

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

Es werden hier die häufig verwendeten Lösungen und Geräte aufgeführt. Die Materialien, die für einzelne Methoden benötigt werden, sind unter den einzelnen Punkten beschrieben. Die bei den Methoden aufgeführten Konzentrationsangaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf die Endkonzentration im Versuchsansatz.

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen.

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|--|
| PBS pH 7,2-7,4 (Phosphat-gepufferte Saline) | 2,7 mM Kaliumchlorid (KCL) 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 137 mM Natriumchlorid (NaCL) 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) |
| PBS/BSA (PBS mit 0,5% (w/v) Rinderserumalbumin) | 5 g/l Rinderserumalbumin (BSA) in PBS |
| PBS/BSA/Azid | 0,01% Natriumazid (NaN ₃) in PBS-BSA |
| PBS-BSA-EDTA | 2mM Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS-BSA |
| Saponin-Puffer | PBS/BSA mit 0,5% (w/v) Saponin |
| Fixierungspuffer | PBS-Puffer mit 4% Paraformaldehyd (w/v), pH 7,0 |

2.2 Geräte

| | |
|----------------------|--|
| Brutschrank: | Heraeus 6000 (Heraeus, Berlin, Deutschland) |
| Mikroskop: | Axiovert (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) |
| Sterile Werkbank: | HERA safe (Heraeus, Hanau, Deutschland) |
| Durchflusszytometer: | FACS Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) FACS Vantage (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) |
| Zentrifugen: | Multifuge 3 S-R (Heraeus, Berlin, Deutschland) Biofuge fresco (Heraeus, Berlin, Deutschland) |

Alle Zentrifugationsschritte wurden zehn Minuten (min) bei 300xg durchgeführt. Eine Ausnahme bildet die PBMC-Isolierung, bei der die Zentrifugationsschritte einzeln aufgeführt sind.

2.3 Zellkulturmedien und Kulturbedingungen

Die Kultivierung der humanen Zellen erfolgte in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (Gibco BRL, Grand Island, USA), mit einer Zugabe von 100U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 0,3mg/ml Glutamin und 5% fötalem Kälberserum (FCS) (PAA, Linz, Österreich). Die Zellen wurden in 48- oder 96-Loch-Zellkulturplatten (Costar, USA) mit rundem Boden und bei 37°C und 5,5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Die 96-Loch-Platten wurden mit Zellophanfolie umwickelt, um die geringen Volumina vor dem Verdunsten zu schützen.

2.4 Antikörper und Microbeads

Unkonjugierte Antikörper oder aus Maus-Hybridom-Kulturüberständen mittels Protein-G Affinitätssäule aufgereinigte Antikörper wurden in unserem Labor mit den Fluorochromen Fluoreszeinisothiocyanat Isomer I (FITC) (Sigma), Phycoerythrin (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) bzw. Cy5 (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA) konjugiert.

Tabelle 2: Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle.

| <i>Spezifität</i> | <i>Klon</i> | <i>Isotyp</i> | <i>Markierung</i> | <i>Hersteller</i> |
|-------------------|-------------|--------------------|-------------------|---------------------------------|
| CD45RO | UHL1 | mIgG ₂ | Pe | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| | UHL1 | mIgG _{2a} | APC | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD45RA | L48 | mIgG ₁ | FITC | BD Biosciences, San Jose, USA |
| CD31 | WM59 | mIgG ₁ | Pe | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| | WM59 | mIgG ₁ | Fitc | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD3 | UCHT1 | mIgG ₁ | ungekoppelt | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD28 | CD28.2 | mIgG ₁ | ungekoppelt | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD4 | TT1 | mIgG ₁ | Cy5 | Hybridomzelllinie/Kopplung DRFZ |
| | SK3 | mIgG ₁ | PerCP | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD7 | M-T701 | mIgG ₁ | FITC | BD Pharmingen, San Jose, USA |

| | | | | |
|--------|------------|--------------------|------|--|
| CD11a | HI111 | mlgG ₁ | FITC | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD26 | M-A261 | mlgG ₁ | FITC | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD27 | 2E4 | mlgG ₁ | Cy5 | von René van Lier zur Verfügung gestellt, Amsterdam, Niederlande |
| CD44 | G44-26 | mlgG _{2b} | FITC | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD45RB | MT4 | mlgG ₁ | FITC | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD62L | Dreg 56 | mlgG ₁ | FITC | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| CD95 | CH-11 | mlgG ₁ | FITC | Coulter Immunotech, Frankreich |
| HLA-DR | L243 | mlgG _{2a} | FITC | BD Pharmingen, San Jose, USA |
| Vβ1 | BL37.2 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ2 | E22E7.2 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ3 | CH92 | mlgM | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ5b | W112 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ5c | LC4 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ8 | 56C5 | mlgG ₂ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ9 | FIN9 | mlgG ₂ | PE | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ10 | C21 | mlgG ₂ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ12.2 | VER2.32.1 | mlgG ₂ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ13.1 | IMMU222 | mlgG ₂ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ13.6 | JU-74 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ14 | CAS1.1.3 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ16 | TAMAYA1 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ17 | E17.5F3.15 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ18 | BA62 | mlgG ₁ | PE | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ20 | ELL1.4 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ21 | IG125 | mlgG ₂ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ22 | IMMU546 | mlgG ₁ | FITC | Beckmann Coulter, Deutschland |
| Vβ23 | AF23 | mlgG ₁ | PE | Beckmann Coulter, Deutschland |

Tabelle 3: Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Zytokine.

| <i>Spezifität</i> | <i>Klon</i> | <i>Isotyp</i> | <i>Markierung</i> | <i>Hersteller</i> |
|-------------------|-------------|--------------------|-------------------|----------------------------------|
| IFN- γ | 4SB3 | mIgG _{2a} | Cy5 | Hybridomzelllinie/ Kopplung DRFZ |
| IL-2 | N748A | mIgG ₁ | FITC | Hybridomzelllinie/ Kopplung DRFZ |
| IL-4 | 4D9 | mIgG ₁ | PE | Hybridomzelllinie/ Kopplung DRFZ |
| IL-13 | JES10-5A2 | mIgG _{2a} | PE | BD Pharmingen, San Jose, USA |

Tabelle 4: Verwendete MultiSortbeads/ Microbeads.

| <i>Spezifität</i> | <i>Klon</i> | <i>Isotyp</i> | <i>Markierung</i> | <i>Hersteller</i> |
|------------------------------|-------------|--------------------|-------------------|------------------------------|
| α CD4 (MultiSort Kit) | SK3 | mIgG ₁ | Multisortbeads | Miltenyi Biotec, Deutschland |
| α CD45RO | -- | mIgG _{2a} | Microbeads | Miltenyi Biotec, Deutschland |
| α -Fitc | -- | mIgG ₁ | Microbeads | Miltenyi Biotec, Deutschland |

2.5 Präparation humaner mononukleärer Zellen

2.5.1 Blutspender

Zur Gewinnung von PBMC wurden Buffy-Coats aus dem Krankenhaus Moabit und Blutfilter aus der Blutspende der Charite von gesunden Spendern verwendet. Die mononukleären Nabelschnurblutzellen wurden aus Nabelschnüren isoliert, die uns vom Virchow-Klinikum überlassen wurden.

