

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Pufferlösungen

Es werden zunächst die häufig verwendeten Geräte, sowie die Rezepte der verwendeten Pufferlösungen aufgeführt. Die in den einzelnen Versuchsanordnungen verwendeten Materialien werden bei den jeweiligen Methoden beschrieben.

Tabelle 2.1: Geräte und Einmalgefäße

| Gerät | Bezeichnung | Firma |
|---|------------------|------------------------------|
| Sterile Werkbank | HERA safe | Heraeus, Hanau |
| CO ₂ -Inkubator | Heraeus 6000 | Heraeus, Berlin |
| Zentrifugen | Multifuge 3 S-R | Heraeus, Berlin |
| | Biofuge fresco | Heraeus, Berlin |
| Pipetierhilfe | Pipetboy | Integra Bioscience, Fernwald |
| Pipetten | 20, 200, 1000 µl | Gilson, Langenfeld |
| Vakuumpumpe | | Neuberger, Freiburg |
| Mikroskop | Axiovert | Carl Zeiss, Göttingen |
| Durchflusszytometer | FACS Calibur | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| Konische Polypropylen-Röhrchen (Schraubdeckelröhrchen) | 15 und 50 ml | Sarstedt, Nümbrecht |
| Polypropylen-Reaktionsgefäße | 1,5 ml | Eppendorf, Hamburg |

Tabelle 2.2: Pufferlösungen

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|--|
| PBS, pH 7,2-7,4 (Phosphat- gepufferte Saline) | 2,7 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat 137 mM Natriumchlorid 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat |
| PBS/BSA (PBS mit 0,5% (w/v) bovinem Serumalbumin) | 5 g/l bovines Serumalbumin in PBS |
| PBS/BSA/Azid | 0,01 % Natriumazid (NaH ₃) in PBS/BSA |
| Saponinlösung | PBS/BSA mit 0,5 % (w/v) Saponin |
| Fixierungspuffer | PBS mit 4 % Paraformaldehyd (w/v), pH 7,0 |

2.2 Blutspender und Blutabnahme

Zur Isolierung von mononukleären Zellen wurde gesunden Spendern und SLE-Patienten nach deren Zustimmung jeweils 30 bis 50 ml Blut in Natrium-heparinisierten Röhrchen des Vacutainer-Systems (*Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA*) oder in Ammonium-heparinisierten Monovetten (*Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland*) abgenommen. Zur Gewinnung von autologem Serum wurden zusätzlich 10 ml Blut in einem Serumröhrchen des jeweiligen Systems abgenommen. Jeweils 500 µl Serum wurden für die spätere Testung auf Anti-Nukleosomen-Antikörper mittels ELISA tief gefroren bei -20°C. Der Nukleosomen-ELISA wurde durchgeführt wie beschrieben unter *Bruns et al. 2000*.

Die Patienten erfüllten die revidierten ACR-Kriterien für den systemischen Lupus erythematoses (*Hochberg, 1997*). Die Blutproben wurden von der rheumatologischen Bettenstation und der rheumatologischen Poliklinik der Charité, sowie von der Rheumaklinik Berlin Buch zur Verfügung gestellt. Die gesunden Spender rekrutierten sich aus Labor- und Klinikpersonal und aus nicht medizinisch tätigen Personen. Weitere Informationen zu den Blutspendern sind in Tabelle 2.3 und 2.4 aufgeführt. Für die Vorversuche wurde gespendetes Blut von Laborpersonal und von SLE-Patienten der rheumatologischen Klinik der Charité verwendet.

