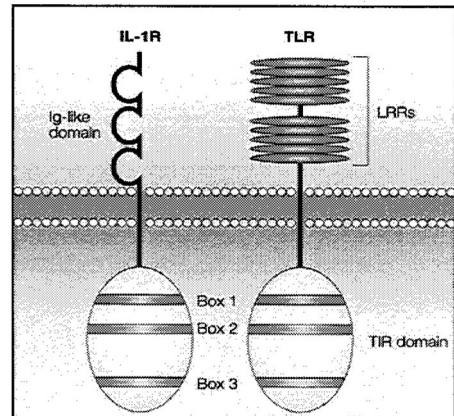
Segmentkernige granulocyten zijn de meest voorkomende leukocyten. Ze ontwikkelen uit dezelfde voorlopers als monocyt en macrofagen. Net als monocyt kunnen ze vanuit de bloedbaan in weefsels migreren, dit gebeurt door verschillende stimuli. Ze leven 2 tot 3 dagen. Segmentkernige granulocyten zijn onder te verdelen in; neutrofiel, **basofiel** en eosinofiel. 60-70% van de totale leukocyten concentratie bestaat uit de segmentkernige granulocyten. Van deze segmentkernige granulocyten is meer dan 95% neutrofiel. Neutrofielen hebben een **gelobte** kern en zijn ongeveer **10µm** in diameter. Ze hebben een groot arsenaal aan eiwitten opgeslagen in meerdere typen granules, waaronder azurofiele granules en specifieke granules. Azurofiele granules bevatten naast eiwitten ook lysozymen, specifieke granules bevatten naast de normaal aanwezige eiwitten lactoferrine. Een neutrofiel granulocyt herkent met zijn receptoren niet lichaamseigen, en **omsluit** daarna het agens, dit agens wordt in een **fagosoom** opgeslagen. Granules, aanwezig in de neutrofiel worden vervolgens leeggemaakt in het fagosoom, en het micro-organisme wordt afgebroken. Neutrofiel granulocyten arriveren snel op de **plaats** van infectie en vormen de eerste afweer. Ze bevatten een grote variatie aan antimicrobiële effector functies, onder andere de mogelijkheid cytokines te produceren. Dit alles om de ontstekingsreactie te starten. Chemokines induceren het aantrekken van immuuncellen. Door de eerste afweer van granulocyten heeft het adaptieve immuunsysteem de tijd om immuuncellen (T- en B-cellen) aan te maken en naar de ontstekingshaard te sturen'.

1.3 Toll-like receptoren (TLRs)

Pattern recognition receptoren (PRRs) kunnen "niet lichaamseigen" herkennen (ze zijn niet van herrangschikking afhankelijk, zoals een B en T cel dat wel zijn) en zijn onder te verdelen in twee groepen nl, uitgescheiden en cel-oppervlak receptoren^{2,3}. Een recent **geïdentificeerde** familie van cel-oppervlakte PRRs zijn de **Toll-like** receptoren (TLRs). TLRs zijn transmembraan eiwitten die gekarakteriseerd worden door een extracellulair **leucine-rijk domein (LRR)** en een cytoplasmatische staart welke een geconserveerde regio bevat. Stimulatie van verschillende TLRs induceert verschillende patronen van **genexpressie**, welke niet alleen leidt tot de activatie van het aangeboren immuunsysteem maar ook de ontwikkeling van antigen specifieke verworven immuniteit instrueert⁴.

1.3.1 Basis structuur TLR

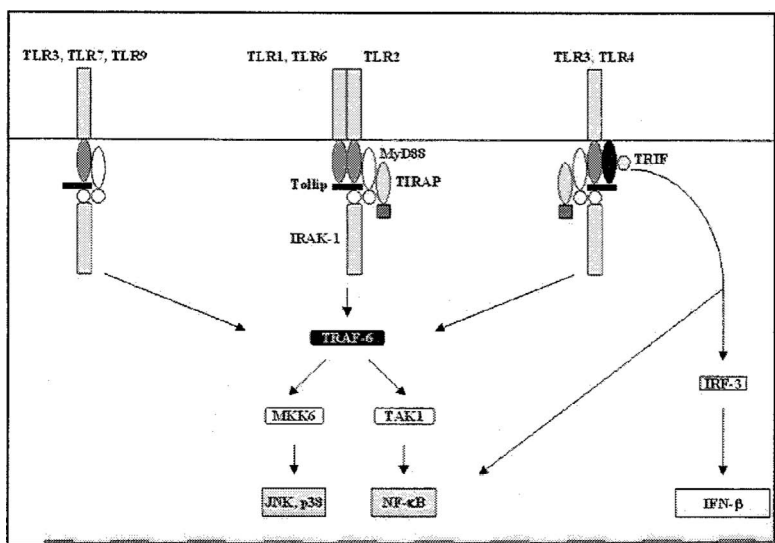
TLRs kunnen met hun leucine rijke deel geconserveerde essentiële microbiële structuren, herkennen, welke pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) genoemd worden²; tab.2(bijlagen). Voorbeelden hiervan zijn onder andere, lipopolysaccharides (LPS), peptidoglycans, lipopeptiden, flagelline, bacteriële DNA en viraal dubbelstrengs RNA. De cytoplasmatische staart van de TLR bevat een geconserveerde regio, namelijk het Toll/IL-1 receptor (TIR) domein, welke sterke homologie heeft met de Interleukine 1 receptor (IL-1R), het extracellulaire deel van de TLR is totaal anders dan het extracellulaire deel van de IL-1R, IL-1R heeft een Ig-achtig extracellulair domein terwijl TLRs een LRR domein bevatten. TLRs delen een deel van hun signaaltransductie cascade met de IL-1R familie. Over de signaaltransductie van TLRs in neutrofiele granulocyten is nog niet veel bekend. Stimulatie van beide typen receptoren leidt uiteindelijk tot activatie van de transcriptiefactor NFκB en proinflammatoire cytokines. De cytoplasmatische staarten van zowel TLR als IL-1R, bevatten het geconserveerde TIR domein^{5,6}; fig.1



Figuur 1. IL-1R en TLR

1.3.2 Signaaltransductieroute

Het TIR domein van TLRs is ook aanwezig in het adapter eiwit MyD88 (myeloid differentiation factor 88), en interactie tussen het TIR domein van de TLR/IL-1Rs en het TIR domein van MyD88 medeert de binding van dit intracellulaire eiwit aan een ligand-geactiveerde receptor⁷. Na binding van MyD88 aan TLR/IL-1Rs, wordt IL-1R-geassocieerde proteïne kinase-I (IRAK-1) hier naartoe geleid door interactie tussen het death domain (DD) aanwezig in het kinase en in het MyD88⁸. Dit oproepen van IRAK-I wordt gestuurd door een eiwit genaamd Toll/IL-1R interactie proteïne (Tollip). Tollip bindt aan IRAK-1 en men vermoedt dat Tollip IRAK-I naar het geactiveerde



Figuur 2. signaaltransductie route TLRs

receptor complex brengt en zorgt voor binding van IRAK-I aan MyD88. IRAK-I wordt dan gefosforyleerd, laat los van MyD88, bindt aan en activeert een eiwit genaamd TRAF-6 (TNF receptor-geassocieerde factor 6). TRAF-6 activeert MKK6 (Map kinase kinase 6) en TAK1 (transforming growth factor-β-activated kinase) welke dan JNK (Junk Kinase), p38 MAPK (Map Kinase) en NF-κB activeren⁹; fig.2. De signaaltransductie route induceert

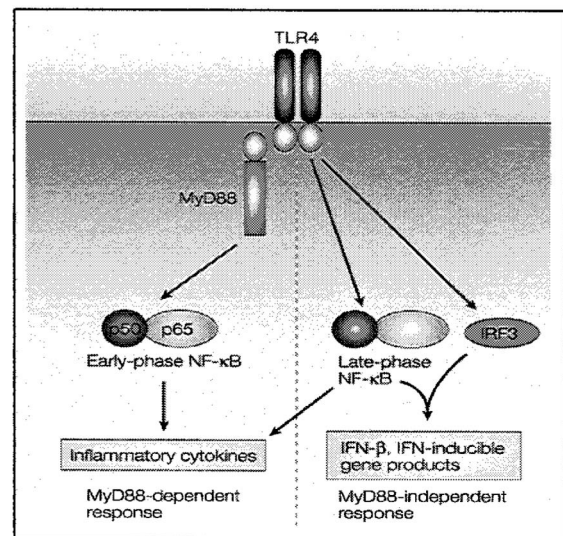
de expressie van een set genen welke leidt tot ontsteking, zoals inductie van pro-inflammatoire cytokines en differentiatie van verschillende typen effector cellen.

1.3.3 NF- κ B

De NF- κ B familie van transcriptie factoren bestaat uit 5 transcriptie factoren. Namelijk; p65 (REL-A), REL-B, cytoplasmatisch (c) REL, p50 en p52, welke functioneren als homo- en heterodimeren. NF- κ B dimeren zitten meestal in het cytoplasma, in een niet actieve vorm, door moleculen van de remmer van NF- κ B (I κ B) familie. Bij activatie van NF- κ B worden I κ B eiwitten gefosforyleert en vindt er proteolysis van het eiwit plaats. Ook is er nucleaire translocatie van de NF- κ B factoren. Deze acute activatie wordt gemedieerd door een I κ B kinase (IKK) complex, welke twee katalytische subunits bevat, nl; IKK- α en IKK- β (ook wel bekend als IKK1 en IKK2), en een regulator subunit, IKK- γ (ook bekend als NF- κ B essentiële modulator, NEMO)¹⁰. Na activatie door upstream signalen, fosforyleert IKK de I κ Bs, wat leidt tot polyubiquitinatie en proteasoom gemedieerde degradatie.

1.3.4 TLR4 signalering: MyD88-afhankelijk en MyD88-onafhankelijk

Stimulatie van Toll-like receptor 4 kan volgens twee paden gebeuren, nl. via de MyD88-afhankelijke en de MyD88 onafhankelijke route. In de MyD88-afhankelijke route speelt de vroege fase activatie van NF- κ B een rol, welke leidt tot de productie van inflammatoire cytokines. De MyD88-onafhankelijke route activeert intetferon (IFN)-regulator factor (IRF3) en speelt een rol in de late fase van NF- κ B activatie. Dit leidt tot de productie van IFN- β en de expressie van IFN-geïnduceerde genen⁴; fig.3.



Figuur 3. TLR4 signalering: MyD88-afhankelijke en MyD88- onafhankelijke route

1.3.5 Adaptor eiwitten

Naast de TLR signaaltransductie route, welke leidt tot activatie van NF- κ B, zijn er andere signaaltransductie eiwitten geïdentificeerd, welke binden aan specifieke TLRs. Eén van de recent geïdentificeerde signaaltransductie eiwitten is Mal-TIRAP¹¹, een MyD88-achtig adaptor eiwit. Dit eiwit is betrokken bij de signaaltransductie geïnduceerd door TLR1, 2, 4 en 6, maar niet in signaaltransductie gemedieerd door TLR7 en 9. Naast TIRAP, zijn er andere eiwitten die specificiteit geven aan TLR signalering. Recent is een nieuw eiwit geïdentificeerd welke een TIR domein bevat, genaamd TIR domein-bevattend adaptor inducerend IFN- β (TRIF)¹². Dit eiwit is waarschijnlijk verantwoordelijk voor de MyD88 onafhankelijke inductie van NF- κ B-, IFN-(α - en IFN- γ -induceerbare genen.

Er zijn vijf adaptor eiwitten welke signaal transduceren van alle TIR domeinen.

- MyD88 (myeloïd differentiation factor 88)
- TIRAP (TIR-associated protein)
- MAL/TIRAP (MyD88-adaptor-like/TIR-associated protein)
- TRIF (Toll-receptor-associated activator of interferon)
- TRAM (Toll-receptor-associated molecule)

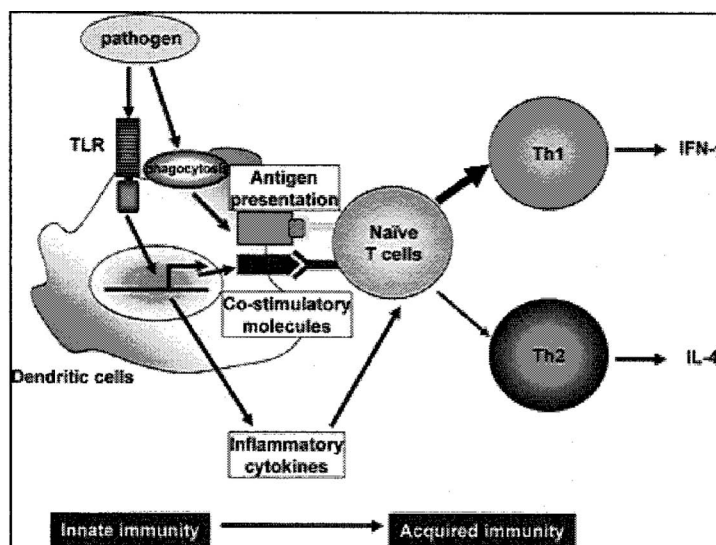
Deze zorgen voor het activeren van proteïne kinases, vervolgens is er activatie van transcriptie factoren, welke inflammatoire effecten veroorzaken¹³.

TLRs worden gezien als een belangrijke link tussen het verworven en aangeboren immuunsysteem. De verworven immuunrespons wordt voor een groot deel beïnvloed door het cytokine profiel van macrofagen, en de antigeen presenterende capaciteit van dendritische cellen. Deze twee systemen worden voor een groot deel beïnvloed door TLR signalering in deze cellen.

1.3.6 Fagocytoses en TLRs

Fagocytose is een belangrijke stap in de verdediging tegen microbiële pathogenen, omdat het de degradatie van pathogenen en presentatie van pathogeen afgeleidde peptide antigenen stuurt. TLRs promoten fagocytosis op verschillende manieren; ze verhogen per TLR de hoeveelheid opname via fagocytosis, en het aantal verschillende bacteriën door macrofagen. Pathogeen herkenning door TLRs leidt tot expressie van genen zoals inflammatoire cytokines en co-stimulatoire moleculen. Fagocytose gemedieerde antigeen presentatie samen met TLR afhankelijke gen expressie van inflammatoire cytokines en co-stimulatoire moleculen, zetten aan tot ontwikkeling van antigeen specifieke verworven immuniteit.

Cellen uit het niet-specifieke immuunsysteem, zoals dendritische cellen en macrofagen, omsluiten de pathogenen door fagocytoses. En presenteren pathogeen afgeleidde peptide antigenen aan naïve T-cellen. TLRs herkennen pathogeen afgeleidde componenten en induceren expressie van genen, zoals co-stimulatoire moleculen en inflammatoire cytokines. Fagocytoses gemedieerde antigen presentatie, samen met TLR-gemedieerde expressie van co-stimulatoire moleculen en inflammatoire cytokines, instrueren de ontwikkeling van antigeen-specifieke verworven immuniteit, vooral T-helper cellen¹⁴; fig.4

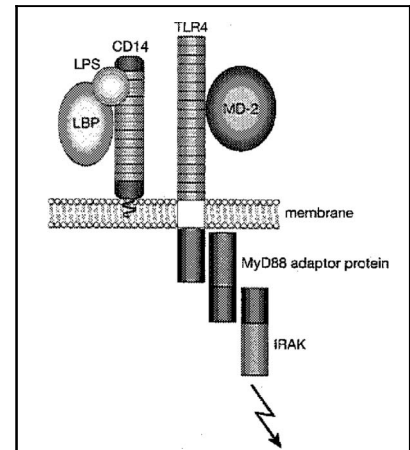


Figuur 4. Innate and adaptive immunity

1.3.7 Co-stimulatie

TLR1 en TLR6 werken samen met TLR2 in het discrimineren van subtiele verschillen tussen triacyl (TLR1 + TLR2) en diacyl (TLR6 + TLR2) lipopeptiden^{15; tabel 2 (bijlagen)}. Er is van een aantal eiwitten bekend dat ze dienen als co-stimulator voor TLR activatie.

CD14 is geïdentificeerd als LPS receptor, CD14 is een PI-anchored eiwit, het heeft een anker sequentie in het membraan. Later werd gezien dat CD14 het LPS signaal begint door TLR4, TLR4 heeft MD2 nodig voor LPS herkenning. Nu wordt algemeen aangenomen dat CD14, MD-2 en TLR4 samen het LPS signaal activeren. LPS heeft het LBP nodig om CD14 te binden.