2.5.2 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC)/ Isolierung mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut (CBMC)

Periphere mononukleäre Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten durch eine isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Das Blut wurde zu gleichen Teilen mit PBS/BSA-Puffer verdünnt und in 50ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 10 ml Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) geschichtet und bei 800xg 20 min bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte

(1,077g/ml) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen höherer Dichte die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während sich mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) in der Interphase ansammeln. Nach Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen und dreimal mit PBS/BSA gewaschen. Die Zellen wurden in PBS/BSA resuspendiert und bis zur Weiterbehandlung bei 4°C gelagert

2.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Eine Möglichkeit der Zellzählung ist das mikroskopische Auszählen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20µl der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen 0,4%iger Trypanblau-Lösung (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gemischt. Der Farbstoff diffundiert nur durch die Zellmembran der toten Zellen und färbt diese im Zytoplasma blau an. Dadurch können die toten Zellen bei der Zellzahlbestimmung ausgegrenzt werden. 10 µl der Mischung wurden unter das Deckblatt der Zählkammer pipettiert. Ausgezählt wurden vier mal 16 Felder der Neubauer-Kammer mit dem 40er Objektiv des Mikroskops Axiovert (Carl Zeiss, Deutschland). Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu ermitteln, wurde der Mittelwert berechnet und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor und 10^4 multipliziert.

2.6 Polyklonale *in vitro* Th-Zell-Stimulation

Alle *in vitro*-Stimulationen wurden für sechs Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre im Brutschrank durchgeführt.

MACS-isolierte CD4⁺ Th- Zellen oder Subpopulationen dieser Zellen wurden in einer Zellkonzentration von $1-2 \times 10^6$ /ml in RPMI Kulturmedium mit den oben aufgeführten Zusätzen aufgenommen. Zur 6h-Stimulation wurde Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 5ng/ml und Ionomycin, 1µg/ml (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Für die letzten zwei Stunden wurde der Sekretionsinhibitor Brefeldin A, 5µg/ml (Sigma, Deisenhofen) zugegeben.

2.7 Coaten von Zellkulturplatten mit immobilisierten α CD3 und α CD28-Antikörpern

96-, 48- oder 24-Loch-Platten (Costar, Niederlande) wurden mit 50, 100 bzw. 200 μ l/Loch Antikörper/PBS-Lösung über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Hierbei wurde je 1 μ g α CD3- Antikörper und 5 μ g α CD28-Antikörper eingesetzt. Direkt vor Kultivierung der Zellen wurde die Antikörper/PBS-Lösung vorsichtig abpipettiert und die Löcher zwei- dreimal mit PBS gewaschen, um die gelösten Antikörper zu entfernen.

2.8 *in vitro*- Polarisierung von naiven CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen in proinflammatorische Th-Zellen

Sortierte CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen wurden in einer Zellkonzentration von 1-2x10⁶/ml in RPMI Kulturmedium mit den oben aufgeführten Zusätzen aufgenommen und in Anwesenheit von α IL-4 (10 μ g/ml), rIL-2 (20U/ml, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und unterschiedlichen rIL-12-Konzentrationen (0,001ng/ 0,01ng/ 0,1ng; Boehringer Mannheim, Deutschland) in Zellkulturplatten mit zuvor gecoateten immobilisierten α CD3 und α CD28-Antikörpern überführt (Kap.2.7) und fünf Tage kultiviert.

2.9 Quantitative Bestimmung der Zellproliferation

Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) ist ein membrangängiger Farbstoff, der an die freien Amine zytoplasmatischer Proteine bindet und die Zellfunktion nicht beeinträchtigt. Es wird von intrazellulären Esterasen durch Abspaltung zweier Azetatgruppen in das fluoreszente Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt, das weniger membrangängig ist.

CD4⁺ Th-Zellen wurden dreimal in PBS-Puffer bei 300xg und 4°C für 10 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS-Puffer auf eine Konzentration von 1x10⁷ Zellen/ml eingestellt und 1 ml dieser Suspension in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Es folgte die Zugabe von 1 μ l einer 5mM/ml CFDA-SE-Lösung. Die Färbelösung wurde 4 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit RPMI-Medium aufgefüllt und bei 300xg gewaschen. Dieser Waschschrift mit RPMI-Medium wird ein zweites Mal wiederholt, um das freie CFDA-SE vollständig an die Proteine des Mediums zu binden und aus der Zellsuspension

zu entfernen. Anschließend werden die markierten Zellen in Kulturmedium aufgenommen.

2.10 Fixierung von Zellen

Die Fixierung von Zellen durch Formaldehyd erfolgt im wesentlichen durch die Quervernetzung von Proteinen unter Beteiligung der Aldehydgruppen des Formaldehyd. Durch diese Fixierung wird der Proteinstatus der Zelle erhalten und es können so die durch Brefeldin A akkumulierten Zytokine der aktivierten Zellen intrazellulär gefärbt werden.

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen (10 min bei 300xg, 4°C) und anschließend in 2% Formaldehyd/PBS-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen (2×10^6 Zellen/ml) und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zuletzt in PBS/BSA/ NaN_3 resuspendiert. Bis zur Färbung wurden die Zellen bei 4°C aufbewahrt.

2.11 Immunfluoreszenzfärbungen

Zu allen Inkubationen mit Antikörpern wurde Beriglobin mit einer Konzentration von 0,3mg/ml (Aventis, Boehringer, Deutschland) der Suspension zugegeben. Beriglobin blockiert die Fc-Rezeptoren der Zellen und verhindert so unspezifische Antikörperbindungen.

2.11.1 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Die Zellen wurden in PBS/BSA gewaschen und für 10 min bei 4°C in einer Konzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen in der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung besteht aus PBS/BSA, Beriglobin und dem entsprechenden Volumen an Färbantikörpern. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/BSA aufgefüllt und 10 min bei 4°C mit 300xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200-400µl PBS/BSA resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert. Unmittelbar vor der Messung wurde bei der Messung von lebenden Zellen Propidiumjodid (PJ) (0,2-1µg/ml) zugesetzt, um tote Zellen zu markieren. Propidiumjodid diffundiert bei toten Zellen durch die beschädigte Zellmembran und interkaliert mit der DNA-Doppelhelix. Die so markierten toten Zellen können in der durchflusszytometrischen Messung in FL3 analysiert werden.