Tabelle 2.3: Grund- und klinische Daten der SLE-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme

| SLE-Patienten | n = 14 | |
|--|------------------------|--------------|
| Alter in Jahren | Median | 37 (21 – 65) |
| Geschlecht | weiblich | 13 |
| | männlich | 1 |
| Mittlere Krankheitsaktivität | ECLAM | 6,00 (2,73) |
| Mittelwert (Standardabweichung) | SLAM | 9,71 (4,93) |
| | SLEDAI | 10,29 (5,69) |
| Medikation (teilweise Mehrfachmedikation) | keine Immunsuppressiva | 2 |
| | Glukokortikoide | 11 |
| | Chloroquin | 1 |
| | Azathioprin | 4 |
| | Cyclophosphamid | 2 |
| | Ciclosporin | 2 |
| | Mycophenolat | 1 |

Tabelle 2.4: Grunddaten der gesunden Spender

| Kontrollpersonen | n = 10 | |
|--|---------------|--------------|
| Alter in Jahren | Median | 25 (24 – 34) |
| Geschlecht | weiblich | 9 |
| | männlich | 1 |
| Arbeit in immunologischem Labor zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder früher | ja | 6 |
| | nein | 4 |

2.3 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Mononukleäre Zellen (B- und T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen und Monozyten) können mit Hilfe eines Sucrose-Polymers als Trägersubstanz (Ficoll-PaqueTM PLUS, Amersham Biotech, Upsala, Sweden) mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut isoliert werden. Die Dichte der Trägersubstanz ist dabei so gewählt, dass bei der Zentrifugation Erythrozytenaggregate und tote Zellen zu Boden sinken, Granulozyten in der Ficoll-Phase schweben, während sich PBMC und Thrombozyten aufgrund ihrer niedrigeren Dichte in der Interphase zwischen Ficoll und Blutplasma ansammeln.

Für diesen Trennvorgang wurde heparinisiertes Blut von gesunden Spendern oder SLE-Patienten im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt, in einem Schraubdeckelröhrchen bis zu 30 ml des Gemisches auf 12,5 ml Ficoll geschichtet und bei 800 x g und Raumtemperatur 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMC enthaltende Interphase wurde in ein neues Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und bei 400 x g und 4°C 10 min mit Bremse zentrifugiert. Dieser Vorgang wird im weiteren Verlauf als „Waschen“ bezeichnet. Das nach Absaugen und Verwerfen des Überstands verbleibende Zellpellet wurde resuspendiert und erneut mit Puffer aufgefüllt und bei 300 x g und 4°C 15 min zentrifugiert. Die Zellen wurden danach in einem definierten Volumen PBS aufgenommen. Das Waschen diente der Entfernung des restlichen Ficolls und der Reduktion der Thrombozyten, die sich bei niedrigerer Drehzahl nicht im Zellpellet absetzen. Im Gegensatz zu gängigen Protokollen wurde auf BSA als Zusatz zur Pufferlösung bei den Waschschrritten verzichtet, da das Albumin die anschließende Markierung mit CFDA-SE (s. u.) behindert hätte.

2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzählung zur Einstellung einer gewünschten Zellkonzentration während eines Färbevorgangs und während der Kultivierung erfolgte durch Auszählung in der Neugebauer-Zählkammer. Tote Zellen wurden dabei durch den Farbstoff Trypanblau angefärbt und von der Zählung ausgeschlossen.

20 μl der vorhandenen Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4-prozentigen Trypanblau-Lösung (*SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland*) gemischt. Anschließend wurden 10 μl dieser Mischung zwischen Kammer und Deckglas pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden 4 große (= 16 kleine) Felder ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Ein großes Feld enthält ein Volumen von 0,1 μl . Die Zellzahl pro ml Flüssigkeit errechnet sich daher durch Multiplikation mit 10^4 .

2.5 Markierung von lebenden mononukleären Zellen mit 5- (und 6-) Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester

Carboxyfluoreszeindiazetat-Succinimidylester (CFDA-SE) ist eine membrangängige Substanz, die intrazellulär nach Abspaltung der Diazetatgruppe (Carboxyfluoreszein-Succinimidylester, CFSE) ihre Permeabilität verliert, fluoreszierend wird und über die Estergruppe kovalent an zytoplasmatische Proteine bindet, ohne dabei Zellfunktionen wesentlich zu beeinträchtigen, wenn eine bestimmte Konzentration bei der Färbung nicht überschritten wird. (*Lyons 1994, Mannering 2003a*).