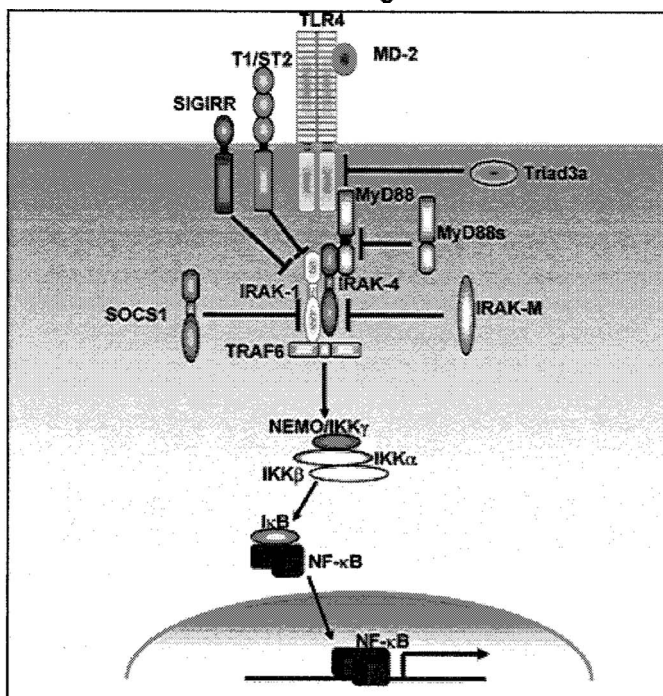


Figuur 5. LPS-binding proteïne

1.3.8 Negatieve regulatie van TLR signalering

Stimulatie van TLRs door microbiële componenten triggert de inductie van inflammatoire cytokines, zoals TNF- α , IL-6 en IL-12. Als al deze cytokines in overmaat geproduceerd worden, zullen ze ernstige systemische afwijkingen induceren, zoals LPS geïnduceerde shock. Organismen hebben daarom mechanismen ontwikkeld welke de TLR-gemedieerde respons regelen¹⁴.

Eén mechanisme welke interfereert met TLR signalering, is de down regulatie van TLRs op het cel oppervlak na interactie met PAMPs¹⁶, aan deze down regulatie lijkt echter wel een limiet te zitten. Signalering via een specifieke TLR induceert niet de down regulatie van andere TLRs in dezelfde cel, het niet reageren op signalen door andere TLRs wordt wel geïnduceerd¹⁷. Recent zijn twee eiwitten geïdentificeerd welke betrokken zijn bij het inhiberen van TLR signalering, en hebben een rol in de inductie van tolerantie voor verschillende PAMPs. Één van deze eiwitten is de suppressor van cytokine signaling-1 (SOCS1), welke snel geïnduceerd wordt bij TLR4 activatie door LPS^{18;19}. Men liet de rol van SOCS zien in SOCS-1 deficiënte muizen, welke verhoogde gevoeligheid voor LPS-geïnduceerde shock laten zien, en verhoogde activatie van p38 MAPK en NF- κ B activatie na testen met LPS. De expressie van SOCS1 remt de activatie van NF- κ B via de TLR4 receptor. Lijkend op SOCS1, is IRAK-M geïdentificeerd als een induceerbare negatieve regulator van TLR signalering²⁰. Dit kinase-



Figuur 6. Negatieve regulatie van TLR signalerings pathway

Recent zijn twee eiwitten geïdentificeerd welke betrokken zijn bij het inhiberen van TLR signalering, en hebben een rol in de inductie van tolerantie voor verschillende PAMPs. Één van deze eiwitten is de suppressor van cytokine signaling-1 (SOCS1), welke snel geïnduceerd wordt bij TLR4 activatie door LPS^{18;19}. Men liet de rol van SOCS zien in SOCS-1 deficiënte muizen, welke verhoogde gevoeligheid voor LPS-geïnduceerde shock laten zien, en verhoogde activatie van p38 MAPK en NF- κ B activatie na testen met LPS. De expressie van SOCS1 remt de activatie van NF- κ B via de TLR4 receptor. Lijkend op SOCS1, is IRAK-M geïdentificeerd als een induceerbare negatieve regulator van TLR signalering²⁰. Dit kinase-

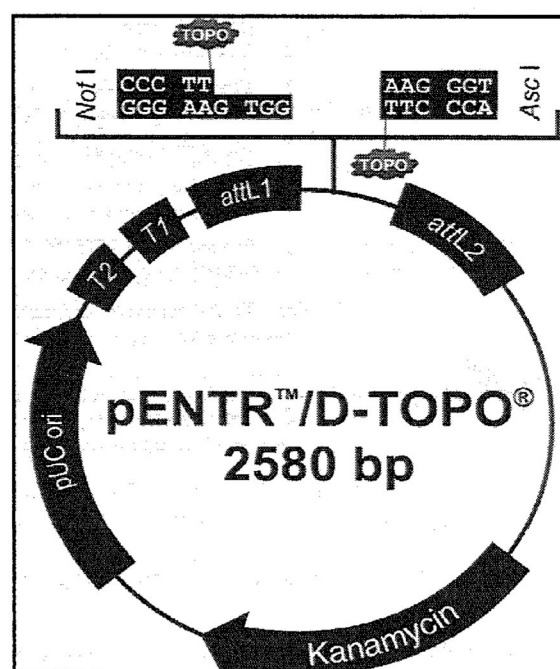
inactieve lid van de IRAK familie verlaagd de immuunrespons op **verschillende PAMPs** en, net als **SOCS1**, beschermt het muizen tegen LPS-geïnduceerde shock. Beide suppressors lijken op een verschillend niveau van TLR signalering actief te zijn. Van IRAK-M wordt gedacht dat deze de acties van IRAK-1 remt, terwijl SOCS1 downstream van IRAK-I werkt en waarschijnlijk TRAF6 functie tegenwerkt.

1.3.9 TLR1, 2, 4 en 6

Hoewel de expressie en functie van TLRs in macrofagen en dendritische cellen al uitgebreid beschreven is, is praktisch niets bekend over de functie van deze receptoren in **neutrofiele granulocyten**. De aanwezigheid van TLR1, 2, 4 en 6 mRNA is geïdentificeerd door Muzio et al.²⁴, TLR2 en TLR4 komen tot expressie op het celoppervlak van **neutrofiele granulocyten**²⁵. Expressie van deze receptoren op het celoppervlak zorgen dat de **neutrofiel** kan reageren op specifieke bacteriële producten, welke binden aan deze receptoren²⁵. Hoewel er maar één publicatie over de functie van TLRs in **neutrofielen** bekend is, zijn er al wel meerde publicaties over de effecten van LPS op **neutrofielen**. LPS kan de secretie van ROS door **neutrofielen** primen in respons op stimulatie met het bacteriële peptide fMLP (N-formylated-methionine-leucine-phenylalanine peptide)²⁶. Deze priming speelt een rol in de opregulatie van de hoeveelheid cytochroom b₅₅₈ op het cel-oppervlak via **granule exocytose**²⁶, is p38 MAPK²³ en CD14 afhankelijk²¹, en leidt tot translocatie van NF-κB naar de nucleus²¹. De opregulatie van TLR2 door GM-CSF verhoogd de **neutrofiel** respons op liganden van deze receptor, zoals **peptidoglycan (PGN)**²⁵. Omdat **neutrofielen** een functionele IL-1 signaal cascade²⁸ tot expressie brengen, en omdat activatie van NF-κB en p38 MAPK plaats vinden door LPS stimulatie²⁸, welke typisch zijn voor TLR signalering, wordt gedacht dat op zijn minst sommige van de TLR signaaltransductie cascades die bekeken zijn in andere celtypen eenzelfde functie in **neutrofiele granulocyten** hebben.

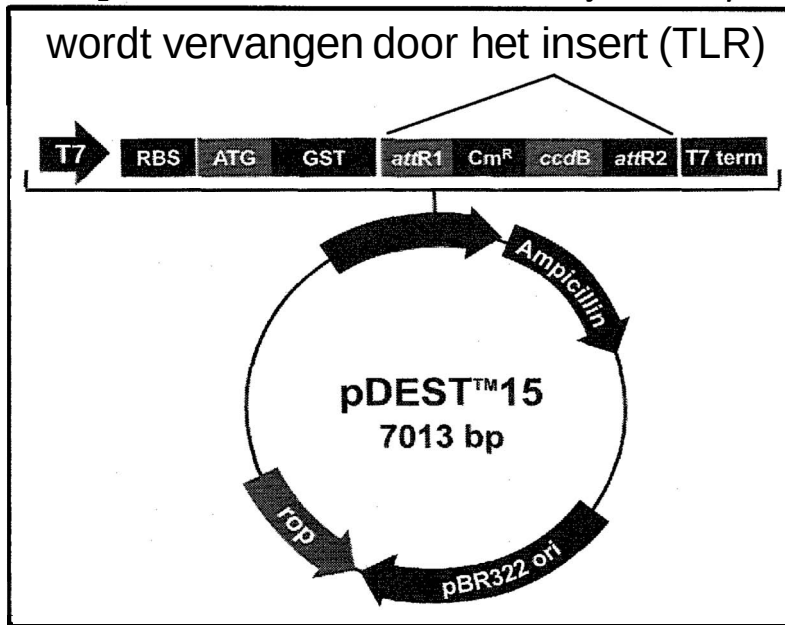
1.4 Project aanpak

Het doel van dit project was, het opsporen van onbekende eiwitten uit de TLR signaaltransductie route van **neutrofiele granulocyten**. Daarom moest als eerste een TLR construct gemaakt worden, welke eiwitten uit de signaaltransductie route zou kunnen binden. Er is gekozen dit met een GST fusie-eiwit te doen. Om het GST fusie-eiwit te verkrijgen moest als eerste de intracellulaire staart van TLR1, 2, 4 en 6 met behulp van PCR in een vector gekloneerd worden. Dit gebeurde onder invloed van topoisomerase. (zie resultaten)^{fig.7}



Figuur 7. ENTR vector

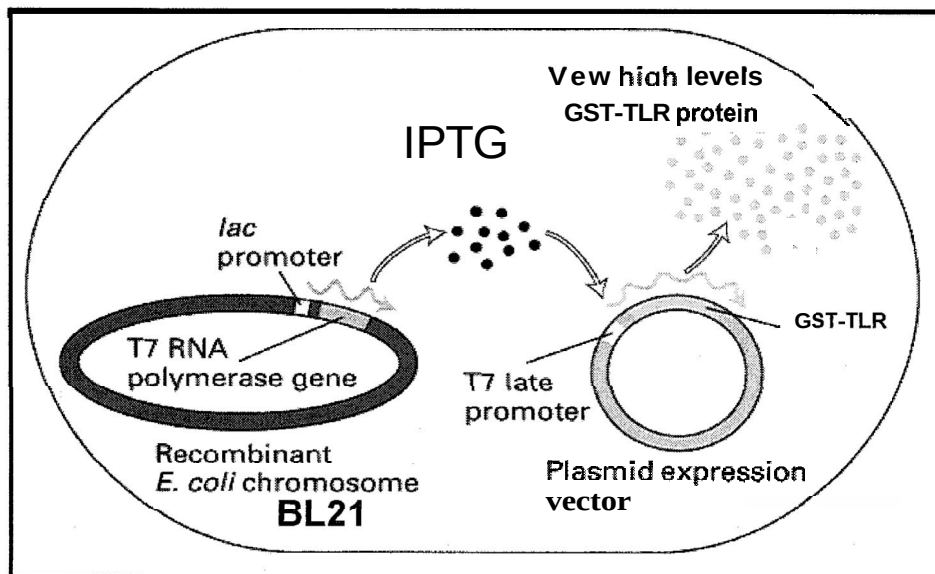
vervolgens wordt de ENTR vector bij een expressie vector gevoegd, in een oplossing van enzymen materiaal 2.1. En hierdoor zal het insert, door aanwezigheid van de topoisomerase sites in de expressie vector geligeerd worden. Waarbij het volgende in de expressie vector plaatsvindt. De expressie vector bevat een "death domein" (attR1 t/m attR2), dit domein zal vervangen worden door het insert uit de ENTR vector, de binding van het insert is sterker dan dat de binding van het "death domein"



Figuur 8. pDEST 15 expressie vector

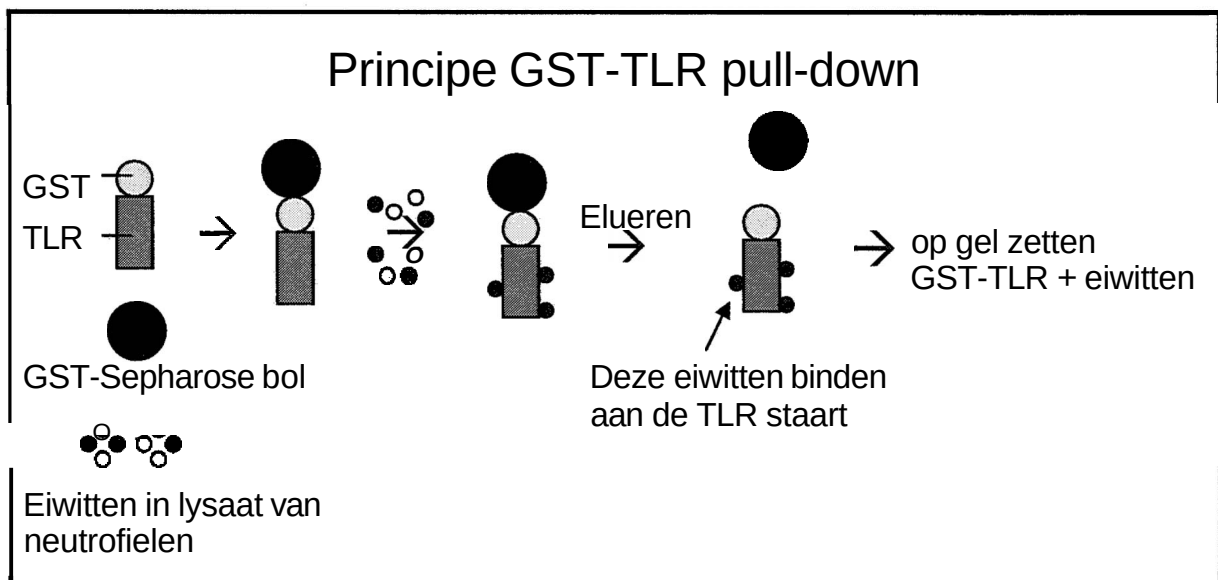
waardoor je een N-terminale GST-tag verkregen hebt. Ditgene wordt vervolgens opgegroeid in *E. coli* BL21 cellen, aangezien deze uitermate geschikt zijn voor eiwit expressie.

Bij de inductie van het fusie-eiwit wordt IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside) toegevoegd, dit wordt gedaan om de productie van het fusie-eiwit te starten. Het principe hiervan is; door toevoeging van IPTG wordt, van het recombinante *E. coli* chromosoom (welke in *E. coli* BL21 cellen aanwezig is), de *lac* promoter niet meer onderdrukt, zodat het T₇ RNA polymerase gen afgelezen kan worden. Het T₇ RNA polymerase wat hierdoor geproduceerd wordt, activeert de T₇ late promoter welke aanwezig is in de expressie vector. Het GST-TLR, in de expressie vector wordt afgelezen. Hierdoor is er een hoge productie van het GST-TLR fusie-eiwit^{fig.9}.



Figuur 9. GST-TLR eiwit inductie

Met dit fusie-eiwit konden door middel van GST-TLR pull down assays^{fig10}, eiwitten uit het lysaat van neutrofiele granulocyten "gevist" worden. Een GST-Sephrose bol wordt gecoat met het fusie-eiwit (GST-TLR) en hieraan wordt lysaat van neutrofielen toegevoegd. Lysaat van neutrofielen bevat allerlei eiwitten, ook de eiwitten welke een rol spelen in de signaaltransductie route van TLRs. Deze zullen naar verwachting binden aan de intracellulaire TLR staart. De prognose is dat als eerste het adaptor eiwit **MyD88** zal binden. Door de buffer samenstelling, van de verderop genoemde GST buffer (zie Bijlage 2, *Isoleren neutrofiele granulocyten*), te veranderen zal je in theorie een boom van eiwitten (uit het lysaat van neutrofielen) gebonden krijgen aan het fusie-eiwit. Deze eiwitten worden daarna op een SDS (sodiumdodecylsulfaat) gel gezet, hierdoor worden ze op grootte gescheiden. En na Westernblotten, zullen de eiwitten overgebracht worden op een nitro-cellulose membraan, en kunnen door middel van antilichamen bekende eiwitten aangetoond worden, via een ECL film^{fig11}. Nog niet bekende eiwitten kunnen na zuiveren bepaald worden via massaspectrometrie.



Figuur 10. Principe GST-TLR pull-down assay

Hoewel van TLR activatie in vivo bekend is dat TLRs dimeren vormen na binding aan **PAMPs**, staat in de literatuur ook vermeld dat pull-down assays met TLR2 monomeren een goed resultaat geven²¹. Vandaar dat bij de gedane experimenten gekozen is voor het maken van monomere TLR constructen van TLR 1, 2, 4 en 6.