2.11.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Für intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert (Kap.2.10) und mit Saponin permeabilisiert. Saponin muss bei allen Färbe- und Waschschritten der intrazellulären Färbung anwesend sein, da die Permeabilisierung der Zellmembran durch Saponin reversibel ist. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 0,5% Saponinlösung resuspendiert. Nach wiederholtem Abzentrifugieren wurden die Zellen in der Färbelösung, die Beriglobin und die Färbeantikörper enthält, für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 0,5% Saponinlösung aufgefüllt und bei 300xg gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit PBS/BSA/NaN₃. Die Färbung von Oberflächenantigenen erfolgt vor einer intrazellulären Färbung von Zytokinen.

2.12 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und bis zu fünf weiteren Parametern anhand emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert werden (156). Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert. Die gefärbten Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander einen Laserstrahl. Dabei werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem geringen Winkel (3-10°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet und korreliert in erster Näherung mit der Zellgröße. Das um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (SSC) bezeichnet und korreliert mit der Granularität und der Membranfaltung der Zelle. Das Fluoreszenzlicht von den verschiedenen Fluorochromen wird durch Teilerspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangt dann auf photosensitive Detektoren, sog. Photomultiplier. In der Regel stehen drei Sensoren für 530nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585nm (FL2) und >650nm (FL3) über den ersten Laser zur Verfügung. Über einen zweiten Dioden-Laser kann ein weiterer Fluoreszenzparameter mit einer anderen Anregungswellenlänge zur Verfügung gestellt werden (FL4: 670nm). Nach einer Verstärkung wird das optische Signal zunächst in elektrische Ströme und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt (Abb.5).

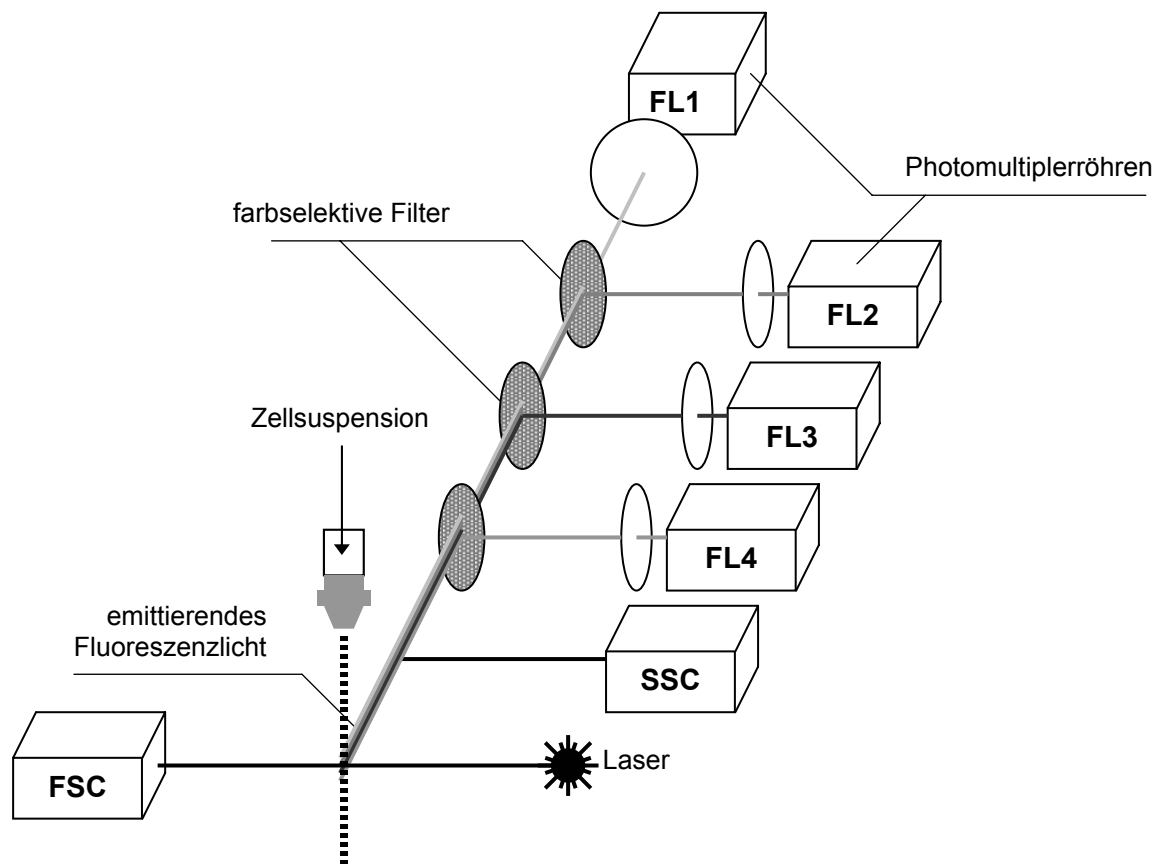


Abbildung 5: Prinzip des Durchflusszytometers.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein FACS Calibur (Becton-Dickinson, San Jose, USA) mit einem 488nm Argonlaser und einem zweiten, roten Dioden-Laser (635nm) verwendet. FSC- und SSC-Signale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Tab.5 zeigt die Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der CellQuest Research Software (Becton-Dickinson, San Jose, USA). Die Daten wurden als zweidimensionale „Punkt-Diagramme“ („dot-plots“) oder als eindimensionale Histogramme dargestellt und analysiert. In den Punktdiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine Zelle. Durch das Setzen von Analysefenstern kann die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt werden.

Tabelle 5: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

| <i>Fluoreszenzkanal</i> | <i>Farbstoff</i> | <i>Absorptions- maximum</i> | <i>Emissions- maximum</i> |
|-------------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|
| FL1 | Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) | 495nm | 519nm |
| FL2 | R-Phycoerythrin (PE) | 480nm/565nm | 578nm |
| FL3 | Peridinin-Chlorophyll-a (PerCP) Propidiumjodid (PJ) | 536nm 536nm | 617nm 617nm |
| FL4 | Allophycocyanin (APC) Cy5 | 650nm 650nm | 660nm 666nm |

2.13 Methoden der Zelltrennung

Zur Isolierung von definierten Zelltypen aus einer gemischten Zellpopulation wurde die Methode der magnetischen Zellseparation (MACS: Magnetic Cell Separation) und die Methode der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting) angewendet.

2.13.1 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Bei dieser Trennmethode werden die Zellen über monoklonale Antikörper direkt oder indirekt mit superparamagnetischen Mikropartikeln (Durchmesser ca. 100 nm) markiert. Die Zellsuspension mit spezifisch markierten Zellen und unmarkierten Zellen wird über eine Trennsäule gegeben, die sich in einem Permanentmagnetfeld befindet. Die Trennsäulen besitzen eine Matrix aus Stahlwolle oder eisenmagnetischen Kugeln. Die unmarkierten Zellen durchlaufen die Säule im Hochgradientenfeld, die markierten Zellen bleiben an den Trennsäule hängen und können anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden (Abb.6). Das MACS-System kann zur Anreicherung oder zum Ausschluss (Depletion) einer Zellpopulation aus einer Gesamtpopulation eingesetzt werden. Die Isolationen wurden gemäß den Herstellerprotokollen für die konjugierten Antikörper, Isolations-Kits und MACS-Säulen (Miltenyi Biotec, Deutschland) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden VS⁺-Säulen (Kapazität 1x10⁸ Zellen) und MS⁺-Säulen (Kapazität 1x10⁷ Zellen) verwendet.

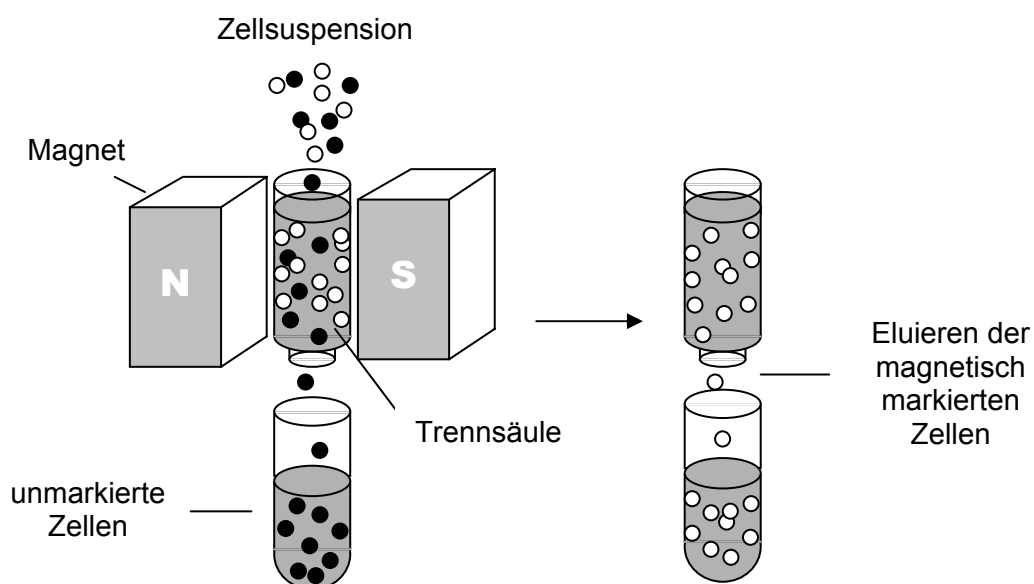


Abbildung 6: Prinzip der magnetischen Zellseparation.

2.13.1.1 Isolierung von CD4⁺ Th-Zellen

Zur Isolierung von CD4⁺ Th-Zellen wurden PBMC mit magnetisch markierten anti-CD4-Antikörpern (CD4 Multisort Kit, Miltenyi Biotec, Deutschland) 15 min bei 4-8°C inkubiert, dann mit PBS-BSA gewaschen, in PBS-BSA resuspendiert und in VS⁺ MACS-Säulen im MidiMACS-System separiert. Die Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden zuvor zweimal mit 1ml entgastem PBS-BSA gespült. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurden die CD4⁺ Th-Zellen mit 3ml PBS/BSA-Puffer eluiert und die magnetische Markierung durch Inkubation mit Release-Reagent (CD4 Multisort Kit, Miltenyi Biotec, Deutschland) von den Antikörpern abgetrennt. Da auch Monozyten das CD4-Molekül ausprägen wurden die angereicherten CD4-exprimierenden Zellen mit magnetisch konjugierten anti-CD14-Antikörpern markiert und im magnetischen Feld depletiert. Zellaliquots der unsortierten, negativen und positiven Fraktionen wurden mit Antikörpern gegen CD4 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Analog dem ersten Anreicherungsschritt folgte ein weiterer, um die Reinheit der magnetisch markierten Zellen zu erhöhen.

2.13.1.2 Isolierung von naiven CD45RA⁺ Th-Zellen und Antigen-erfahrenen CD45RO⁺ Th-Zellen

Zur Isolierung der CD45RA⁺ Th-Zellen und Antigen-erfahrenen CD45RO⁺ Th-Zellen wurden isolierte CD4⁺ Th-Zellen mit magnetisch markierten anti-CD45RO-Antikörpern (Miltenyi Biotec, Deutschland) inkubiert und in VS⁺ MACS-Säulen im MidiMACS-System separiert. Die CD45RA⁺ Th-Zellen durchlaufen die Säule (Negativfraktion), die magnetisch markierten CD45RO⁺ Zellen werden nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld mit 3ml PBS/BSA-Puffer eluiert. Zur Kontrolle der Sortierung wurden die Zellfraktionen mit Antikörpern gegen CD4, CD45RA und CD45RO markiert und im Durchflusszytometer analysiert.

2.13.1.3 Separation von naiven CD31⁺ und CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen

CD45RA⁺ Th-Zellen wurden wie in Kap. 2.13.1.1 und 2.13.1.2 beschrieben isoliert, mit Fitc-gekoppeltem α CD31 markiert (10 min, 4-8°C) und anschließend mit magnetischen α -Fitc-Partikeln inkubiert. Die somit indirekt mit Microbeads markierten CD45RA⁺ Th-Zellen wurden dann zweimal über eine VS⁺-Säule magnetisch getrennt. Zellaliquots der positiven (CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen) und negativen Fraktion (CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen) wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD45RA, CD45RO und CD31 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

2.13.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Bei dieser Methode wird eine Zellsuspension, die mit fluoreszenten Antikörpern gefärbte Zellen enthält, mit Druckluft durch einen Schlauch und ein Metallröhrchen in eine Düse gepresst, gleichzeitig wird von der Seite eine isotone Trägerflüssigkeit zugeführt. Innerhalb der Düse werden die Zellen enorm beschleunigt (bis zu 10000g), beim Austritt aus der Düse beträgt die Geschwindigkeit der Zellen ca. 9m/s. Unterhalb der Düsenöffnung trifft der Flüssigkeitsstrahl auf einen fokussierten Laserstrahl. Die den Laserstrahl passierenden Zellen streuen das Laserlicht in verschiedenen Richtungen, die Fluoreszenz-markierten Zellen emittieren zusätzlich Fluoreszenzlicht. In Richtung des Laserstrahls wird mit einem Lichtsensor das Vorwärtsstreulicht (Maß für die Größe der Zellen) gemessen. Vom Mikroskopobjektiv hinter der Düse wird das Seitwärtsstreulicht (Maß für die Granularität) und das emittierte Fluoreszenzlicht (spezifisch für die verwendeten Fluorochrome)

aufgefangen, durch einen optischen Interferenzfilter nach Wellenlängen getrennt und von Lichtsensoren gemessen. Die verschiedenen Signale einer Zelle werden elektronisch weiterverarbeitet und graphisch in „dot-plots“ dargestellt. Durch das Setzen von Regionen innerhalb der „dot-plots“ können markierte Zellen abgelenkt werden. Am Abrisspunkt bricht der Flüssigkeitsstrahl in Tröpfchen auf. Dabei werden Tröpfchen von Zellen, die isoliert werden sollen, mit einer elektrischen Ladung versehen und beim Durchfliegen des elektrischen Feldes zwischen den geladenen Ablenkplatten in Auffangröhrchen abgelenkt (Abb.7). Die Isolierung der Th-Zellpopulationen wurde am FACS Vantage (Becton-Dickinson) durchgeführt, die Reanalyse der isolierten Zellen erfolgte am FACS Calibur (Becton-Dickinson).