2. Materiaal en methoden

voor uitgebreide methode, zie bijlage 3: Protocollen

2.1 polymerase chain reaction (PCR) intracellulaire staart TLR

Materiaal:

- GeneAmp® PCRSystem 9700
- PCR tubes 0,2 ml (BIOplastics)
- Biowax (BIOzym)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)
- Accuprime Pfx Supermix (-20°C, Invitrogen)
- Humaan cDNA van neutrofiele granulocyten (-20°C tot 4°C, 1 op 10 verdund)
- Forw.TLR1: 5' -CACCCCTCTGCAGCTACTTGGATCTG -3' (100 pmol. Stock opl. en daaruit 10 pmol. Werkoplossing, Invitrogen)
- Rev. TLR1: 5' -CTATTTCTTTGCTTGCTCTGT -3' (Invitrogen)
- Forw.TLR2: 5' -CACCCATGGCCTGTGGTATATGAAA -3' (Invitrogen)
- Rev. TLR2: 5' -CTAGGACTTTATCGCAGCTCT -3' (Invitrogen)
- Forw.TLR4: 5' -CACCCCTTGCTGGCTGCATAAAGTAT -3' (Invitrogen)
- Rev. TLR4: 5' -TCAGATAGATGTTGCTTCCTG -3' (Invitrogen)
- Forw.TLR6: 5' -CACCATCTACTTGGATCTGCCCTGGTATCTC -3' (Invitrogen)
- Rev. TLR6: 5' -TTATGATTTTACATCATTGTTTTTCAG -3' (Invitrogen)

Methode:

Om de intracellulaire staart van de TLRs te amplificeren is een PCR hierop gedaan. Hiervoor zijn eerst primers ontwikkeld. Per TLR een 5' Forward primer vanaf de sense streng en een reverse primer vanaf de 5' kant vanaf de antisense streng. Eerst wordt het dubbelstrengs DNA enkelstrengs gemaakt door verhoging van de temperatuur tot 95°C. Vervolgens binden de primers bij een temperatuur ongeveer 10°C lager dan de smelt temperatuur (T_m). Het DNA-polymerase zal hechten aan het stukje dubbelstrengs DNA, ter hoogte van de primer, en beginnen met het inbouwen van complementaire nucleotiden en ze vervolgens aan elkaar binden. Zo ontstaan twee nieuwe dubbelstrengs DNA ketens. Dit hele proces van denaturatie, annealing en extension wordt een aantal keren herhaald. De nieuwgevormde DNA-strengen fungeren hierbij in de volgende cyclus als mal voor de productie van nieuwe strengen. Bij elke cyclus verdubbelt de hoeveelheid DNA. Er is dus een exponentiële vermenigvuldiging van het stukje intracellulaire TLR. Voor de PCR is cDNA van neutrofiele granulocyten gebruikt.

2.2 Agarose gel electroforese

Materiaal:

- Magnetron (Amana commercial microwave)
- Electroforese bak (Horizon® 11.14)

- Voltmeter (DELTA ELEKTRONIKA)
- Gel tray
- Kam 15 tot 25 slots
- Agarose (Invitrogen)
- 20× TAE buffer → 1× TAE buffer
- TRIS (acetic UltraPure™ Tris, invitrogen)
- Na₂EDTA (natriumedetat usp xxII/BP 88/pH.eur.II, Siegfried Synopharm)
- HAc (acetic acid 96%, Merck)
- Demi water
- 500ml fles
- 6 X loading dye solution (Fermentas)
- Ethidiumbromide (5μl → 10 g/l)

Methode:

Agarose vormt bij lage temperaturen (<45°C) een gel-netwerk waarin DNA op grootte gescheiden kan worden in een **electrisch** veld. Het DNA kan onder UV-licht gevisualiseerd worden m.b.v. ethidiumbromide (EtBr).

Door een agarose gel elektroforese te doen, kan DNA op grootte gescheiden worden.

2.3 Zuiveren PCR produkt uit gel m.b.v. GFX PCR and GelBand Purification Kit van Arnersham Biosciences catalogus nr. 27-9602-01

Materiaal:

- Microcentrifuge (eppendorf centrifuge 5417C)
- Eppendorf tubes van 1,5ml
- Mesje (carbon steel surgical blades (sterile)
- PCR produkt op gel
- UV bak (long wave)
- Balans (Sartorius)
- Hitteblok (60°C)
- GFX kolom (Amersham)
- GFX opvang-buis (Amersham)
- Capture buffer (Amersham)
- Washbuffer (Amersham)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)

Methode:

PCR produkt wordt, na agarose gel elektroforese, uit gel gesneden en met behulp van een GFX PCR and GelBand Purification Kit gezuiverd. De GFX kolom wordt in een GFX opvang buis gezet, en het DNA zal na overbrengen in de kolom, aan een membraan op de bodem van de GFX kolom hechten. Na de laatste **wasstap** zal d.m.v. water het DNA van het mem-braan **los** laten. En door het membraan gedraaid worden door middel van **centrifugatie** en in een schone eppendorf tube (1,5ml) terecht komen. Er is dan gezuiverd PCR produkt verkregen.

2.4 Kloneren PCR produkt in pENTR™/D-TOPO vector

Materiaal:

- Waterbad (42°)
- Stoof (Dépex Rosffrei; 37°C)
- Eppendorf tubes van 1,5ml
- PCR produkt
- Zout-oplossing (invitrogen)
- Steriel water (invitrogen)
- TOPO® vector (invitrogen)
- Chemisch competente *E. coli* DH5α cellen

Methode:

PCR produkt wordt d.m.v. topoisomerase in pENTR™/D-TOPO vector gekloneerd. PCR produkt heeft aan de 5' kant een CACC sequentie, welke complementair is met de GTGG sequentie van de vector. Door het topoisomerase wordt de GTGG sequentie aan de 3' kant van de complementaire streng, van het insert, vervangen door het GTGG van de vector. Op deze manier zit het insert, PCR produkt (TLR), altijd juist georiënteerd in de vector^{fig.7}.

Via heatshock (42°C) wordt de vector plus insert in *E. coli* DH5α cellen getransformeerd, vervolgens wordt het geheel uitgeplaat op agarplaten welke een kanamycine resistentie bevatten.

2.5 Colony PCR

Materiaal:

- 100µl H₂O + kolonie (kloneer experiment ENTR vectorlexpressie vector)
- Forw. M13 primer 5'- GTAAAACGACGGCCAG -3' (invitrogen bij -20°C)
- Rev. M13 primer 5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3' (invitrogen bij -20°C)
- Taq polymerase (-20°C, TspX1 polymerase 100µl u/µl)
- 10× buffer (-20°C)
- dNTP 20mM (-20°C, invitrogen)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)
- Biowax (BIOzym)
- PCR tubes 0,2ml (BIOplastics)
- GeneAmp® PCRSYSTEM 9700

Methode:

Controleren of insert in vector zit, dit wordt gedaan door een PCR op de vector te doen met forward en reverse vector primers (M13 primers met een concentratie van 10pmol). DNA wordt vrijgemaakt uit de bacterie door deze gedurende 10 minuten op te koken bij 95°C.

Vervolgens wordt een PCR gedaan. ^{Bijlage 3}

2.6 Minipreparaat m.b.v. "QIA prep Spin **Miniprep** Kit Ucing a Microcentrifuge" kit catalogus nr. 27106

Materiaal:

- Microcentrifuge (eppendorf centrifuge 5417C)
- QIA prep spinkolom (Qiagen)
- QIA prep collection tube (Qiagen)
- P1 buffer; resuspension buffer, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A (bij 4°C van Qiagen)
- P2 buffer; lysis buffer; 200 mM NaOH, 1% SDS (Qiagen)
- N3 buffer; neutralization buffer (Qiagen)
- PB buffer (Qiagen)
- PE buffer; wash buffer (Qiagen)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)

Methode:

Het principe van deze methode is gelijk aan dat van het Zuiveren PCR produkt uit gel m.b.v. GFX PCR and GelBand Purification Kit van Amersham Biosciences.

2.7 Digestie minipreps

Materiaal:

- Waterbad (37°C)
- Miniprep (TLRs, -20°C)
- Restrictie enzym *NotI*; vector (10u/µl, Fermentas)
- Restrictie enzym *Eco130I*, *NcoI* en *PstI* (10u/µl, Fermentas)
- O⁺ buffer met BSA 10× (Fermentas)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)

Methode:

Door middel van knippen met restrictie enzymen kan bepaalt worden of het insert (TLR) in de vector gekloneerd is. Hier is gekozen voor een restrictie enzym welke in de vector, in de buurt van het insert knipt en een restrictie enzym welke aan het eind in het insert knipt. Oftewel zonder insert zal één bandje verschijnen en met insert twee (met agarose gelelectroforese).

2.8 Sequencen TLR insert

Materiaal:

- Sequencer (ABI PRISM)
- Centrifuge (Rotanta 96R)
- Primer (Forw. en Rev. TLR-primers)
- Plasmide DNA (miniprep TLRs; -20°C)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)
- BDT (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, ABI PRISM)
- BDTbuffer (BigDye Terminator v1.1, v3.1 5× sequencing Buffer, AB Applied Biosystems)
- Biowax (BIOzym)
- 96wells plaat (Titergene Thermostable Plates Polycarbonaat 96wells)
- Sephadex (SephadexTM G-50 Superfine, Amersham Biosciences)
- Loading buffer (Hi-DiTM Formamide, AB Applied Biosystems)

Methode:

Het sequencen wordt gedaan om te bepalen of het insert **inframe** in de vector zit en om eventuele mutaties op te sporen.

Eerst wordt het dubbelstrengs DNA (vector + insert) enkelstrengs gemaakt. Dit gebeurt door denaturatie. Vervolgens bindt de primer aan het enkelstrengs DNA bij een annealingtemperatuur van $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Tijdens de elongatie stap 60°C wordt het dubbelstrengs DNA gelabeld met dNTPs en fluorescent gelabelde ddNTPs welke binden aan specifieke basen, de kleur kan gedetecteerd worden met een geautomatiseerde sequencer.

2.9 Maken LB-medium

Materiaal:

- Bovenweger (PG5002 Delta Range[®])
- Maatcilinder 2000ml
- BactoTM Tryptone *pancreatic digest of Casein* (BD)
- BactoTM Yeast Extract *extract of autolysed yeast cells* (BD)
- NaCl (BUFA B.V. Pharmaceutical Products)
- Demiwater
- 500ml fles
- antibioticum

Methode:

LB-medium is een vloeistof met voedingsstoffen, waarin bacteriën goed kunnen groeien. Door een antibioticum toe te voegen zullen alleen de bacteriën met een antibioticum resistentie site hiervoor, in hun vector, in het medium groeien.

2.10 Maken antibioticum resistente agar platen

Materiaal:

- Bovenweger (PG5002 Delta Range®)
- Maatcilinder 2000ml
- Bacto™ Tryptone *pancreatic digest of Casein* (BD)
- Bacto™ Yeast Extract *extract of autolysed yeast cells* (BD)
- NaCl (BUFA B.V. Pharmaceutical Products)
- Agar Bacteriological (AGAR N°1 OXOID)
- Demiwater
- 500ml fles
- waterbad (55°C)
- Plastic petrieschalen (9 cm doorsnede)
- antibioticum: Ampicilline, 100 mg/ml (1:1000 verdunnen)
Kanamycine, 33mg/ml (1:1000 verdunnen)

Methode:

Het principe hiervoor is hetzelfde als voor het maken van vloeibaar LB-medium. Agar echter is een vaste substantie die voor het gieten eerst verwarmd moet worden (de agar wordt dan vloeibaar). Als de agar handwarm is kan het antibioticum toegevoegd worden en kunnen de platen gegoten worden. Na het gieten zullen door afkoelen de platen stollen.

2.11 Kloneren TLR vanuit **pENTRtm/D-TOPO** vector in expressie vector via "**E. coli** expressie systeem met **Gateway® Technology**" catalogus nr. **11791-019**

Materiaal:

- Schudstoof (Innova 4000 incubator shaker; 37°C)
- Stoof (Dépex Rostfrei; 37°C)
- miniprep TLR-pENTRtm/D-TOPO (-20°C)
- pDESTtm15 (-20°C Invitrogen)
- 5× LR Clonasetm Reactiebuffer (-80°C Invitrogen)
- TE buffer, pH8,0
- TRIS (acetic UltraPure™ Tris, invitrogen)
- Na₂EDTA (natriumedetat usp xxII/BP 88/pH.eur.II, Siegfried Synopharm)
- HCl (zoutzuur 96%, Merck)
- LR Clonasetm Enzym Mix (-80°C, Invitrogen)
- Proteïnase K (-80°C, Invitrogen)
- E. coli DH5α cellen (-80°C)
- S.O.C. medium (-80°C, Invitrogen) / LB-medium (KT)

Methode:

TLR vanuit ENTR vector rechtstreeks in expressie vector kloneren, door middel van enzymen, waarbij de TLR een N-terminale GST-tag krijgt. Dit alles wordt opgegroeid in *E. coli* DH5 α cellen, hiervan worden daarna minipreps gemaakt. Dan is de GST-TLR expressie vector gemaakt.

2.12 Transformeren GST-TLR expressie vector in *E. coli* BL21 cellen d.m.v. heatshock

Materiaal:

- Waterbad 42°C
- Thermometer
- Schudstoof (37°C, Innova 4000 incubator shaker)
- *E. coli* BL21 chemisch competente cellen (-80°C)
- Plasmide GST-TLR fusie vector (-20°C)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)
- LB medium
- Eppendorf tubes 1,5ml

Methode:

Door een hitte schok (42°C) van precies anderhalve minuut op een oplossing van BL21 cellen en de expressie vector met insert te doen, zal de vector de *E. coli* BL21 cellen binnen gaan. Dit wordt daarna uitgeplaat op agarplaten welke een ampicilline resistentie bevatten.

2.13 Inductie GST-TLR m.b.v. IPTG en zuiveren van GST-TLR eiwit lysaat

Materiaal:

- Schudstoof (Innova 4000 incubator shaker; 37°C)
- Buckets
- Centrifuge (Beckman Coulter Avanti™ J-30I)
- Sonifier (Bramson Sonifier 250, Marius instrumenten)
- Per TLR, 500ml LB medium
- Ampicilline (100 mg/ml)/Carbanicilline(100mg/ml) ↗ 1:1000 verdunnen
- IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside, SIGMA)
- Bacterial lysis buffer
- Triton X-100 (SIGMA)
- Glycerol (glycerol 99% GC SIGMA)
- PBS (gebufferde natriumchloride oplossing BRAUN)
- DTT (dithiothreitol SIGMA)
- DFP (diisopropyl fluorophosphates >97% GC FLUKA)
- Proteaseremmer (complete™ EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche)

Methode:

Door toevoeging van IPTG wordt, van het recombinante *E. coli* chromosoom (welke in BL21 aanwezig is), de **lac promoter** niet meer onderdrukt, zodat het T₇ RNA polymerase gen wordt afgelezen. T₇ RNA polymerase, wat hierdoor geproduceerd wordt, activeert de T₇ late promoter van de expressie vector. Het GST-TLR, in de expressie vector wordt afgelezen. Hierdoor zal er een hoge productie van het GST-TLR eiwit zijn. Vervolgens wordt van het eiwit wat in 500ml zit een eiwit **lysaat** gemaakt, het eiwit wordt vrijgemaakt uit de bacterie en gezuiverd. Dit gebeurt door sonificeren van de bacteriën en verschillende wasstappen.

2.14 GST-TLR pull-down op lysaat van neutrofielen

isoleren neutrofiele granulocyten

Materiaal:

- Centrifuge (Rotanta 96R)
- Casy®1 (Beckman)
- Casy Ton (Beckman)
- PBS/TNC (KT)
- PBS (gebufferde natrium oplossing, Braun)
- TNC (tri-natriumcitraat **sterile**, CLB)
- 1× lysis buffer (ijs)
- NH₄Cl (ammoniumchloride, Merck)
- KHCO₃ (kaliumhydrogen carbonaat, Merck)
- EDTA (Na₂EDTA, Siegfried Synopharm)
- Percoll (voor gebruik op KT)
- HEPES compleet
- 20% HSA (humaan serum albumine Cealb[®], Sanquin)
- CaCl (calcium chloride dihydraat (Calbio chem.)
- Glucose (D(+)-glucose monohydraat, Merck)
- Filter (FP30/0,2 CA-S 0,2µm; 7bar max, Schleicher&Schuell)
- Spuit (50ml, BD Plastipak[™])
- Bloed in heparine buis

Methode:

Uit volbloed worden d.m.v. een **scheidings/zuiverings protocol neutrofiele granulocyten** geïsoleerd.

GST-TLR pull-down Assay

Materiaal:

- Hitteblok (37°C)
- Micro-centrifuge (eppendorf centrifuge 5417C)
- Koude kamer (4°C)
- Roteer machine (Rotary mixer, Snijders)
- Hitteblok (95°C)
- 1× GST buffer

- glycerol (Glycerol **SigmaUltra** approx. 99% GC, Sigma)
- TRIS (**acetic UltraPureTM** Tris, invitrogen)
- HCl (Zoutzuur 37%, Merck)
- NaCl (Natriumchloride, BUFA)
- NP-40 (**Nonidet[®]P40** substitute, Fluka)
- MgCl₂·6H₂O (Magnesiumchloride-Hexahydraat, Merck)
- Glutathion bollen (**sepharoseTM4B**, Amersham Biosciences)
- 2× **SampleBuffer**
- β-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol, BIORAD)
- 5 miljoen neutro's per pull-down

Methode:

GST-sepharose bol coaten met GST-TLR eiwit. Lysaat van neutrofielen wordt aan de GST-TLR **gecoatte** bollen toegevoegd. Alles wordt dan **geïncubeerd** bij 4°C. Niet gebonden lysaat van neutrofielen wordt van de bollen afgewassen. Toevoeging van sample buffer en β-mercaptoethanol zorgen ervoor dat daarna de neutro's en het GST-TLR eiwit los laten van de bollen.

2.15 SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfaat polyacrylamide electroforese)

Materiaal:

- Electroforese bak
- Voeding (DELTA-ELEUTRONIKA)
- 1½ mm glasplaat (Short Plates 5 Mini Protean 3, BIORAD)
- **Bufferdam** (BIORAD)
- TRIS A
- TRIS B
- SDS (sodiumdodecylsulfaat)
- Glycine (glycinum, BUFA)
- Glycerol (Glycerol **SigmaUltra** approx. 99% GC, Sigma)
- Coomassie (**Coomassie[®]Briljant Blue R-250**, BIORAD)
- DTT (Dithiothreitol, Sigma)
- Protogel (**BIOzym**)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)
- APS (-20°C ammonium persulfaat)
- TEMED (**BIOrad**)
- **Butanol** (n-butyl alcohol, J.T. Baker)
- Running buffer
- Nunc buis (50ml Centrifuge Tube Flat Top Cap Polypropylene, Corning)
- 2× sample buffer
- Marker (**BIOrad**)

Methode:

Door spanning worden eiwitten op grootte gescheiden. Grote eiwitten gaan moeilijker door de gel en zullen bovenin blijven zitten. Kleine eiwitten gaan makkelijker door de gel en runnen harder.

Als eerste worden twee factoren van de eiwitten uitgeschakeld die bijdragen aan de migratie snelheid van een eiwit, namelijk de eigen lading en vorm. Dit gebeurt door de eiwitten in een 2× sample buffer te brengen, deze bevat o.a. **Sodium Dodecyl Sulfaat (SDS)** welke het gedenatureerde eiwit een extra negatieve lading geeft. De lading per massa is hetzelfde, er wordt daarom op grootte gescheiden.

2.16 Eiwit kleuring (coomassie)

Materiaal:

- Coomassie oplossing
- Destain oplossing

Methode:

Door de SDS PAGE gel te kleuren met coomassie zal de gel een donkerblauwe kleur krijgen. Na ontkleuren met een destaining oplossing zal alleen het ongebonden coomassie weggewassen worden, hetgeen je overhoudt, in de vorm van banden, is coomassie gebonden aan eiwit.

2.17 Westernblotting

Materiaal:

- Voeding (POWER PAC300, BIORAD)
- Blot apparaat (TE Series Transphor Electrophoresis Unit, HSI)
- SDSgel
- 4 whatman papieren (10 bij 7cm)
- 1 nitrocellulose membraan (9 bij 6cm, Protan[®]Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher&Schuell Bioscience)
- Blotbuffer (verdund)
- Blotbuffer stock (10×)
- TRIS (acetic UltraPure[™] Tris, invitrogen)
- Glycine (glycinum, BUFA)
- Methanol (Merck)
- Demi water

Methode:

Door middel van spanning wordt eiwit vanuit een SDS PAGE gel op een membraan **geblot**. Het gebruikte apparaat lijkt op een normaal electroforese apparaat, maar in plaats van stroom over de gel te zetten, wordt er nu stroom loodrecht op de gel gezet. De eiwitten worden vanuit de gel op een membraan met hoge affiniteit voor eiwitten getrokken, in dit geval nitrocellulose.

2.18 Detecteren met antilichamen

Materiaal:

- TBST
- TRIS (acetic UltraPure™ Tris, invitrogen)
- NaCl (Natriumchloride, Merck)
- Tween 20 (Merck)
- 5% ELK (ELK, Campina)
- ECL, reagens1 en reagens2 (Amersham)
- Film (Kodak BioMax XAR Film)

Methode:

Voordat detectie met antilichamen plaats kan vinden moet het membraan eerst geblocked worden. Aangezien antilichamen ook eiwitten zijn, moet voorkomen worden dat zij, bij het blotten in plaats van aan de te detecteren eiwitten, aan het membraan gebonden worden. Dit kan worden bereikt door het membraan te verzadigen met een eiwitoplossing. In dit geval ELK (een melkpoeder).

Vervolgens wordt het 1^e antilichaam toegevoegd, deze bindt aan bijvoorbeeld GST van het fusie-eiwit, of aan een antilichaam van een eiwit welke zou kunnen binden aan de TLR. Het 2^e antilichaam is gelabeld met een HRP (Horse Radish Peroxidase), welke met behulp van ECL, (enhanced chemo luminescentie) aangetoond kan worden.

3. Resultaten

Het doel van dit project was, het opsporen van onbekende eiwitten uit de TLR signaaltransductie route van **neutrofiele granulocyten**. Daarom moest als eerste een TLR construct gemaakt worden, welke eiwitten uit de signaaltransductie route zou kunnen binden. Er is gekozen dit met een **GST** fusie-eiwit te doen.

Om het **GST** fusie-eiwit te verkrijgen moest als eerste de intracellulaire staart van TLR1, 2, 4 en 6 met behulp van PCR in een vector gekloneerd worden. Dit is op de volgende manier gebeurd. Met Forward en Reverse TLR primers is een PCR op cDNA van **neutrofiele granulocyten** gedaan, om de intracellulaire staart van TLR1, 2, 4 en 6 te verkrijgen.

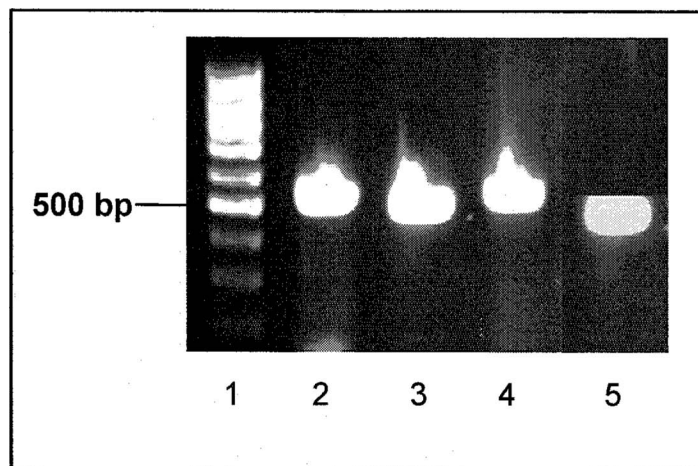
Dit zou de volgende fragmenten op moeten leveren:

TLR1: ± 500bp.

TLR2: / 480bp.

TLR4: ■ 500bp.

TLR6: ± 500bp.



laan 1 : Marker, 100 bp ladder

laan 2 : TLR1

laan 3 : TLR2

laan 4 : TLR4

laan 5 : TLR6

De intracellulaire staarten van TLR 1, 2, 4 en 6 zijn zoals hiernaast te zien is, na PCR verkregen. ^{fig.11}

Figuur 1i .PCR intracellulaire staart TLRs

PCR TLR producten kloneren in pENTR™/D-TOPO®

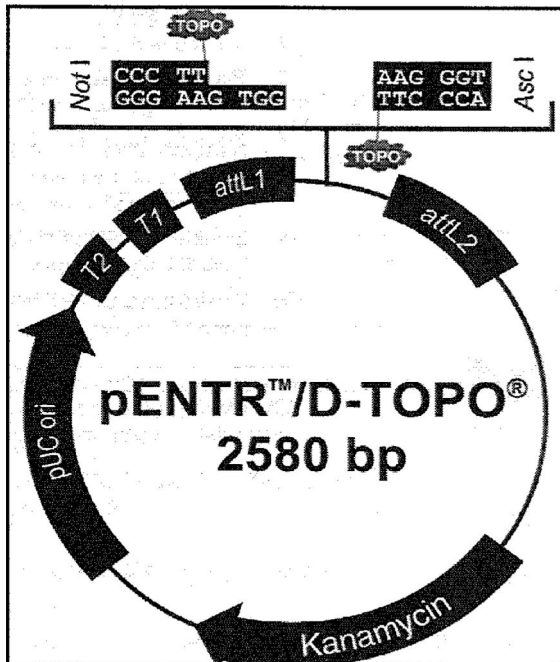
Vervolgens zijn deze produkten onder invloed van topoisomerase gekloneerd in een pENTR™/D-TOPO® vector en getransformeerd in chemisch competente *E. coli* DH5α cellen. Vervolgens is dit uitgeplaat op kanamycine resistente agar platen. Na overnacht groeien zijn de bacteriën uitgegroeid tot kolonies. Als check op een juiste ligatie van het insert in de vector, is er een Colony PCR op deze kolonies gedaan. Van de positieve Colony PCR monsters zijn minipreps gemaakt en deze zijn geknipt met restrictie enzymen. Er is bij elke TLR gekozen voor een restrictie enzym welke 1 maal in de vector en 1 maal in het insert knipt. Voor de vector is telkens hetzelfde enzym gekozen.

TLR1: NotI (vector) en *Eco130I* (insert), bandje van ongeveer 600bp (insert) en 2500bp (vector).

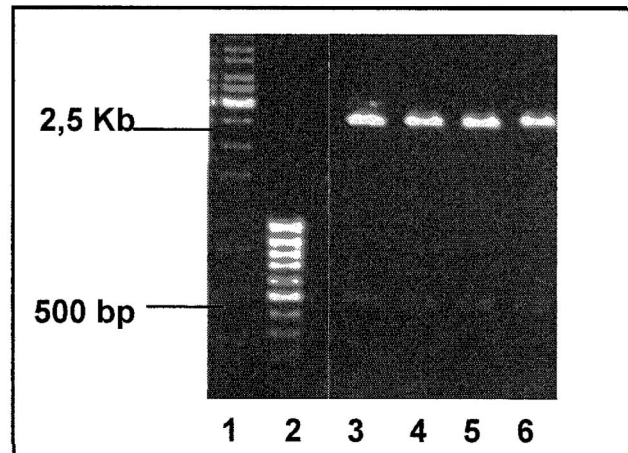
TLR2: NotI (vector) en *NcoI* (insert), bandje ongeveer 600bp en 2500bp.

TLR4: NotI (vector) en *PstI* (insert), bandje ongeveer 500bp en 2500bp

TLR6: NotI (vector) en *Eco130I* (insert), bandje van ongeveer 600bp en 2500bp.



Figuur 7. ENTR vector



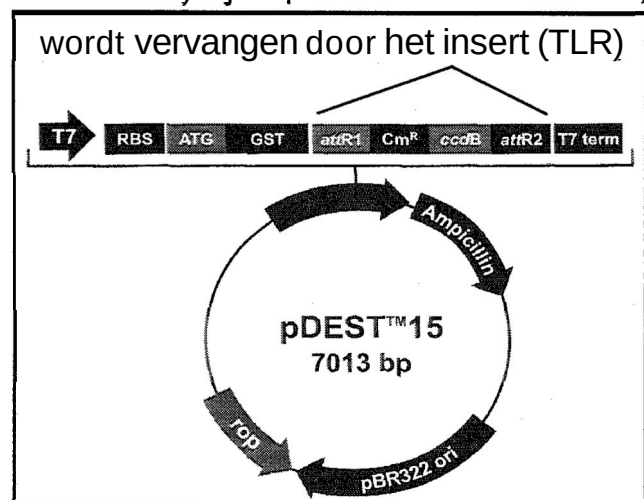
Figuur 12. TLR in ENTR vector

Resultaat figuur 12:
 baan 1: 1 Kb ladder
 baan 2: 100 bp ladder
 baan 3: TLR1
 baan 4: TLR2
 baan 5: **TLR4**
 baan 6: TLR6

Er is in figuur 12 te zien dat er twee bandjes zichtbaar zijn, deze banden duiden erop dat het insert in de vector geligeerd is. Ter controle is daar nog een sequentie analyse op gedaan. Daaruit bleek dat het insert inframe in de vector zit, ook zijn er geen mutaties waargenomen.

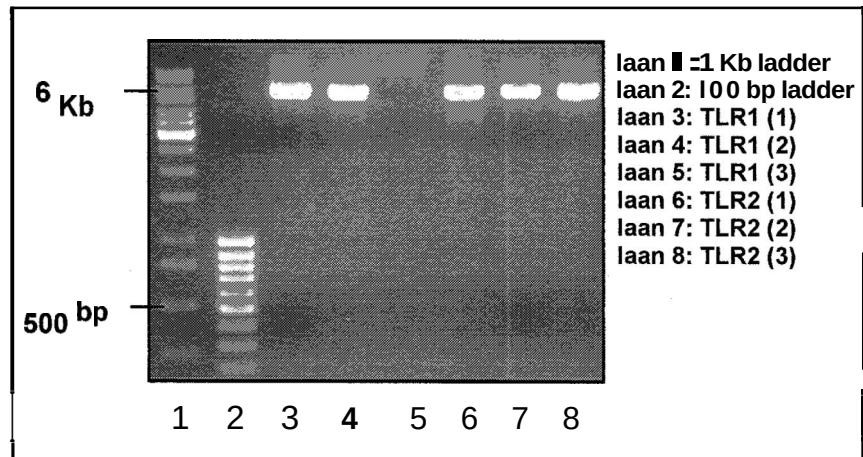
TLRs vanuit D-TOP0 in pDest15 expressie vector kloneren

Door de D-TOP0 vector (welke het TLR insert bevat) bij de pDEST15-vector te doen, zal onder invloed van enzymen, het insert vanuit de D-TOP0 vector in de pDEST15 vector geligeerd worden. Het "death" domein (attR1 t/m attR2) van de pDEST15 zal worden vervangen door het insert. En het insert zal zo een N-terminale GST-tag krijgen. Dit alles wordt getransformeerd in chemisch competente *E. coli* DH5α cellen, en uitgeplaat op ampicilline resistente agar platen. De *E. coli*'s welke de pDEST15, zonder TLR insert bevatten, zullen te gronde



Fiauur 8. pDEST 15 expressie vector

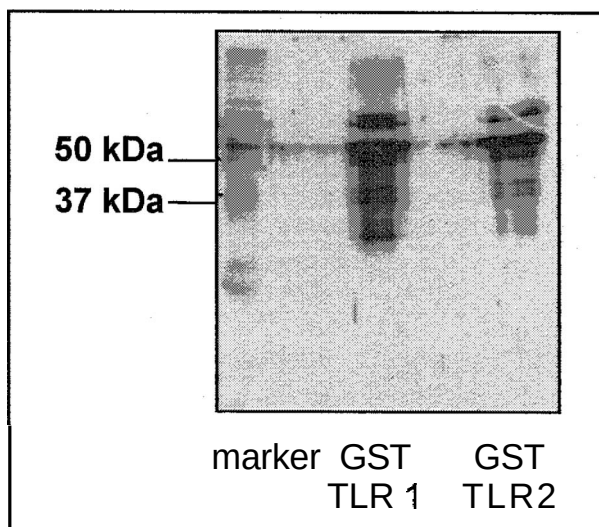
gaan. Door de aanwezigheid van het "death" domein. De *E. coli*'s welke wel de pDEST15 met het TLR insert bevatten zullen overnacht uitgroeien tot kolonies. Van de kolonies worden minipreps gemaakt en geknipt met het restrictie enzym XbaI. XbaI zal zonder het TLR insert 2 maal knippen (in theorie) en met het insert 1 maal, dit aangezien de 2^e restrictie site voor XbaI in het "death" domein zit, en deze met het TLR insert niet meer aanwezig is. TLR1₁ en TLR1₂ bevatten het insert, TLR2₂ en TLR2₃ ook. Vervolgens GST-TLR1₁ en GST-TLR2₃ gesequenced, daaruit bleek dat TLR1 en TLR2 inframe achter het GST stuk in de expressie vector zitten. De expressie vector welke de TLR4 en TLR6 bevatten, gaven geen kolonies, deze TLRs zijn niet in de expressie vector geligeerd, en zijn voorlopig achterwege gelaten.



Figuur 13. TLR1 en TLR2 in expressie vector

Vervolgens wilden we het fusie-eiwit tot expressie brengen om er daarna pull-down assays mee te gaan doen. Voor deze eiwit expressie moest de GST-TLR expressie vector eerst in *E. coli* BL21 cellen getransformeerd worden. Daarna kon hierop een inductie gedaan worden volgens bijgeleverd protocol van de expressie kit.

Fusie-eiwit GST-TLR inductie met IPTG en pull-down op lysaat van neutrofielen



Figuur 14. Pull-down GST-TLR1 en GST-TLR2 op lysaat van neutrofielen

getransformeerd in *E. coli* BL21 cellen via heatshock. Daarna uitgeplaat op ampicilline resistente platen. Nadat er overnacht is opgegroeid worden de volgende dag kolonies aangeprikt en opgegroeid in 50ml LB_{amp} 50ml overnacht cultuur bij 500ml nieuw LB_{amp}. gedaan. Er wordt 3 uur opgegroeien en daarna geïnduceerd met 0,1mM IPTG. Na 3 uur induceren bij 37°C wordt het eiwit lysaat gemaakt. En een pull-down op het lysaat van neutrofielen gedaan. Dit alles is op GST-TLR1 en GST-TLR2 gedaan. Na Westernblot is als eerste antilichaam een polykloonaal antiGST gebruikt en als tweede antilichaam een antikonijn, met HRP (horse radish

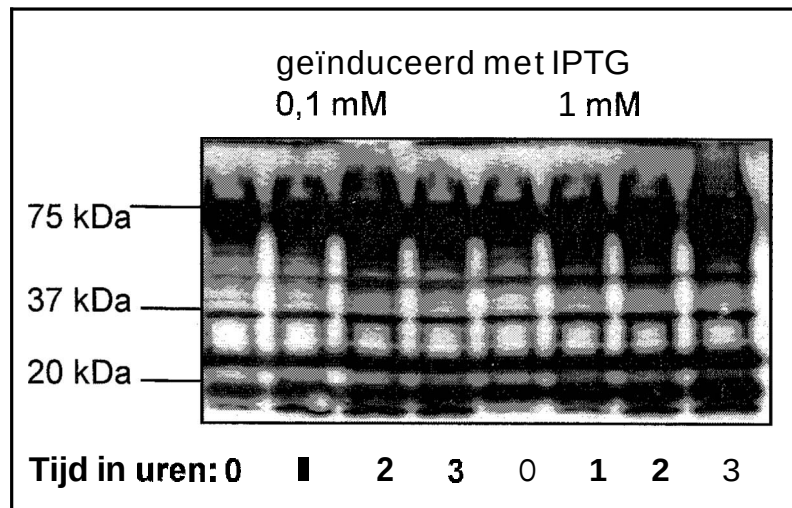
peroxidase), dit alles is aangetoond met behulp van ECL, met een belichting van 30 seconden.