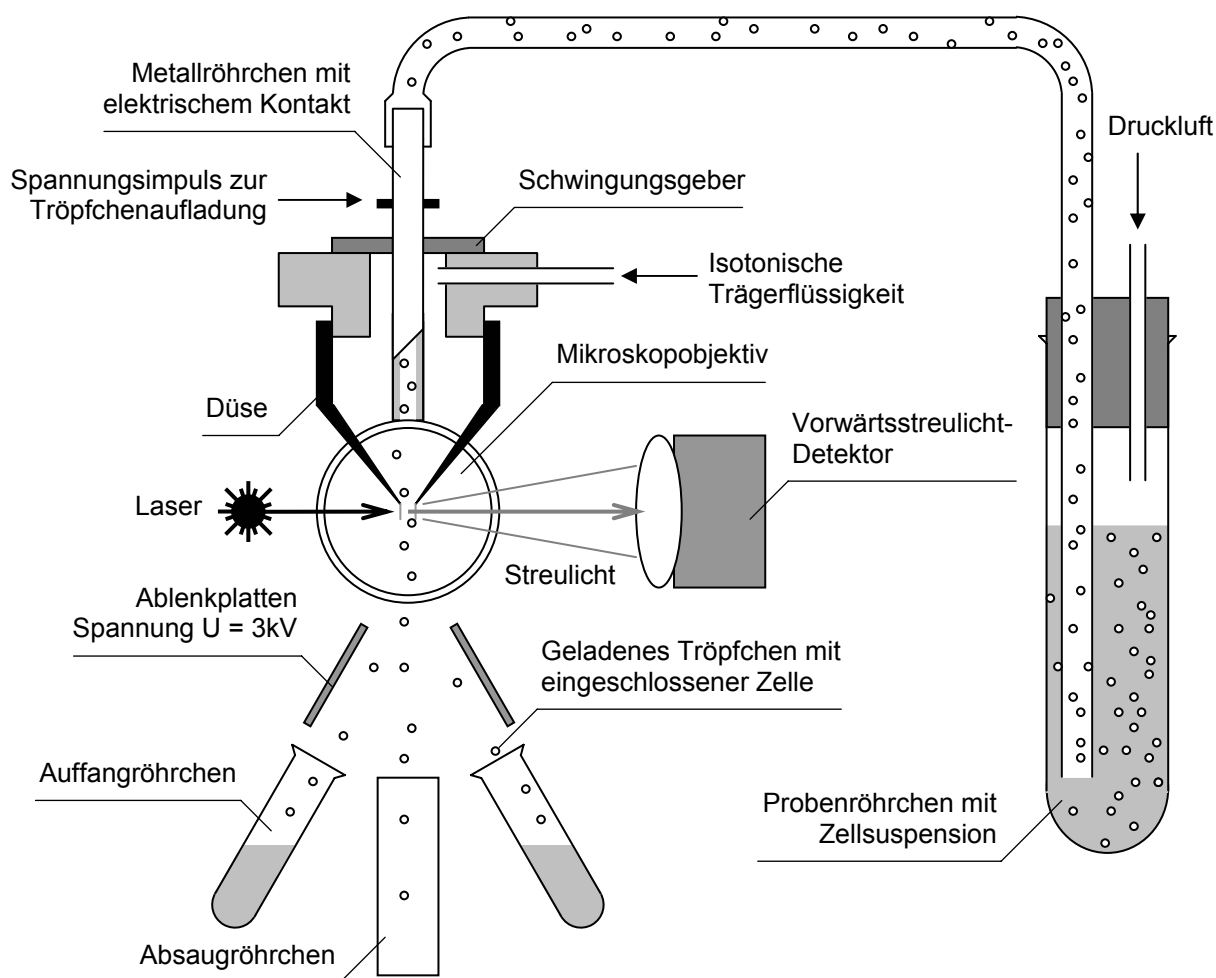


Abbildung 7: Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung.

2.14 Quantifizierung von TRECs durch real time PCR

Das Prinzip der hier verwendeten Technik beruht auf der Verbindung einer Standard-PCR mit einer fluoreszierenden Sonde, deren Fluoreszenz erst nach spezifischer Bindung innerhalb des PCR-Produkts freigesetzt wird. Die Sonde enthält am 5'-Ende einen „reporter“- Farbstoff (6FAM) und am 3'-Ende einen „quencher“- Farbstoff (TAMRA). Die „reporter“- Fluoreszenz der Sonde wird durch den „quencher“- unterdrückt. Während der Polymerisation wird die Sonde durch die Taq-DNA-Polymerase geschnitten. Dies führt zur Separation des „quenchers“ vom „reporter“- Farbstoff, so dass das Fluoreszenzsignal des „reporter“- Farbstoffs detektierbar wird. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge der vorhandenen *target* DNA und ermöglicht hierdurch quantitative Aussagen über die eingesetzte DNA-Menge.

Um die genaue Frequenz der TREC⁺ Zellen zu bestimmen wurde ein Duplex-Vektor konstruiert, der ein Fragment des δ Rec- ψ J α -signal joint (TREC) und ein Fragment des RAG2-Gens als Referenzgen enthält. Zuerst wurde das RAG2-Fragment in die T-A acceptor site, anschließend das TREC-Fragment in die EcoRV restriction site des TOPOTA Vektors (Invitrogen) kloniert. Die DNA- Konzentrationen wurden durch Spektrophotometrie bestimmt und durch quantitative Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden Verdünnungsreihen des Vektors von 10^7 bis 10^1 Kopien erstellt. Das Gesamtvolumen der PCR betrug 50 μ l und enthielt 100ng genomische DNA, 25pmol 5'-Primer, 25pmol 3'-Primer, je10nmol der vier verschieden dNTPs (PerkinElmer), 1,25U Platinium Taq Polymerase (Life Technologies), 5pmol der 6FAM-TAMRA-Sonde und PCR-Puffer mit 4,5mM MgCl₂. Nach 5 min Denaturierung bei 95°C wurden 45 Zyklen bei 95°C (30 sec) und 66°C (30 sec) durchgeführt. Zur TREC-Analyse wurden folgende Sonde und Primer verwendet:

TREC-Sonde: 6FAM-CCA CAT CCC TTTCAA CCA TGC TGA TGA CAC CTC T-TAMRA. 5'-Primer ψ J α (-258): AAC AGC CTT TGG GAC ACT ATC G und 3'-Primer δ Recsj (+104): AACAGC CTT TGG GAC ACT ATC G. Diese Primer amplifizieren ein TREC-spezifisches 208 Basenpaar-langes Fragment, welches nur entsteht wenn sich die Enden des deletierten δ -locus zum episomalen zirkulären DNA-Fragment zusammenschließen (signal joint TREC) (Abb.4). Für die RAG2-Analyse wurden folgende Sonde und Primer eingesetzt: RAG2-Sonde: 6FAM-CCC CTG GAT CTT CTG TTG ATG TTT GAC TGT TTG TGA-TAMRA, 5'-Primer RAG2(2160) GCA ACA

TGG GAA ATG GAA CTG und 3'Primer: RAG2(2404) GGT GTC AAA TTC ATC ATC ACC ATC. Die Analysen wurden am ABI PRISM 7700 Sequence Detector TaqMan (PE Biosystems) durchgeführt.