Bij GST-TLR1 en GST-TLR2 versijnt geen duidelijke inductie band bij ± 37kDa.

Tijdlinductie experiment

Daarna is een GST-TLRI inductie gedaan waarbij verschillende IPTG concentraties zijn gebruikt. Er is op vier tijdstippen gemeten, voor inductie op tijdstip nul, na 1, 2 en 3 uur induceren. Er is hierbij opgegroeid onder dezelfde condities als bij het vorige experiment, dit zijn de condities welke de kit voorschrijft. Als antibioticum resistentie is nu echter gebruik gemaakt van carbanicilline in plaats van ampicilline, dit is gedaan omdat bij ampicilline resistent medium het ampicilline wordt opgebruikt door de bacterie. Bij carbanicilline is dit niet het geval en blijft de resistentie gehandhaaft. Er is geïnduceerd met een IPTG concentratie van 0,1mM en 1mM. De monster afname is als volgt gedaan; van de totale bacterie cultuur is 100µl afgenomen en afgedraaid, kort bij een hoog aantal toeren. Het pellet is geresuspendeerd in 100µl gedestilleerd water, 1:1 verdund met 2× sample buffer en β-mercaptoethanol toegevoegd. Dit alles wordt ± 5 minuten opgekookt bij 95°C. Vervolgens wordt 20µl op SDS gel gezet. Dit is een totaal lysaat.

De film, na de antilichaam stappen, bij ECL is 30 seconden belicht.

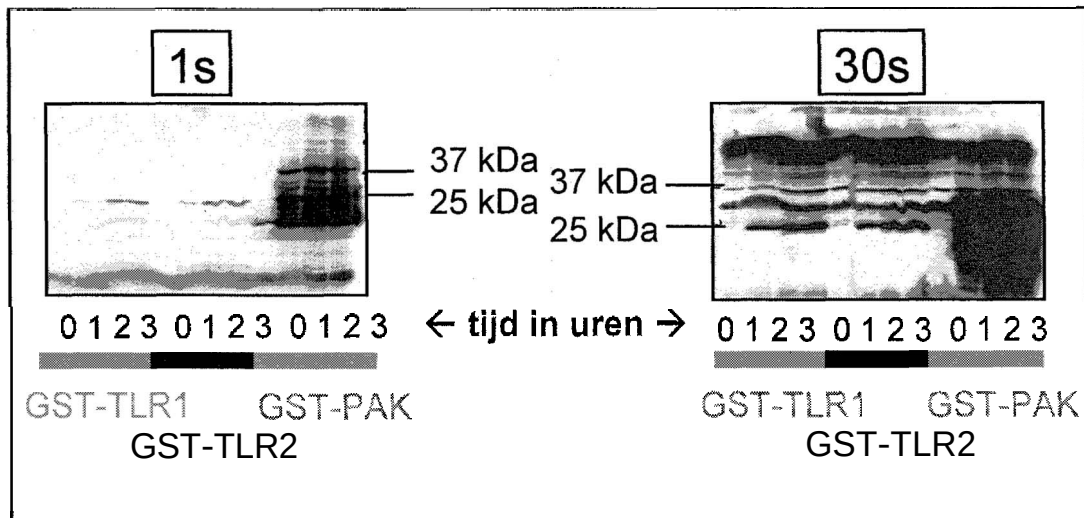


Figuur 15. Inductie GST-TLRI met verschillende IPTG concentraties en verschillende afname tijdstippen

GST-TLRI zou een grootte moeten hebben van iets meer dan 37 kDa. Bij 37 kDa. is geen duidelijke inductie toename te zien.

Tijdinductie plus **positieve** controle

Vervolgens is een positief controle construct meegenomen, GST-PAK (± 40 kDa). Deze wordt meegenomen aangezien dit fusie-eiwit vaak binnen de afdeling gebruikt wordt en een sterke inductie geeft. Ook zijn GST-TLR1 en GST-TLR2 meegenomen. Er is geïnduceerd met 0,1mM IPTG. De omstandigheden zijn exact hetzelfde als bij het vorige experiment. Er is links 1 seconde belicht en rechts 30 seconden.

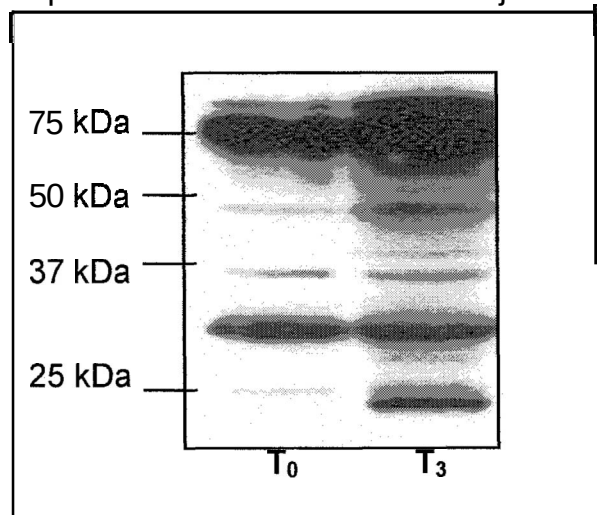


Figuur 16. Inductie toename in de tijd gevolgd van GST-TLR1, GST-TLR2 en GST-PAK. 1 seconde en 30 seconden belicht

Zowel bij GST-PAK, als bij GST-TLR1 en GST-TLR2 is geen duidelijke inductie toename op de te verwachten plek.

Positieve controle uit expressie kit, **GST-gus**

GST-gus is een fusie-eiwit welke altijd tot expressie zou moeten komen. Hij wordt gemaakt uit pENTRTM-gus, en wordt meegeleverd met de expressie kit. pENTRTM-gus wordt in *E. coli* BL21 cellen getransformeerd op dezelfde manier waarop dat ook bij de verschillende GST-TLRs en GST-PAK is gebeurt. Vervolgens is dit overnacht opgegroeid in 500 ml LB_{carb.}. Daarna is het medium zoals hiervoor altijd 1:9 verdund, en is een OD₆₀₀ meting gedaan. Hieruit bleek dat de OD₆₀₀ 1.3 was, voor een goede inductie is een OD₆₀₀ van tussen de 0.4 en 0.6 nodig. Bij deze OD₆₀₀ zit de bacterie namelijk in de logfase, wat inhoudt dat de bacterie in de exponentiële groeifase zit. Hierdoor is de 1:9 overnacht cultuur nogmaals 1:5 verdund, om in ieder geval onder de juiste OD te zitten zodat de bacterie de kans heeft weer in de logfase terecht te komen. En daarna opgegroeid tot een OD₆₀₀ van ± 0.6 en geïnduceerd met 0,1mM IPTG. Voor inductie



Figuur 17 inductie GST-gus uit expressie kit

is een totaal lysaat monster afgenomen en na 3 uur induceren is dit nog een maal gedaan.

Er is op tijdstip 3 uur wel toename van intensiteit in de band bij ± 80 kDa, alle banden nemen echter toe.

Positieve en negatieve controle

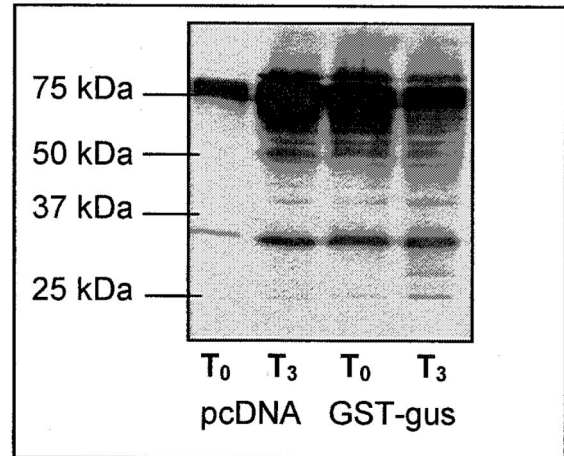
Vervolgens zijn er een positieve en een negatieve controle meegenomen. Dit is gedaan aangezien bij het vorige experiment op tijdstip nul al iets aanwezig was wat reageerde met het polyklonale GST antilichaam. Als positieve controle is opnieuw de GST-gus gebruikt, als negatieve controle een lege vector met een T₇ promotor (pcDNA). De negatieve controle zou op tijdstip nul en tijdstip 3 uur geen eiwit bandje mogen laten zien. Nu is in plaats van overnacht maar 9 uur opgegroeid zodat geen verdunning meer gemaakt hoeft te worden, daarna is een OD₆₀₀ meting gedaan:

OD₆₀₀ GST-gus : 1,0

OD₆₀₀ pcDNA : 0,2

Vervolgens is geïnduceerd met 0,1mM IPTG, er is een monster voor inductie en na 3 uur induceren afgenomen.

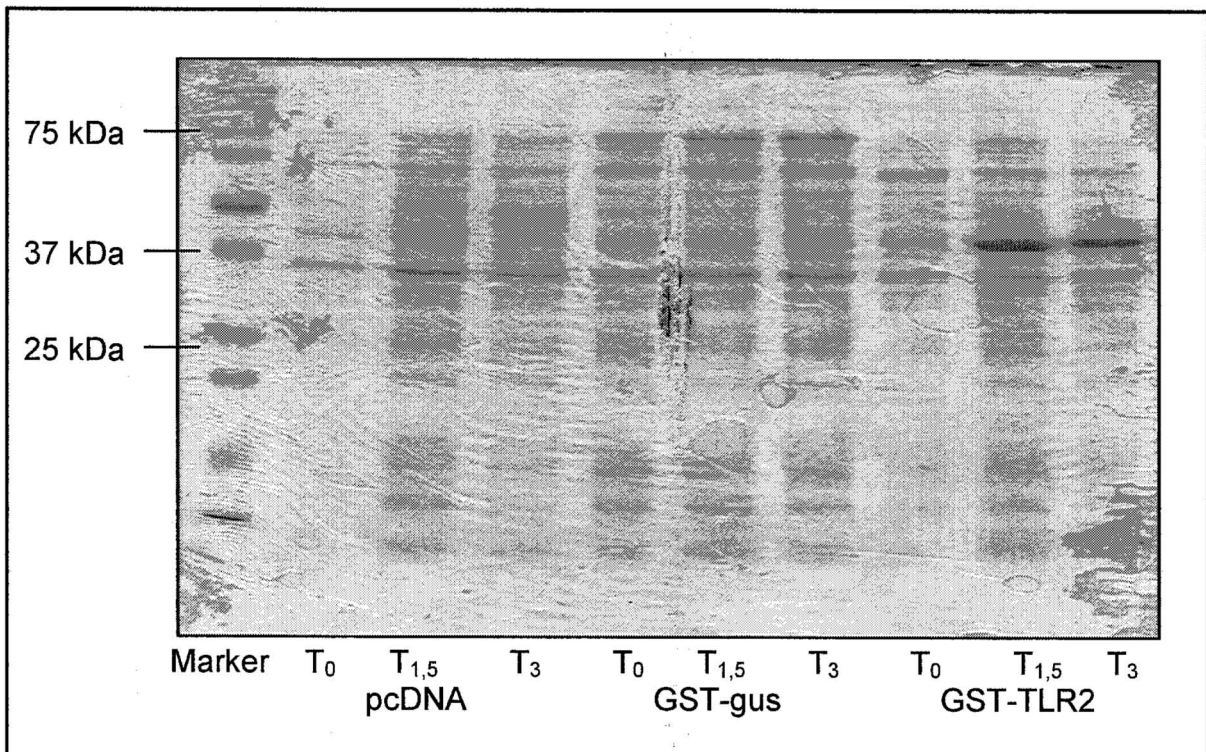
De negatieve controle geeft op tijdstip nul een band bij ± 80 kDa.



Figuur 18. Inductie positieve controle ten opzichte van negatieve controle

Eiwit kleuring negatieve controle, positieve controle en **GST-TLR2**

Nu zijn de negatieve, positieve controle en **GST-TLR2**, getransformeerd in *E. coli* BL21 cellen, en overnacht uitgegroeid tot kolonies. De volgende dag zijn kolonies aangeënt en in 500ml $LB_{carb.}$ gedaan. Dit is overnacht bij kamer temperatuur gezet, de dag erna bij 37°C in de schudstoof, en opgegroeid tot een OD_{600} tussen de 0.4 en 0.6. Vervolgens is er voor inductie, na 1,5 uur en na 3 uur induceren een monster afgenomen, hiervan is een totaal lysaat gemaakt. Na Westernblotten is dit alles gekleurd met cornmassie briljant blue.

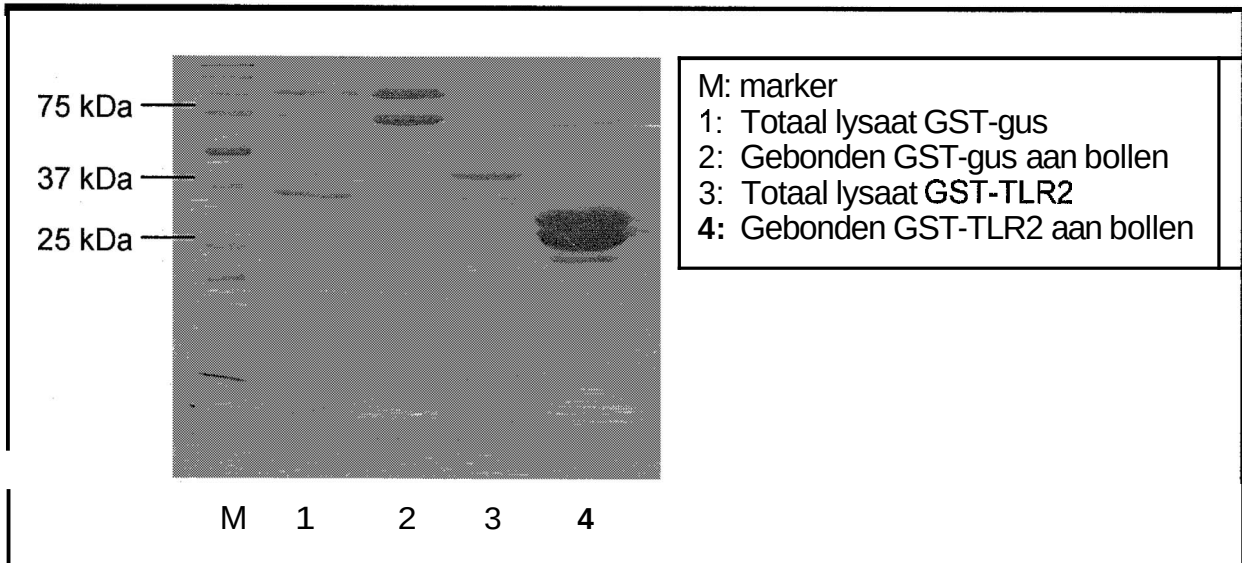


Figuur 19. Eiwit kleuring negatieve controle, positieve controle en GST-TLR2

Bij GST-gus is inductie te zien bij $\pm 80kD$. GST-TLR2 geeft een inductie toename bij de verwachten $\pm 37kDa$. Bij **GST-TLR2** is echter tussen T_{1,5} en T₃ een afname van de intensiteit van de band te zien.

Ewit kleuring GST-gus en GST-TLR2; totaal lysaat en lysaat gebonden aan GST sepharose bollen

Van de 500ml medium kweek uit het vorige experiment wordt eiwitlysaat gemaakt, dit wordt gedaan van GST-gus en GST-TLR2 (zie Inductie GST-TLR m.b.v. IPTG en zuiveren van GST-TLR eiwit lysaat, in bijlage). Het totaal lysaat van het vorige experiment wordt op gel gezet, en daarnaast worden GST sepharose bollen gecoat met het eiwitlysaat van GST-gus en GST-TLR2, dit wordt gedaan om te bepalen of het fusie-eiwit bindt aan de bollen.



Figuur 20. Ewit kleuring GST-gus en GST-TLR2; totaal lysaat en lysaat gebonden aan GST bollen

Er is bij de GST sepharose bollen gecoat met GST-gus en GST-TLR2 duidelijk te zien dat er eiwit gebonden heeft, er zijn echter meerdere dikke banden bij allebei te zien. Aan dit eiwit lysaat is tijdens het prepareren vergeten DTT, DFP en protease remmers toe te voegen.