2.15 cRNA-Präparation und DNA-Microarray

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden wurden im Rahmen einer Kooperation von Dr. Michael Janitz am Max-Planck-Institut für Genetik in Berlin durchgeführt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels der Affymetrix Software Version 5.0 in Zusammenarbeit mit Dr. Birgit Oppmann (Arbeitsgruppe Thiel, DRFZ) und Dr. Joachim Grün (Arbeitsgruppe Baumgrass, DFRZ).

Die GeneChip®-Technologie (Affymetrix, Santa Clara, USA) ermöglicht Genexpressionsstudien von gleichzeitig mehreren Tausend Genen und beruht auf dem Prinzip der Hybridisierung des cRNA- *Targets* mit Oligonukleotiden, die auf einer Quarzoberfläche fixiert sind (Abb.9). Bei der Herstellung von DNA-Microarrays werden durch die Kombination von chemischer Festphasensynthese mit photolithographischen Fabrikationstechniken auf einem Glasträger, der in winzige Zellen unterteilt ist, Oligonukleotide (25mere) definierter Sequenz synthetisiert (101). Jede Zelle enthält mehrere Millionen identische Oligonukleotide, die als Sonden zur Detektion Fluoreszenz-markierter Nucleinsäuren dienen.

Die GeneChip®-Analysen wurden unter der Verwendung der Chipserie Affymetrix HG_U95Av2 durchgeführt. Dieser Chip umfasst insgesamt 12.625 Gene des Menschen, von denen die Mehrheit in der *human UniGene database* beschrieben sind. Einige sind sog. *expressed sequence tags* (ESTs), d.h. DNA-Sequenzen, denen noch keine Funktion, d.h. kein Protein zugeordnet werden konnte. Bei ESTs ist jedoch anzunehmen, dass sie Bestandteil von Genen sind. Einige der Gene sind mehrfach auf dem Microarray repräsentiert. Jedem Gen sind auf dem Chip in der Regel 32 Zellen zugeordnet. 16 dieser 32 Zellen enthalten Sonden, die zu einem bestimmten Bereich des jeweiligen Gens vollständig komplementär sind. Dies ermöglicht eine optimale Hybridisierung von Sonde und cRNA (engl. perfect match, PM). Die restlichen 16 Zellen enthalten Oligonukleotide, die mit den komplementären Sonden bis auf eine ausgetauschte Base identisch sind. Somit kommt es an einer Position zu einer Fehlpaarung zwischen Sonde und cRNA (engl. mismatch, MM) und folglich zu keiner oder einer wesentlich schwächeren Bindung. Die Relation der PM-Signale zu den MM-Signalen ist ein Maß für die Spezifität der Hybridisierung (Abb.8).

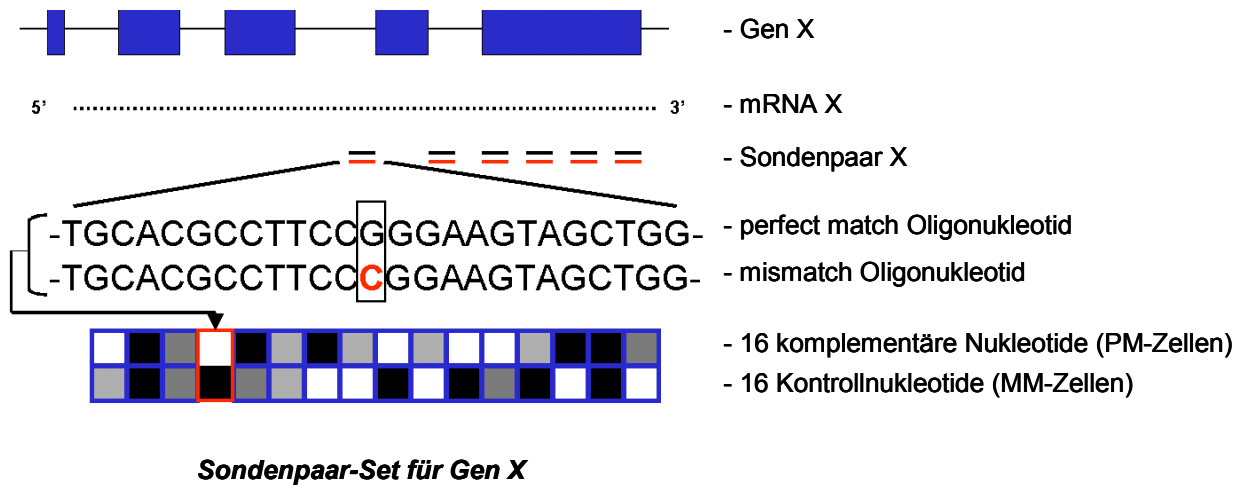


Abbildung 8: Schematische Darstellung des PM-MM-Prinzips der Affymetrix-Technologie.

PM: perfect match, MM: mismatch

2.15.1 cRNA-Präparation

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellpellets der CD31⁺ CD45RA⁺ Th-Zellen, CD31⁻ CD45RA⁺ Th-Zellen und CD45RO⁺ Th-Zellen erfolgte unter Verwendung von RNeasy-spin-columns des Rneasy Mini Kit (Quiagen). Die Poly (A)⁺mRNA wurde aus den Gesamt-RNA-Pools der gleichen Th-Zelltypen unter Verwendung von Oligotex mRNA Kit (Quiagen) isoliert.