Ewit kleuring GST-SBDS, GST-TLRI en GST-TLRZ; totaal lysaat en lysaat gebonden aan GST sepharose bollen

Nu is een inductie experiment gedaan, onder de omstandigheden waarvan is aangetoond dat ze optimaal zijn. Er is nu een andere positieve controle meegenomen namelijk een GST-SBDS (t: 40 kDa), welke vaker gebruikt wordt binnen Sanquin, en welke een sterke inductie geeft. Er is getransformeerd in *E. coli* BL21 cellen en opgegroeid in 500ml LB_{carb} tot een OD₆₀₀ tussen de 0.4 en 0.6, daarna is geïnduceerd met 0,1mM IPTG gedurende anderhalf uur. Bij het maken van het eiwit lysaat zijn aan de bacterial lysis buffer vers DTT, DFP en protease remmers toegevoegd. Er is net als bij het vorige experiment een totaal bacterie lysaat en GST sepharose bollen gecoat met construct (GST-SBDS, GST-TLRI en GST-TLR2) meegenomen.

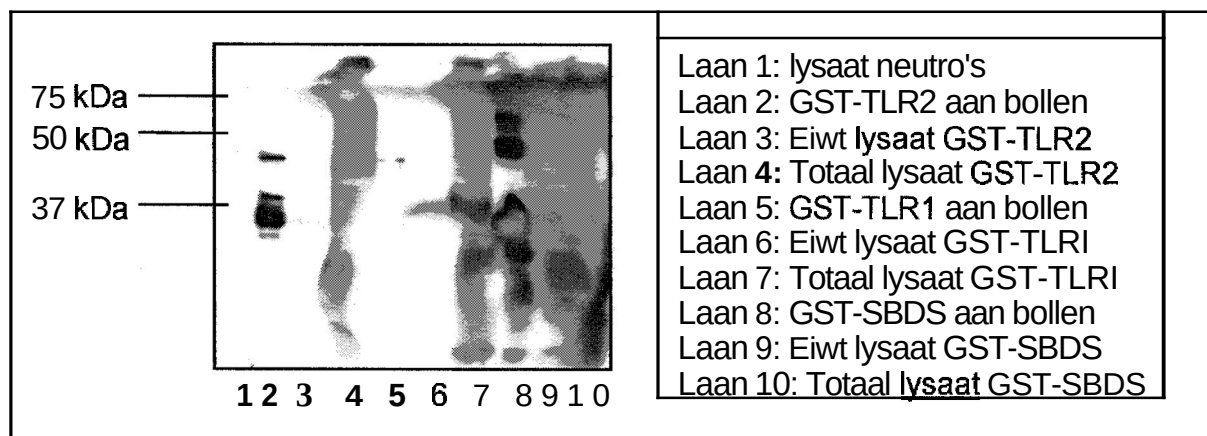
Dit gaf het volgende resultaat:

Bij GST-SBDS totaal lysaat was een bandje te zien bij ± 40 kDa, het GST-SBDS construct gecoat aan de GST sepharose bollen gaf een veel dikkere band te zien. Ditzelfde was bij GST-TLR1 en GST-TLR2 waarneembaar. Hieruit kan opgemaakt worden dat de fusie-eiwitten GST-SBDS, GST-TLR1 en GST-TLR2 binden aan de GST sepharose bollen en klaar zijn voor GST pull-down assays op het lysaat van neutrofiele granulocyten. Er is echter geen plaatje hiervan beschikbaar.

Pull-down met verkregen constructen van hierboven genoemde experiment op het lysaat van neutro's aangetoond met antiGST

Nu aangetoond is dat de GST bollen gecoat kunnen worden met de constructen GST-SBDS, GST-TLR1 en GST-TLR2, kan er gekeken worden welke eiwitten uit het lysaat van neutro's binden aan de intracellulaire staart van de TLR receptor TLR1 en TLR2. Er is een pull-down gedaan op het lysaat van neutrofielen, en bij de detectiestap met antilichamen is als eerste antilichaam een polykloonaal antiGST en als tweede antilichaam een antikonijn met HRP gekozen.

Er zijn bij dit experiment per monster de volgende soorten lysaat meegenomen. Totaal lysaat, eiwit lysaat en GST bollen gecoat met eiwit lysaat. Als negatieve controle is het lysaat van neutro's meegenomen.

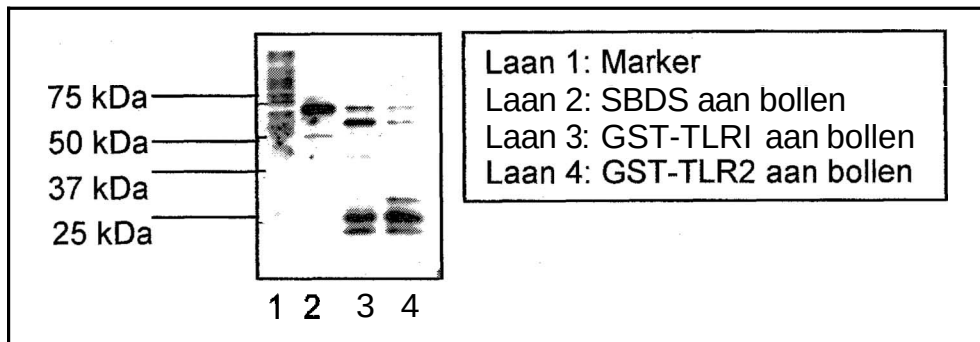


Figuur 21. Pull-down met verkregen constructen van hierboven genoemde experiment op het lysaat van neutro's aangetoond met antiGST

De band bij GST-TLR1 en GST-TLR2 net onder de 50 kDa is waarschijnlijk afkomstig van het fusie-eiwit. Bij het GST-SBDS kleurt nog heel veel meer aan.

Pull-down met verkregen constructen van hierboven genoemde experiment op het lysaat van neutro's aangetoond met antiMyD88

Met de hierboven verkregen constructen, uit het experiment *Ewit kleuring GST-SBDS, GST-TLRI en GST-TLR2*; totaal lysaat en lysaat gebonden aan GST bollen, is daarna een pull-down gedaan, waarbij geprobeerd is het eerste eiwit uit de signaaltransductie route aan te tonen. Dit is in andere cellen **MyD88**, hiervoor is een polyklonaal antiMyD88 gebruikt. MyD88 heeft een grootte van ± 33 kDa.



Figuur 22. Pull-down met verkregen constructen van hierboven genoemde experiment op het lysaat van neutro's aangetoond met *antiMyD88*

Bij alle laantjes worden twee banden gezien tussen de 50 en 75 kDa. Deze banden worden echter altijd gevonden en hebben waarschijnlijk te maken met het ployklonale karakter van het antiMyD88. Bij GST-TLRI en GST-TLR2 wordt een band gevonden bij ongeveer 25 kDa, deze komt niet overeen met de te **verwachten** band van MyD88.

4. Discussie en conclusie

Discussie

Bij het experiment fusie-eiwit GST-TLR induceren met IPTG en pull-down op lysaat van *neutrofielen* bleek na het verdunnen van de overnacht cultuur voor opgroeien en na inductie experiment, geen zoals de literatuur beschrijft, goede inductie te zijn.

Problemen in de inductie van de fusie-eiwitten is onderzocht door een inductie bepaling in de tijd te volgen, hierbij is gekozen voor GST-TLR1.

Bij dit experiment (*Tijd/inductie experiment*) werd zowel bij het induceren met 0,1 mM als met 1 mM IPTG geen toename in de intensiteit van de te verwachten eiwit band gezien. Daarmee was het vermoeden gewekt dat het probleem in het opgroeien, of in het fusie-eiwit zelf zou zitten. Daarom is toen een bekend construct als positieve controle meegenomen: GST-PAK. Deze gaf echter na opgroeien op de manier welke de expressie kit voorschrijft geen duidelijke inductie toename. Vervolgens is verder onderzocht waar het probleem zou kunnen zitten, in het opgroeien of het induceren.

Om met zekerheid te kunnen zeggen dat hier wel dan niet een probleem zat, zijn met een positieve controle uit de gebruikte expressie kit de opgroeiomstandigheid getest. Daaruit bleek dat na het overnacht opgroeien van GST-gus en het daarna 1:9 te verdunnen, de OD₆₀₀ veel te hoog was voor een goede inductie. Er is namelijk een OD₆₀₀ van 0.4 tot 0.6 nodig, dan zit de bacterie groei in de log-fase. Daarom is deze toen nog eens 1:5 verdund, (een verdunning van een verdunning mag eigenlijk niet), en opgegroeid tot een OD₆₀₀ welke tussen de 0.4 en 0.6 lag. Na het induceren van eiwit productie, en uiteindelijk het aantonen van het GST gedeelte van het fusie-eiwit met behulp van een polykloonaal GST antilichaam bleek op het nulpunt, dus voor het induceren van het fusie-eiwit, er al iets aanwezig te zijn in de *E. coli* BL21 cellen wat reageerde met het polyklonale GST antilichaam. Om er achter te komen of dit al in de *E. coli* BL21 cellen aanwezig was, is er naast de positieve controle ook een negatieve controle meegenomen, een pcDNA construct. Het resultaat daarvan wees uit dat er eiwit in de *E. coli* BL21 cellen aanwezig is, Op T₀ was een duidelijke band te zien bij ± 80kD. Dit is echter niet met een eiwit kleuring, maar met antilichamen aangetoond. Daarna zijn verse pcDNA, GST-gus en GST-TLR2 kolonies opgegroeid in LB_{carb.}, tot een OD₆₀₀ tussen de 0.4 en 0.6, en geïnduceerd met 0,1mM IPTG. Hierbij is vooral bij GST-TLR2 een duidelijke toename te zien tussen T₀ en T_{1,5}, maar ook is een afname te zien tussen T_{1,5} en T₃. Waardoor de afname tussen T_{1,5} en T₃ veroorzaakt wordt is onbekend.

Bij het experiment waarbij GST sepharose bollen gecoat worden met het GST-TLR2 en GST-gus construct is een klieving waarneembaar. Deze wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het niet toevoegen van DTT, DFP en protease remmers aan het eiwit lysaat voor sonificeren. DTT, DFP en protease remmers zijn instabiel, en moeten daarom kort voor gebruik vers toegevoegd worden, aangezien ze bij langere aanwezigheid in oplossing afgebroken worden.

Bij het pull-down experiment waarmee geprobeerd is het adaptor eiwit MyD88 aan te tonen werd een band verwacht op de hoogte van het MyD88 eiwit, welke ± 33 kDa is. Deze werd echter niet op blot teruggevonden, daarvoor in de plaats werd wel een duidelijke band gezien bij ongeveer 25 kDa.

TLR4 en TLR6 gaven problemen bij de overgang tussen TOPO vector en expressie vector, daarom heb ik me gefocust op TLR1 en TLR2. Aangezien TLR1 en TLR2 problemen gaven bij induceren van het fusie-eiwit is er geen tijd meer geweest om met TLR4 en TLR6 een fusie-eiwit te maken.

Conclusie

Er is een methode opgezet om GST-TLR fusie-eiwitten tot expressie te brengen. Met deze fusie-eiwitten zijn succesvol een aantal pull-downs gedaan. Daarmee is een eiwit uit de signaaltransductie route van TLR1 en TLR2 in neutrofiele granulocyten aangetoond.

Voor een succesvolle inductie van het GST-TLR fusie-eiwit zijn de volgende omstandigheden van groot belang:

Verse kolonies zijn voor het opgroeien van **TLRs** uit de expressie vector in *E. coli* BL21 cellen nodig. Als antibioticum resistentie kan het beste **carbanicilline** gebruikt worden, aangezien ampicilline resistente *E. coli* BL21 cellen hun resistentie verliezen. De primaire cultuur mag niet verdund worden, terwijl de gebruikte expressie kit dit wel voorschrijft. Daarnaast moet de eiwit inductie gestart worden bij een OD₆₀₀ tussen de **0.4** en 0.6. De optimale inductie tijd en temperatuur voor GST-TLR is anderhalf uur bij 37°C.

Er is kruisreactiviteit tussen het **polyklonaal antiGST** en eiwitten die in *E. coli* BL21 cellen aanwezig zijn. Dit wil zeggen, het polyklonale **antiGST** is aspecifiek.

MyD88 wordt in andere onderzochte cellen altijd als eerste eiwit in de signaaltransductie route gevonden. Wij hebben waarschijnlijk een ander eiwit op deze plaats aangetroffen met een molecuul gewicht van ongeveer 25 kDa. Dit zou heet goed het adaptor eiwit **TIRAP** kunnen zijn welke eenzelfde molecuulgewicht heeft.

TIRAP heeft net als **MyD88** een TIR domein welke met het polyklonale **antiMyD88** aangetoond kan worden.

5. Literatuur

Referenties

1. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. *Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses*. J Leukoc Biol. 2001; **69**; 698-704.
2. Janeway CA.Jr. *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Quant. Biol. 1989; **54**; 1-13.
3. Janeway CA.Jr, Medzhitov R. Semin Immunol. 1998; **10**; 349-350.
4. Akira S, Takeda K. *Toll-like receptor signalling*. Nature. 2004; **4**; 499-511.
5. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A. 1998; **95**; 588-593.
6. Hoffmann J A, Kafatos FC, Janeway CA.Jr., Exekowitz RAB. science 7999: **284**; 1313-1318.
7. Burns K, Martinon F, Esslinger C, et al. *MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling*. J Biol Chem. 1998; **273**; 12203-12209.
8. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. *Myd88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex*. Immunity. 1997; **7**; 837-847.
9. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature. 2001; **412**; 346-351.
10. Karin M, Ben-Neriah Y. *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity*. Annu. Rev. Immunol. 2000; **18**; 621-663.
11. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors*. Nature. 2002; **420**; 329-333.
12. Yamamoto M, Sato S, Mori K, et al. Cutting Edge: *A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- β Promoter in the Toll-like Receptor Signaling*. J Immunol. 2002; **169**; 6668-6672.
13. Beutler B. *Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling*. Nature 2004; **430**; 257-263.
14. Takeda K, Akira S. *Toll-like receptors in innate immunity*. Internal Immunology. 2005; **17**; 1-14.
15. Takeda K, Akira S. International Immunology. 2005; **17**; 1-14.
16. Wang JH, Doyle M, Manning BJ, Di Wu Q, Blankson S, Redmond HP. *Induction of bacterial lipoprotein tolerance is associated with suppression of toll-like receptor 2 expression*. J Biol Chem. 2002; **277**; 36068-36075.
17. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, et al. *Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF- κ B signalling pathway components*. J Immunol. 2003; **170**; 508-519.
18. Kinjo I, Hanada T, Inagaki-Ohara K, et al. *SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation*. Immunity. 2002; **17**; 583-591.
19. Nakagawa R, Naka T, Tsutsui H, et al. *SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses*. Immunity. 2002; **17**; 677-687.

20. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA, Jr., Medzhitov R, Flavell RA. *IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signalling*. Cell. 2002; **10**; 191-202.
21. Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill L, Liew FY. *ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance*. Nat. Immunol. 2004; **4**; 373-379.
22. Wald D, et al. *SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptorsignalling*. Nat. Immunol. 2003; **9**; 920-927.
23. Chuang T, Ulevitch RJ. *Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors*. Nat. Immunol. 2004; **5**; 495-502.
24. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. *Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells*. J Immunol. 2000; **164**; 5998-6004.
25. Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, et al. *Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils*. Blood. 2002; **100**; 1860-1868.
26. DeLeo FR, Renee J, McCormick S, et al. *Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly*. J. Clin Invest. 1998; **101**; 455-463.
27. Haziot A, Tsuberi BZ, Goyert SM. *Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide*. J Immunol. 1993; **150**; 5556-5565.
28. Choi M, Rolle S, Wellner M, et al. *Inhibition of NF-kappaB by a TAT-NEMO-binding domain peptide accelerates constitutive apoptosis and abrogates LPS-delayed neutrophil apoptosis*. Blood. 2003; **102**; 2259-2267.
29. Arbibe A, Mira JP, Teusch N, et al. *Toll-like receptor 2-mediated NF-KB activation requires a Rac1-dependent pathway*. Nature Immunology. 2000; **1**; 533-540.

Bijlage 1: Tabellen

Immuunsysteem en Toll-like receptoren

Tabel 1. adaptievelaangeborenimmuunsysteem

Adaptieve immuunsysteem	Aangeboren immuunsysteem
a-specifiek geen memory • fysieke barrière • fagocyten • interferon • complement factoren	specifiek memory cellen • lymfocyten • antilichamen

Tabel 2. Humane Toll-like receptoren en hun liganden

Toll-like receptor	Ligand (PAMP)
TLR1 (dimeer met TLR2)	Bacteriële lipopeptide
TLR2	Peptidoglycan
TLR4	LPS (lipopolysaccharide), heat-shock proteïnes, Taxol
TLR6 (dimeer met TLR2)	Mycoplasmatisch lipopeptide

Bijlage 2: Gebruikte bacterie stammen/gemaakte constructen

Tabel 3. Gebruikte bacterie stammen

Bacterie stam	Omschrijving	Bron
<i>E. coli</i> TOP10	One Shot [®] TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	Chemically Competent <i>E. coli</i> DH5α	Sanquin
<i>E. coli</i> BL21	Electrocompetent <i>E. coli</i> BL21	Sanquin
<i>E. coli</i> BL21	Chemisch Competente <i>E. coli</i> BL21	Sanquin

Tabel 4. Gemaakte constructen

Construct	Omschrijving	Bron
GST-TLR1	TLR in pDEST15, Amp ^R	Sanquin
GST-TLR2	TLR in pDEST15, Amp ^R	Sanquin
GSTgus	gus in pDEST15, Amp ^R	Invitrogen
GST-PAK	PAK in pDEST15, Amp ^R	Sanquin
GST-pcDNA3+	'lege vector' met T ₇ promoter, Amp ^R	Invitrogen

Bijlage 3: Protocollen

polymerase chain **reaction (PCR)** intracellulaire staart TLR

Materiaal:

- GeneAmp® PCRSYSTEM 9700
 - PCR tubes 0,2 ml (BIOplastics)
 - Biowax (BIOzym)
 - Gedestilleerd H₂O (Braun)
 - Accuprime Pfx Supermix (-20°C, Invitrogen)
 - Humaan cDNA van neutrofiele granulocyten (-20°C tot 4°C, ■ op 10 verdund)
 - Forw.TLR1: 5' -CACCTCTGCAGCTACTTGGATCTG -3' (1nmol. Stock opl. en daaruit 100pmol. Werkoplossing, Invitrogen)
 - Rev. TLR1: 5' -CTATTTCTTTGCTTGCTCTGT -3' (Invitrogen)
 - Forw.TLR2: 5' -CACCCATGGCCTGTGGTATATGAAA -3' (Invitrogen)
 - Rev. TLR2: 5' -CTAGGACTTTATCGCAGCTCT -3' (Invitrogen)
 - Forw.TLR4: 5' -CACCTTGCTGGCTGCATAAAGTAT -3' (Invitrogen)
 - Rev. TLR4: 5' -TCAGATAGATGTTGCTTCCTG -3' (Invitrogen)
 - Forw.TLR6: 5' -CACCATCTACTTGGATCTGCCCTGGTATCTC-3' (Invitrogen)
 - Rev. TLR6: 5' -TTATGATTTACATCATTGTTTTTCAG -3' (Invitrogen)
- In PCR tube 25 µl Accuprime mix + 1,5 µl Forw. primer + 1,5 µl Rev. primer + 1 µl cDNA
 - Voor de blanco wordt i.p.v. cDNA H₂O toegevoegd.
 - Als laatste 25 µl BIO wax toegevoegd.
 - Vervolgens in GeneAmp® PCRSYSTEM 9700 zetten

Instellingen PCR apparaat:

- | | | |
|----|--|---|
| 1. | 95°C: 5 minuten | denaturatie |
| 2. | 95°C: 15 seconden
60°C: 30 seconden
68°C: 1 minuut | dit zijn de werkelijke cycli (35 stuks) |
| 3. | 68°C: 10 minuten | |

- Na de laatste cyclus wordt de reactie op 4°C gehouden, om primer-dimeren te voorkomen. De monsters kunnen bewaard worden bij -20°C.

Agarose gel electroforese

Materiaal:

- Magnetron (Amana commercial microwave)
- Electroforese bak (Horizon® 11-14)
- Voltmeter (DELTA ELEKTRONIKA)
- Gel tray
- Kam 15 tot 25 slots
- Agarose (Invitrogen)
- 20× TAE buffer → 1× TAE buffer
- TRIS (acetic UltraPure™ Tris, invitrogen)
- Na₂EDTA (natriumedetat usp xxII/BP 88/pH.eur.II, Siegfried Synopharm)
- HAc (acetic acid 96%, Merck)
- Demi water
- 500ml fles
- 6 X loading dye solution (Fermentas)
- Ethidiumbromide (5µl → 10 g/l)

maak geltray en kammen schoon en droog.

Sluit de beide uiteinden van de geltray af met autoclaveer tape.

voeg bij elkaar in 500 ml fles: - 1,0 g agarose (1% agarose gel).

- 50 ml 1× TAE buffer.

50× TAE: 484g TRIS

37,22g Na₂EDTA

114,2ml HAc

oplossen in 2 liter demi water

50× TAE → 1× TAE (1:49 verdunnen)

verwarmen in magnetron tot agarose opgelost is, 50 ml TAE buffer toevoegen.

afkoelen tot handwarm.

- voeg toe: 5 µl EtBr (carcinogeen!).
- giet de gel zonder luchtballen.
- vul electroforese bak met TAE buffer.
- verwijder autoclaveer tape en leg tray in electroforese bak.
- pipetteer 5 µl marker (10 baseparen ladder) in slot I.
- 5 µl monster in 2 en verder.
- ongeveer 1 uur runnen bij 120 V.
- onder UV-licht bekijken en foto printen.

Zuiveren PCR produkt uit gel m.b.v. **GFX PCR** and **GelBand** Purification Kit van Amersham Biosciences

Materiaal:

- Microcentrifuge (Eppendorf centrifuge 5417C)
- Eppendorf tubes van 1,5ml
- Mesje (carbon steel surgical blades (sterile))
- PCR produkt op gel
- UV bak (long wave)

- Balans (Sartorius)
- Hitteblok (60°C)
- GFX kolom (Amersham)
- GFX opvang-buis (Amersham)
- Capture buffer (Amersham)
- Washbuffer (Amersham)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)

Bepaal gewicht lege eppendorf tube m.b.v. balans

- Leg gel op UV bak.
 - Snij met behulp van het mesje goede produkt uit gel en doe in eppendorf tube.
 - Bepaal gewicht van het uitgesneden stuk (volle eppendorf tube – lege eppendorf tube).
- Voeg 1:1 Capture buffer toe (vb. 200mg gel + 200mg Capture buffer).
- zet in hitteblok (60°C) voor 10 minuten.
 - alles pipetteren in GFX-kolom welke in GFX-opvangbuis gezet is.
- 30 seconden afdraaien bij 14000 rpm. (doorgedraaide weg)
- 500µl Washbuffer toevoegen.
- 30 seconden afdraaien bij 14000 rpm. (doorgedraaide weg)
- 30µl gedestilleerd H₂O toevoegen en 1 minuut laten staan.
- 1 minuut afdraaien bij 14000 rpm.
- Gezuiverd PCR produkt uit gel verkregen.

Kloneren PCR produkt in pENTRtm/D-TOPO vector

Materiaal:

- Waterbad (42°)
 - Stoof (Dépex Rostfrei; 37°C)
 - Eppendorf tubes van 1,5ml
 - PCR produkt
 - Zout-oplossing (invitrogen)
 - Steriel water (invitrogen)
 - TOPO[®] vector (invitrogen)
 - Chemisch competente *E. coli* DH5α cellen
- 2µl TLR1 (PCR produkt) + 1µl zout-oplossing + 2µl steriel water + 1µl TOPO vector in eppendorf tube van 1,5ml (mixl).
 - 15 minuten kamertemperatuur, daarna op ijs.
 - 2µl mix1 + 50 µl *E. coli* DH5α cellen, 15 minuten op ijs.
 - exact 1 minuut bij 42°C, ± 2 minuten op ijs, 750µl LB medium toevoegen.
 - 1 uur in schudstoof bij 37°C, uitplaten op kanamycine resistente platen, 50 en 200µl.
 - overnacht in stoof bij 37°C.
 - kolonie aantippen met pipetpunt en 1: zwengelen in 100µl gedestilleerd water en 2: pipetpunt in 3ml kanamycine resistent medium doen.
 - 1: klaar voor colony PCR, 2: overnacht groeien en miniprep doen.

Colony PCR

Materiaal:

- 100µl H₂O + kolonie (kloneer experiment ENTR vector of expressie vector)
 - Forw.M13 primer 5'- GTAAAACGACGGCCAG -3' (invitrogen bij -20°C)
 - Rev. M13 primer 5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3' (invitrogen bij -20°C)
 - Taq polymerase (-20°C, TspX1 polymerase 100µl u/µl)
 - 10× buffer (-20°C)
 - dNTP 20mM (-20°C)
 - Gedestilleerd H₂O (Braun)
 - Biowax (BIOzym)
 - PCR tubes 0,2ml (BIOplastics)
 - GeneAmp® PCRSYSTEM 9700
- vul per TLR 10 epjes met 100 µl gedestilleerd H₂O.
 - per epje 1 kolonie van vorig experiment (klonen PCR produkt in pENTRtm/D-TOPO) aantippen en zwingelen in 100 µl H₂O.
 - 10 minuten bij 95°C, vervolgens op ijs (mixl).
 - Per reactie in PCR tube: 13µl H₂O + 2,5µl 10× buffer + 1,0µl dNTP + 0,5µl Taq polymerase + 1,5µl Forw.TLR primer + 1,5µl Rev.TLR primer
 - NB. i.p.v. 1µl cDNA en 4µl H₂O wordt nu 5µl mix1 toegevoegd aan PCR reactie tube.
 - instellen PCR apparaat, zie protocol "polymerase chain reaction (PCR) intracellulaire staart TLR.

Minipreparaat m.b.v. "QIA prep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge" kit

Materiaal:

- Microcentrifuge (eppendorf centrifuge 5417C)
 - QIA prep spinkolom (Qiagen)
 - QIA prep collection tube (Qiagen)
 - P1 buffer; resuspension buffer, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A (bij 4°C van Qiagen)
 - P2 buffer; lysis buffer; 200 mM NaOH, 1% SDS (Qiagen)
 - N3 buffer; neutralization buffer (Qiagen)
 - PB buffer (Qiagen)
 - PE buffer; wash buffer (Qiagen)
 - Gedestilleerd H₂O (Braun)
- overnacht bacterie cultuur uit experiment; kloneren PCR produkt in pENTRtm/D-TOPO, 2 minuten afdraaien bij 6000 toeren per minuut (rpm).
 - decanteren, resuspendeer pellet in 250µl P1 buffer (uit koelkast) en breng over in 1,5ml epje.
 - Voeg 250µl P2 buffer toe, pipetteer 4-6 maal voorzichtig op en neer.
 - Voeg 350µl N3 buffer toe, pipetteer 4-6 maal voorzichtig op en neer.
 - 10 minuten afdraaien bij 13000 rprn.
 - Zet QIA prep spinkolom in QIA prep collection tube.

- Decanteer supernatant in QIA prep spin kolom.
- 30-60 seconden afdraaien bij 13000 rpm. Eluaat weggooien.
- 500µl PB buffer toevoegen, 30-60 seconden afdraaien bij 13000 rpm, eluaat weggooien.
- 750µl PE buffer toevoegen en afdraaien bij 13000 rpm. Eluaat weggooien.
- Nog 1 maal 30-60 seconden afdraaien bij 13000 rpm, om residu wasbuffer weg te krijgen.
- Plaats QIA prep spin kolom in nieuw 1,5ml epje, voeg 50µl gedestilleerd H₂O toe, en laat 1 minuut staan.
- 1 minuut afdraaien bij 13000 rpm (in epje zit nu puur plasmide DNA).

Digestie minipreps

Materiaal:

- Waterbad (37°C)
 - Miniprep (TLRs, -20°C)
 - Restrictie enzym NotI; vector (10u/µl, Fermentas)
 - Restrictie enzym Eco130I, NcoI en PstI (10u/µl, Fermentas)
 - O⁺ buffer met BSA 10× (Fermentas)
 - Gedestilleerd H₂O (Braun)
- 5µl miniprep + 1µl NotI (vector) + 1µl (restrictie enzym insert) + 1,5 µl O'buffer + 6,5µl gedestilleerd H₂O.
 - 1 uur bij 37°C laten staan.
 - 10µl op gel zetten met 2µl 6× loading dye.

Sequenzen TLR insert

Materiaal:

- Sequencer (ABI PRISM)
- Centrifuge (Rotanta 96R)
- Primer (Forw. en Rev. TLR-primers)
- Plasmide DNA (miniprep TLRs; -20°C)
- Gedestilleerd H₂O (Braun)
- BDT (BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, ABI PRISM)
- BDTbuffer (BigDye Terminator v1.1, v3.1 5× sequencing Buffer, AB Applied Biosystems)
- Biowax (BIOzym)
- 96wells plaat (Titergene Thermostable Plates Polycarbonaat 96wells)
- Sephadex (SephadexTM G-50 Superfine, Amersham Biosciences)

Loading buffer (Hi-DiTM Formamide, AB Applied Biosystems)

- Denatureren bij 94°C. Dubbelstrengs DNA wordt enkelstrengs gemaakt.
- Annealing bij 50°C. Bij sequensen wordt maar 1 primer per monster gebruikt, zodat maar 1 streng gekopieerd word. Per monster een afzonderlijke forward en reverse primer reactie.

- Elongatie en labeling bij 60°C.

Per reactie wel

- 0,5µl primer (forward of reverse) + 1,0µl plasmide DNA (miniprep) + 8,9µl H₂O + 8µl BDT (big dye terminator) + 4µl BDT buffer + 20µl BIORad wax → pipetteren in 96-wells plaat.

Sequence PCR

94°C → 10 seconden

50°C → 10 seconden

60°C → 2 minuten

35 cycli

kolommen maken

sequence plaat vol doen met sephadex.

- 300µl H₂O toevoegen en 3 uur laten staan.
plaat afdraaien; 10 minuten bij 2000 rpm.
- sequence PCR produkt zonder wax op sephadex kolom pipetteren. 96-wells plaat hier onder doen.
10 minuten afdraaien bij 2000 rpm.
monsters droogdampen (96-wells plaat).
10µl loading buffer toevoegen.
- plaat in automatische sequencer zetten.

Maken LB-medium

Materiaal:

- Bovenweger (PG5002 Delta Range®)
- Maatcilinder 2000ml
- Bacto™ Tryptone *pancreatic digest of Casein* (BD)
- Bacto™ Yeast Extract *extract of autolysed yeast cells* (BD)
- NaCl (BUFA B.V. Pharmaceutical Products)
- Demiwater
- 500ml fles

antibioticum (100mg/ml en dan 1:1000 verdunnen)

Op bovenweger: 5g tripton (bact.), 2½g Gistextract, 5g NaCl afwegen.

Oplossen in 500ml Demiwater, in maatcilinder met roerboon.

- In flessen van 500ml overgieten.
- Dop los op fles en autoclaveer tape hier overheen.
- Autoclaveren.
- Voor gebruik antibioticum toevoegen, fles niet warmer dan handwarm.

Maken antibioticum resistente agar platen

Materiaal:

- Bovenweger (PG5002 Delta Range®)
- Maatcilinder 2000ml
- Bacto™ Tryptone *pancreatic digest* of *Casein* (BD)
- Bacto™ Yeast Extract *extract of autolysed yeast cells* (BD)
- NaCl (BUFA B.V. Pharmaceutical Products)
- Agar Bacteriological (AGAR N°1 OXOID)
- Demiwater
- 500ml fles
- waterbad (55°C)

antibioticum 100 mg/ml (1 : 1000 verdunnen)

- Op bovenweger afwegen: **5g** Trypton, **21/29** Gistextract **2 1/2g** NaCl en **71/29** Agar.
- In **500ml** Demiwater oplossen met roerboon in maatcilinder.
- Overgieten in **fles** van **500ml**.
- Dop los op fles en autoclaveer tape hier overheen.
Autoclaveren.
Na autoclaveren in waterbad van **■ 55°C**.
Als flessen handwarm zijn, antibioticum resistentie toevoegen.
Mengen en platen gieten in plastic platen.
- Bewaren in folie bij **4°C**

Kloneren **TLR** vanuit **pENTR™/D-TOPO** in expressie vector **via 'E. coli**
expressie systeem **met Gateway® Technology"**

Materiaal:

- Schudstoof (Innova 4000 incubator shaker; 37°C)
- Stoof (Dépex Rostfrei; 37°C)
- miniprep TLR-pENTR™/D-TOPO (-20°C)
- pDEST™15 (-20°C Invitrogen)
- 5× LR Clonase™ Reactiebuffer (-80°C Invitrogen)
- TE buffer, pH8,0
- TRIS (acetic UltraPure™ Tris, invitrogen)
- Na₂EDTA (natriumedetat usp xxII/BP 88/pH.eur.II, Siegfried Synopharm)
- HCl (zoutzuur 96%, Merck)
- LR Clonase™ Enzym Mix (-80°C, Invitrogen)
- Proteïnase K (-80°C, Invitrogen)
- DH5α cellen (-80°C)
- S.O.C. medium (-80°C, Invitrogen) / LB-medium (KT)

LR Recombinatie reactie

1. 1µl miniprep (TLR in pENTRtm/D-TOPO)
2µl destination vector (pDESTtm15)
4µl 5× LR Clonasetm Reactiebuffer
9µl TE buffer
TE buffer, pH8,0 → Tris-HCl; 10mM TRIS-HCl + 1mM EDTA
■ M TRIS-HCl(molm.121,14): 121,14 g/l. → 10mM (100× verdund)
■ M EDTA(molm.372,24): 37,22g in 100ml → ■ mM (1000× verdund)
0,5ml 1M HCl + 18,6mg → 50ml met pH van 8,0 (KT)
2. haal LR Clonasetm Enzym Mix uit -80°C en zet ± 2 minuten op ijs.
3. vortex LR Clonasetm Enzym Mix 2 maal kort.
4. aan elk reactie epje van ■ _wordt 4µl LR Clonasetm Enzym Mix toegevoegd.
Goed mengen door op en neer te pipetteren (LR Clonasetm Enzym Mix na gebruik direct bij -80°C zetten).
5. incubeer f ■ uur bij 25°C. Langer incuberen zorgt voor meer kolonies.
6. voeg 2µl Proteïnase K aan elke reactie toe en incubeer 10 minuten bij 37°C.