Die Herstellung der cRNA erfolgt in mehreren Schritten (Abb.9). Die mRNA's dienen als Matrize zur Erststrang cDNA-Synthese. Diese Synthese erfolgt ausgehend von T7T24 Primern (Konstrukte aus T7-Promotor und 24mer-Oligo-dT:5'-GGCCAGTGAATTGTAATCGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄-3') und wird durch 20U/μl SuperScript II reverse Transkriptase (Invitrogen) katalysiert. Die Reaktion wird zuerst bei 50°C für 65 min und anschließend bei 16°C für 150 min durchgeführt. Somit entstehen RNA-DNA-Hybridmoleküle. Bei der Synthese des zweiten Stranges wird folgendes Enzymgemisch eingesetzt: 13,3U/ml E.coli RNase H, 66,U/ml E.coli DNA-Ligase und 266,7U/ml E.coli DNA-Polymerase-I (SuperScript II Kit, Invitrogen). Während der Inkubation von 2 h bei 16°C folgt dem Rnase H Verdau der gleichzeitige Abbau der RNA und Aufbau des zweiten komplementären cDNA-Stranges durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase-I. Die DNA-Ligase verknüpft die Fragmente des zweiten Stranges, so dass doppelsträngige cDNA entsteht, die an einem Ende den T7-Promotor trägt.

Durch die Zugabe von 33,3U/ml T4-Polymerase (5min 16°C) werden eventuell vorhandene einzelsträngige Enden der cDNA aufgefüllt („Polishing“). Anschließend wird die cDNA aufgereinigt und in einer *in vitro* Transkription mit markierten Ribonukleotiden (UTP's, CTP's) (BioArray HighYield Transcription Labeling Kit, Enzo) in biotinylierte cRNA umgeschrieben. Diese Transkriptionsreaktion (8h, 37°C) wird von der T7 RNA-Polymerase katalysiert. Die cRNA wird anschließend aufgereinigt und durch Inkubation (35min, 94°C) in Magnesiumacetat-haltigem Puffer fragmentiert.

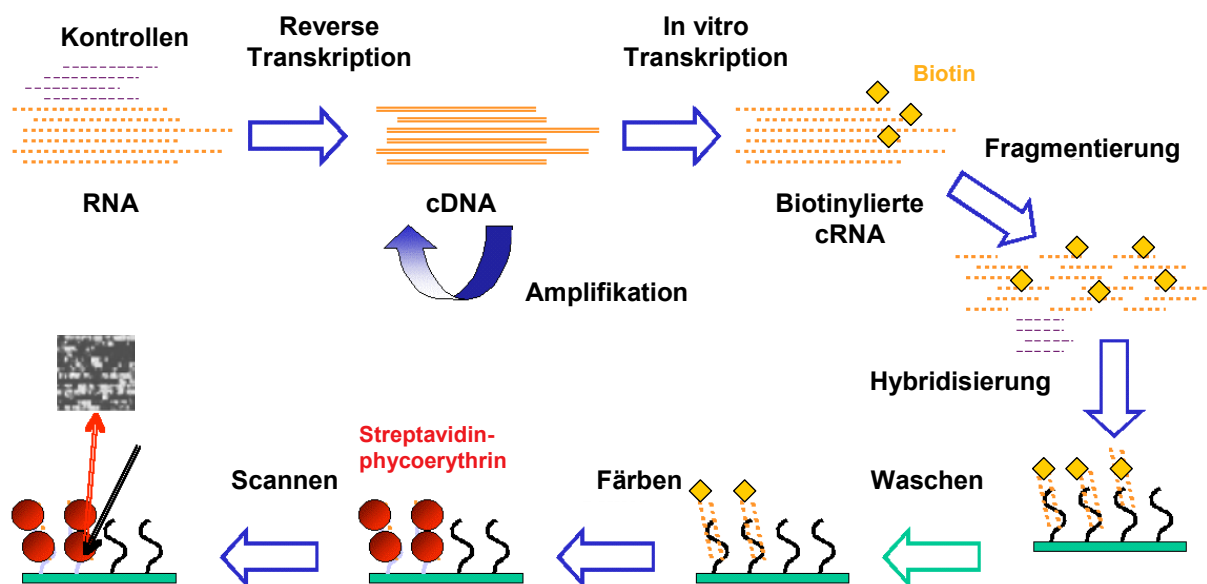


Abbildung 9: Prinzip der Affymetrix-Technologie

2.15.2 Hybridisierung und Analyse

Nach Fragmentierung wird die markierte cRNA mit den Oligonukleotiden auf den Chips in einem speziellen Hybridisierungsofen (GeneChip Hybridization Oven, Affymetrix) hybridisiert (16h, 45°C). Hierfür wird folgender Hybridisierungsmix hergestellt, für 5 min auf 99°C erhitzt und auf den Chip gegeben: Fragmentierte cRNA (0,05µg/µl), Kontrolloligonukleotide B2 (50pM), Eukaryotische Hybridisierungskontrollen (BioB: 1,5pM, BioC: 5pM, BioD: 25pM, cre: 100pM), Heringssperma DNA (0,1mg/ml), Acetyliertes BSA (0,5mg/ml) und Hybridisierungspuffer (1x) (Affymetrix). Nach der Hybridisierung wird der Chip bei 25°C mit nicht stringentem Puffer (6x SSPE, 0,01% Tween20, 0,005% Antifoam) und anschließend bei 50°C mit

stringentem Puffer gewaschen (100mM MES, 0,1M NaCl, 0,01% Tween20), mit 10µg/ml Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin in Färbepuffer gefärbt (10 min 25°C) und nochmals mit nicht-stringentem Puffer gewaschen. Danach erfolgt das Scannen der hybridisierten und gefärbten Chips mit Hilfe des GeneArray Scanners (Hewlett-Packard). PE wird durch einen Laser der Wellenlänge 488nm zur Fluoreszenz angeregt, der Scanner detektiert das emittierte Licht bei 570nm mit einer Auflösung von 3µm. Die Stärke des detektierten Lichtsignals ist abhängig von der Spezifität der Bindung der cRNA an die Sonde und kann deshalb zur Bestimmung und Berechnung des Transkriptionslevels herangezogen werden.

2.15.3 Auswertung der Messdaten

Die durch den Scanner ermittelten Messdaten werden zunächst als Bilddateien gespeichert. Anschließend werden die Fluoreszenzen der einzelnen Chips auf die durchschnittliche Fluoreszenz angeglichen (normalisiert). Ein Gitternetz, das über die Abbildung des Microarrays gelegt wird, ermöglicht die Definition der einzelnen Zellen. Auf der Grundlage komplexer Algorithmen berechnet das Auswertungsprogramm (Affymetrix Software Version 5.0) Parameter, die eine Beurteilung der Messdaten gestatten. Im Folgenden sind einige dieser Parameter aufgeführt, eine ausführliche Beschreibung ist im Statistical Algorithms Description Document (Affymetrix) oder im Affymetrix Data Mining Tool User's Guide aufgeführt.