Transformeren in *E. coli* DH5α cellen

- 1µl LR recombinatie reactie (punt 6) + 50µl DH5α chemisch competente *E. coli* cellen in 1,5ml epje. Voorzichtig mengen.
- 30 minuten incuberen op ijs.
- precies 30 seconden "heatshock" bij 42°C. Onmiddellijk op ijs.
- voeg na ± 2 minuten 450µl S.O.C. medium of LB-medium toe.
- 1 uur in schudstoof bij 37°C.
- 20 en 100µl uitplaten op ampicilline resistente platen.
- volgende dag kolonie aanenten en miniprep maken (GST-TLR).

Transformeren GST-TLR expressie vector in *E. coli* BL21 d.m.v. heatshock

Materiaal:

- Waterbad (42°C)
 - Thermometer
 - Schudstoof (37°C, Innova 4000 incubator shaker)
 - Plasmide GST-TLR fusie vector (-20°C)
 - *E. coli* BL21 chemisch competente cellen (-80°C)
 - Gedestilleerd H₂O (Braun)
 - LB medium
 - Eppendorf tubes 1,5ml
 - Ampicilline resistente agar platen
- 50µl BL21 cellen in eppendorf tube pipetteren + 1µl plasmide GST-TLR fusie vector.
 - 15 minuten op ijs.
 - precies 1% minuut bij 42°C.
 - ± 2 minuten op ijs.
 - 550µl LB medium toevoegen.
 - 1 uur bij 37°C, in schudstoof.
 - alles uitplaten op ampicilline resistente platen.

NB. de volgende dag gelijk verder gaan met inductie proef, kolonies hiervoor moeten vers zijn.

Inductie GST-TLR **m.b.v.** IPTG en zuiveren van GST-TLR eiwit **lysaat**

Materiaal:

- Schudstoof (Innova 4000 incubator shaker; 37°C)
- Buckets
- Centrifuge (Beckman Coulter Avanti™ J-30I)
- Sonifier (Bramson Sonifier 250, Marius instrumenten)
- Per TLR, 500ml LB medium
- Ampicilline (100 mg/ml)/Carbanicilline(100mg/ml) → 1:1000 verdunnen
- IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactopyranoside, SIGMA)
- Bacterial lysis buffer
- Triton X-100 (SIGMA)
- Glycerol (glycerol 99% GC SIGMA)
- PBS (gebufferde natriumchloride oplossing BRAUN)
- DTT (dithiothreitol SIGMA)
- DFP (diisopropyl fluorophosphates >97% GC FLUKA)
- Proteaseremmer (complete™ EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche)

1M IPTG (molm. 238,3): 238,3mg oplossen in 238,3μl gedestilleerd H₂O.

- 1 kolonie van vorige experiment **aanenten** en in 50ml LB medium ampicilline/carbanicilline resistent. Overnacht opgroeien.
- 1 op 10 verdunnen in LB medium ampicillinelcarbanicilline resistent, 50ml overnacht cultuur bij 500ml vers medium.
- 1 uur opgroeien.
- induceren met 0,1 mM IPTG (50μl).
- 3 uur induceren.
- Per TLR, dus per 500ml, verdelen over 3 buckets.
- 15 minuten afdraaien bij 5000 rpm.
- resuspendeer pellets in 10ml bacterial lysis buffer, pipetteer in Nunc.buis en zet op ijs.
 - Bacterial lysis buffer: 1% TritonX100 → 1ml
10% glycerol ↗ 10ml
aanvullen tot 100ml met PBS (vlak voor gebruik 15,43 mg DTT, 50μl DFP en 1 tablet protease remmers toevoegen)
- Sonificeer 4 maal 1 minuut, met 1 minuut pause tussen iedere sonificatie.

Sonificeren

Instellingen

- Limit
 - dutycycle 50
 - dop van Nunc.buis halen
 - dunste metalen tip op sonifier draaien
 - tip in vloeistof Nunc.buis (niet de rand raken)
- vloeistof verdelen over 1,5ml epjes.
 - 30 minuten afdraaien, bij 14000 rpm.
 - supernatant verdelen, 500µl per epje (-20°C).

GST-TLR pull-down op lysaat van neutrofielen

PBS/TNC: voeg 55ml TNC toe aan nieuwe fles PBS (500ml).
1× lysis buffer: aan 1 fles gedestilleerd water (500ml) voeg je: 4,15g NH_4Cl , 0,5g KHCO_3 en 18,5mg EDTA toe en houd op ijs.
Percoll: 12,5ml per patiënt.
HEPES compleet: 20% HSA (2,5ml) + 100µl CaCl (1M → 1mM) + 100mg glucose / aanvullen tot 100ml met Hepes⁻. Filtreren, met filter op spuit.
Bloed: heparine buis (groene dop)

Isoleren neutrofiele granulocyten

Materiaal:

- Centrifuge (Rotanta **96R**)
- **Casy®1** (Beckman)
- Casy Ton (Beckman)
- **PBS/TNC** (KT)
- PBS (gebufferde natrium oplossing, Braun)
- TNC (tri-natriumcitraat sterile, CLB)
- **1× lysis buffer** (ijs)
- NH_4Cl (ammoniumchloride, Merck)
- KHCO_3 (kaliumhydrogen carbonaat, Merck)
- EDTA (Na_2EDTA , Siegfried Synopharm)
- Percoll (voor gebruik op KT)
- HEPES compleet
- 20% HSA (humaan serum albumine Cealb[®], Sanquin)
- CaCl (calcium chloride dihydraat (Calbio chem.)
- Glucose (D(+)-glucose monohydraat, Merck)
- Filter (FP30/0,2 CA-S 0,2µm; 7bar max, Schleicher&Schuell)
- Spuit (50ml, BD Plastipak[™])

Bloed in heparine buis

Verdun bloed met **PBS/TNC** in 50ml Nunc.buis ($\pm 1:1$).

Pipetteer voorzichtig onder een kleine hoek 20-35ml verdund bloed op Percoll.

Centrifugeer 20 minuten bij 2000 rpm (opsart: 3, rem: 3) bij 20°C.

Supernatant en ring afzuigen, tot net boven de rode cel laag. Buizen aanvullen tot 50ml met koude 1× lysis buffer. Ery's zijn gelyseerd als suspensie "doorzichtig" en/of "donkerrood" is (± 10 minuten).

Centrifugeer direct nadat alle buizen gelyseerd zijn 5 minuten, 1500 rpm bij 4°C.

- Resuspendeer pellets in klein volume 1× lysis buffer, pool identieke celsuspensies (cellen bij elkaar in 1 buis), vul aan tot 50ml en laat 5 minuten op ijs staan.
- Centrifugeer 5 minuten, 1500 rpm bij 4°C.
- Resuspendeer pellets in PBS (gebufferde NaCl oplossing) en centrifugeer 1500 rpm voor 5 minuten KT.
- Resuspendeer pellets in HEPES compleet (in polypropyleen buizen), 5ml. Bepaal PMN's (polymorfnuclear cells) met behulp van de Casy. Pipetteer 10ml Casy..... 20µl Neutro's.
- bijvoorbeeld: 20 miljoen neutro's $\nearrow$ 1:1 verdund, dus 10 miljoen in HEPES opgelost.

■ × GST-buffer:	10% glycerol		
	50mM Tris-HCl (pH7,4)		
	200mM NaCl		in 250ml gedestilleerd H ₂ O en op ijs
	1% NP-40		bewaren
	2mM MgCl ₂		

- 100% glycerol $\nearrow$ 10% glycerol
 $100/10 = 10 \rightarrow 250/10 = 25\text{ml}$
- 1M Tris-HCl (molm 121,14)
 $1\text{M} \rightarrow 50\text{mM} (20\times)$
 $250/20 = 12,5\text{ml}$
- 1M NaCl (molm 51,44)
 $1\text{M} \rightarrow 200\text{mM}$
 $51,44 \times 0,214 = 2,6\text{g}$
- 100% NP-40 $\nearrow$ 1% NP-40
 $100/1 = 100 \nearrow 250/100 = 2,5\text{ml}$
- 1M MgCl₂ $\rightarrow$ 2mM MgCl₂ (500×)
 $250/500 = 0,5\text{ml}$
- Verdelen in Nunc. buizen van 50ml.

Tablet protease remmer toevoegen en oplossen.

Voor gebruik DFP toevoegen, (1:1000, in zuurkast. pipetpunt in afval Nunc.buis doen, handschoenen aan tijdens deze handeling)

GST-TLR *pull-down* Assay

Materiaal:

- Hitteblok (37°C)
- Micro-centrifuge (Eppendorf centrifuge 5417C)
- Koude kamer (4°C)
- Roteer machine (Rotary mixer, Snijders)
- Hitteblok (95°C)
- 1× GST-buffer
- glycerol (Glycerol SigmaUltra approx. 99% GC, Sigma)
- TRIS (acetic UltraPure™ Tris, invitrogen)
- HCl (Zoutzuur 37%, Merck)
- NaCl (Natriumchloride, BUFA)
- NP-40 (Nonidet® P40 substitute, Fluka)
- MgCl₂·6H₂O (Magnesiumchloride-Hexahydraat, Merck)
- Glutathion bollen (sepharose™4B, Amersham Biosciences)
- 2× SampleBuffer
- β-mercaptoethanol (2-mercaptoethanol, BIORAD)

Neutro's verdunnen met HEPES compleet naar $1,0 \cdot 10^7/l$.

Glutathion bollen (150µl per pull-down) 3× wassen in gedestilleerd H₂O.
(wassen: 500µl water toevoegen en kort afdraaien, water afzuigen)

1 maal wassen in 1× GST-buffer (wel altijd vloeistof op bollen laten staan i.v.m. uitdrogen).

100µl GST-TLR + 30µl gewassen bollen + 240µl 1× GST-buffer.

30 minuten in koude kamer draaien.

oortussen neutro's bij 37°C in hitteblok zetten (30 minuten).

- GST-TLR gecoate bollen 5 maal wassen in 1× GST-buffer.

- Bij laatste keer wassen, bollen droog zuigen met injectie naald.

- 500µl neutro's + 750µl 1× GST-buffer en op ijs bewaren.

Alles van bovenstaande aan GST-TLR gecoate bollen toevoegen.

30 minuten draaien in koude kamer.

10 minuten afdraaien, 14000 rpm bij 4°C.

Supernatant afpipetteren en in nieuw epje doen.

- 5× wassen in 1× GST-buffer (500µl).

- 2× sample buffer toevoegen + 1,5µl β-mercaptoethanol en 5 minuten bij 95°C.
supernatant in nieuw epje. Klaar voor Westernblot.

SDS-PAGE (sodiumdodecylsulfaat polyacrylamide electroforese)

TRIS A

- 45,4g TRIS oplossen in 250ml demi water, pH stellen op 8,8 + 10ml 10% SDS.

TRIS B

- 6,1g TRIS oplossen in 100ml demi water, pH stellen op 6,8 + 4ml 10% SDS.

10% SDS

- 10g SDS oplossen in 100ml demi water.

APS

- 1g ammoniumpersulfaat oplossen in 10ml demi water.

Running buffer

- in 25 liter: 360g glycine + 75,8g TRIS + 25g SDS, pH stellen op 8,6

2× sample buffer

- in 50ml Nunc buis: 125mM TRIS B (12,5ml) + 20% glycerol (10ml) + 5% SDS (25ml) + 0,02% coomassie blue (10mg) + 100mM DTT (0,7g) + 2,5ml gedestilleerd H₂O

SDS-PAGE

Materiaal:

- Electroforese bak
 - Voeding (DELTA-ELEKTRONIKA)
 - 1½ mm glasplaat (Short Plates 5 Mini Protean 3, BIORAD)
 - Bufferdam (BIORAD)
 - TRISA
 - TRIS B
 - SDS (sodiumdodecylsulfaat)
 - Glycine (glycinum, BUFA)
 - Glycerol (Glycerol SigmaUltra approx. 99% GC, Sigma)
 - Coomassie (Coomassie[®] Briljant Blue R-250, BIORAD)
 - DTT (Dithiothreitol, Sigma)
 - Protogel (BIOzym)
 - Gedestilleerd H₂O (Braun)
 - APS (-20°C ammonium persulfaat)
 - TEMED (BIOrad)
 - Butanol (n-butyl alcohol, J.T. Baker)
 - Running buffer
 - Nunc buis (50ml Centrifuge Tube Flat Top Cap Polypropylene, Cornig)
 - 2× sample buffer
 - Marker (BIOrad)
- 1½ mm glasplaat met klein plaatje ervoor in groene klem zetten, met onderkant op vlakke ondergrond vastklemmen. En op standaard zetten.
In Nunc.buis 12,5% running gel maken: 2,5ml TRIS A + 4,1ml Protogel + 3,4ml gedestilleerd H₂O + 50µl APS + 10µl TEMED.
Tussen glasplaten pipetteren tot ± 1,5 cm onder de rand.
Laagje water/butanol op gel pipetteren.
Wachten tot gel gepolymeriseerd is.
 - Water/butanol afgieten en gel spoelen met water. Daarna goed droog maken met papier.
 - Vervolgens in Nunc.buis 12,5% stacking gel maken: 1,25ml TRIS B + 650µl Protogel + 3,1 ml gedestilleerd H₂O + 50µl APS + 10µl TEMED.
 - En kam tussen glasplaten zetten (met handschoenen aan).
Na polymeriseren kam eruit halen en slotjes spoelen met demi water.
 - Slotjes droogmaken met papier.

- In electroforese bak zetten met hoge kant naar buiten, tegen plaatje aan de andere kant zetten (bufferdam).
- Midden volgietsen met Running buffer (controle op lekkage), daarna rest van de bak ook vol met Running buffer.
Monsters in pipetteren (laan1 is altijd de marker)
Electroforese bak aansluiten op voeding (maximaal 50mA)
- En ± 1 uur runnen, tot loading door de gel gelopen is.
- Vervolgens kleuren of blotten.

Eiwit kleuring (coomassie)

Materiaal:

- Coomassie oplossing (50% methanol)
(10% HAc)
(100ml demi water)
(snufje coomassie blue)
- Destain oplossing (50% methanol)
(10% HAc)
(40% demi water)
- SDS gel 30 minuten kleuren met coomassie
- Vervolgens ontkleuren, met destain, tot eiwit bandjes goed zichtbaar zijn, en achtergrond relatief licht geworden is.

Westernblotting

Materiaal:

- Voeding (POWER PAC300, BIORAD)
- Blot apparaat (TE Series Transphor Electrophoresis Unit, HSI)
- SDSgel
- 4 whatman papieren (10 bij 7cm)
- 1 nitrocellulose membraan (9 bij 6cm, Protan[®]Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher&Schuell Bioscience)
- Blotbuffer (verdund)
- Blotbuffer stock (10×)
- TRIS (acetic UltraPure[™] Tris, invitrogen)
- Glycine (glycinum, BUFA)
- Methanol (Merck)
- Demi water

Blotbuffer (verdund): 150ml blotbuffer + 300ml methanol aanvullen tot 1500ml met demi water.

Blotbuffer (stock, 10×): 60,6g Tris + 288g Glycine aanvullen tot 2 liter met demi water.

- Zwart/witte houder in bak met laagje blotbuffer leggen (zwart onder).
- Spons erop en 2 whatman papieren daarop.

- Stacking van SDS gel snijden, **nitrocellulose** membraan onderdompelen in **blotbuffer** voor ongeveer 10 seconden. En op SDS gel leggen
Gel + nitrocellulose membraan op de ondergedompelde blotpapieren leggen (gel onder en membraan boven)
- Over membraan wrijven om luchtballen weg te krijgen.
- Twee overgebleven whatman papieren op membraan leggen en spons daar bovenop.
Zwart/witte houder in blot apparaat zetten, wit voor.
- Rode snoer bij wit, zwarte snoer bij zwart.
- **1**uur **blotten** bij **300mA** in bak met ijswater.

Detecteren met antilichamen

Materiaal:

- TBST
- TRIS (**acetic UltraPure™** Tris, invitrogen)
- NaCl (Natriumchloride, Merck)
- Tween 20 (Merck)
- 5% ELK (ELK, Campina)
- ECL, reagens1 en reagens2 (Amersham)
- Film (Kodak **BioMax** XAR Film)

5% ELK: 2,5g in 50ml TBST

TBST: 30,3g TRIS + 213g NaCl + 12,5ml Tween 20 aanvullen tot 25 liter met demi water → pH van ongeveer 8,0.

- **Blot** 30 minuten incuberen in ELK (5%)
- 3 maal kort wassen met TBST
- Blokken met 1^e antilichaam (in ELK)
- 3 maal kort wassen met TBST
- Blokken met 2^e antilichaam, deze bevat HRP (in ELK)
- 3× 15 minuten wassen met TBST
- **1**× 15 minuten wassen met PBS
- Vervolgens blot 1 minuut incuberen met 1 deel reagens1 en **1** deel reagens2
ECL.
- Blot in cassette leggen
- Kodak film ontwikkelen