Aus den Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Pixel für jede Zelle (8x8 Pixel) wird eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität ermittelt. Im Anschluss wird von allen, einem Gen zugehörigen PM-MM-Paaren (in der Regel 2x 16 Zellen), ein Vergleich aufgestellt. Durch das Verhältnis des PM-Signals zum MM-Signal wird zunächst bestimmt, ob ein PM-MM-Paar als *Positiv* oder *Negativ* anzusehen ist. Anschließend wird aus diesen Werten das Verhältnis positiver zu negativer Zellen berechnet (*Pos/Neg Ratio*). Die sog. *Average Difference (Avg Diff)* ist ein relatives Maß für den Expressionsgrad eines Gens und wird durch die durchschnittliche Differenz der *Average Intensities* von PM-MM-Paaren berechnet. Sie stellt somit die zusammenfassende Beurteilung aller Zellen eines Gens dar:

$$\text{Avg Diff} = \sum (\text{PM-MM}) / (\text{Anzahl der Paare})$$

Das Verhältnis der *Average Intensities* der PM-MM-Paare ist auch die Grundlage der Berechnung des *Absolut Call*, der über eine sog. Entscheidungsmatrix bestimmt wird. Dieser Wert gibt an, ob ein bestimmtes Transkript auf dem Chip hybridisiert ist oder nicht und definiert somit ein Gen als *Present* (P) (= detektierbar), *Marginal* (M) (= Grenzwert) oder *Absent* (A) (= nicht detektierbar).

Bei einer vergleichenden Analyse werden die Messdaten eines Chips als Basislinie definiert und die Werte eines zweiten Chips (experimenteller Chip) als Differenz zur Basislinie berechnet. Auch hier wird mit Hilfe einer Entscheidungsmatrix ein sog. *Difference Call* ermittelt. Die Expression eines Gens im experimentellen Chip kann im Vergleich zur Basislinie einen *Increase* (I) (= Zunahme), *Marginally Increase* (MI) (= Grenzwert Zunahme), *Marginally Decrease* (MD) (= Grenzwert Abnahme), oder *Decrease* (D) (= Abnahme) aufweisen. Ist keine Veränderung der Genexpression erkennbar, wird dies durch *No Change* (NC) (= keine Änderung) angegeben.

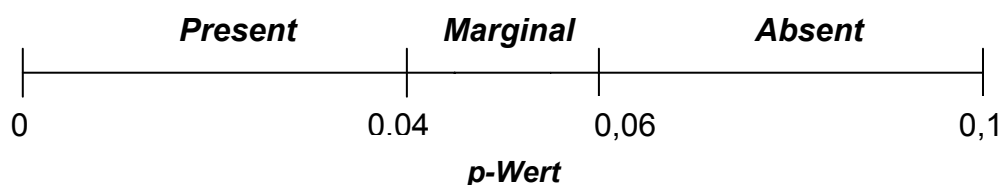
Der *Fold Change* (= x-fache Änderung) stellt eine quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen dar. Dieser Wert ist positiv, wenn die Transkription eines Gens im experimentellen Chip gegenüber dem Basis-Chip erhöht ist bzw. negativ wenn die Transkription eines Gens im experimentellen Chip gegenüber dem Basis-Chip geringer ist. Der *Fold Change* wird auf der Grundlage der *Average Difference Change* berechnet, die wie folgt definiert sind:

$$\text{Avg Diff Change} = \text{Avg Diff}_{\text{exp}} - \text{Avg Diff}_{\text{basis}}$$

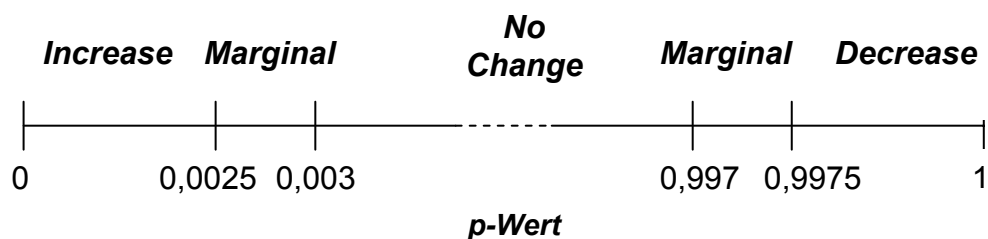
Im Folgenden sind die in der Kopfzeile der Tabellen aufgeführten Begriffe definiert:

| | |
|-----------------|---|
| Signal: | normalisiertes Expressionssignal, Maß für den Expressionsgrad eines Gens |
| Detection Call: | gibt an, ob ein bestimmtes Transkript <i>Present</i> (P) oder <i>Absent</i> (A) ist |
| Change Call: | gibt die Expressionsänderung eines bestimmten Transkripts auf dem experimentellen Chip im Vergleich zur Basislinie an: <i>Increase</i> (I), <i>Decrease</i> (D), <i>Marginally Increase</i> (MI) oder <i>Marginally Decrease</i> (MD) |
| Fold Change: | quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpressionen |

Die Wahrscheinlichkeit/Zuverlässigkeit des *Detection Calls* wird durch den p-Wert angegeben. Die Ausschlussgrenze für *Present*, *Marginal* und *Absent* sind von Affymetrix folgendermaßen definiert:



Die Wahrscheinlichkeit/Zuverlässigkeit des *Change Call* von differentiell exprimierten Genen wird durch den *Change p-value* (p-Wert des Vergleichs) angegeben. Die Ausschlussgrenzen von Affymetrix für *Increase*, *Marginally Increase*, *Marginally Decrease*, *Decrease* und *No Change* sind folgendermaßen definiert:



Die Zuverlässigkeit einer relevante Zunahme differentiell exprimierter Gene erhöht sich, je mehr sich der *Change p-value* gegen 0 nähert. Die Wahrscheinlichkeit einer relevanten Abnahme steigt, wenn der p-Wert sich der 1 nähert.

2.16 Statistik

Linearer Korrelationskoeffizient r (nach Pearson)

Der Korrelationskoeffizient r ist ein Maß für die Stärke des linearen Zusammenhanges. Ist der Zusammenhang deutlich, so ist es durchaus möglich die Regressionsgerade in die Punktwolke zu legen. r beschreibt, wie gut die Punkte sich der Geraden annähern.

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum(y_i - \bar{y})^2}}$$

Für r gilt $-1 \leq r \leq +1$. Ist $r > 0$ handelt es sich um eine positive Korrelation (Regressionsgerade mit positiver Steigung), ist $r < 0$ handelt es sich um eine negative Korrelation (Regressionsgerade mit negativer Steigung). Je näher der Betrag von r ($|r|$) bei 1 liegt, desto stärker ist der Zusammenhang und desto dichter liegen die Punkte (x_i / y_i) an der Regressionsgeraden. Je näher der Betrag von r bei 0 liegt, desto weiter ist die Punktwolke um die Regressionsgerade gestreut und desto schwächer ist der Zusammenhang ($|r| \leq 0,2$ keine statistische Bedeutung, $0,2 < |r| \leq 0,4$ schwache Korrelation, $0,4 < |r| \leq 0,75$ mittlere Korrelation, $|r| > 0,75$ starke Korrelation).