Zur einheitlichen Markierung mit CFSE wurden die in PBS suspendierten PBMC bei einer Zellkonzentration von $1 \times 10^7/\text{ml}$ für 4 min im Dunkeln bei Raumtemperatur mit CFDA-SE, (*Molecular Probes, Leiden, Niederlande*) inkubiert. Die Färbekonzentration betrug dabei – nach Austestung von 0,05 bis 1 μM (vgl. Kap. 3.1.2) – immer 0,25 μM . Um zu gewährleisten, dass alle Zellen gleichmäßig mit dem Farbstoff in Kontakt kamen, wurde eine doppelt konzentrierte Zellsuspension ($2 \times 10^7/\text{ml}$) in das gleiche Volumen einer doppelt konzentrierten Färbelösung (0,5 μM) gegeben und gut gemischt. Die Färbereaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS/BSA gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen in Zellkulturmedium (s.u.) aufgenommen.

2.6 Zellkulturmedien und -bedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (*Gibco BRL, Grand Island, USA*), ergänzt durch Zugabe von 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 0,3 mg/ml Glutamin (*alle drei Zusätze PAA, Linz, Österreich*) und 10 % Serum. Je nach Versuchsanordnung wurde als Serumzusatz fetales Kälberserum (FCS, *PAA, Linz, Österreich*), humanes Serum der Blutgruppe AB (ABS, *Sigma, Deisenhofen, Deutschland*) oder autologes Serum der Spender der PBMC (AS) verwendet. Letzteres wurde durch Abzentrifugation des Blutkuchens nach abgelaufener Gerinnung aus Vollblut gewonnen. Alle Seren wurden vor Zusatz zum Medium zur Inaktivierung der Komplementfaktoren für 30 min im Wasserbad auf 56°C erhitzt.

Die PBMC wurden bei einer Zelldichte von 2×10^6 in jeweils 1000 µl Medium in 24-Loch-Zellkulturplatten (*Corning Incorporated, Corning NY, USA*) bei 37°C und 5,0 % CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Die Dauer der Zellkultur betrug, je nach Versuchsanordnung drei bis sieben Tage. Ein Austausch des Zellkulturmediums erfolgte nicht. Bei Bedarf wurden im Verlauf der Kultivierung 200 bis 300 µl frisches Medium je Probe mit oben aufgeführten Zusätzen hinzu gegeben.

2.7 *In vitro* Antigenstimulation mononukleärer Zellen

Die Antigenstimulation erfolgte durch Koinkubation der PBMC mit den entsprechenden Antigenen während der mehrtägigen Kultivierung. Auf jeder Zellkulturplatte wurden neben den stimulierten Zellen Kontrollproben ohne Antigen kultiviert. Je nach Versuchsanordnung wurden verschiedene Allo- und Autoantigene, sowie ein Superantigen, verwendet. Diese sind mit eingesetzter Konzentration und Bezugsquelle in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2.7: Verwendete Antigene und eingesetzte Konzentrationen

| Antigen | Endkonzentration | Bezugsquelle |
|------------------------------------|-------------------------|--|
| Staphylokokken-enterotoxin B (SEB) | 1 µg/ml | SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland |
| Tetanustoxoid (TT) | 5 µg/ml =20 Lf | Chiron Behring GmbH & Co, Marburg, Deutschland |
| Gräserpollenlysate | 10 µg/ml | ALK-Scherax, Deutschland |
| Nukleosomen | 20 µg/ml | Dr. G. Hausdorf, Charité, Präparation aus Hühnererythrozyten, beschrieben unter <i>Bruns et al. 2000</i> |
| Smd1 ₈₃₋₁₁₉ -Peptid | 5 µg/ml | Dr. G. Hausdorf, Charité, synthetisches Peptid, beschrieben unter <i>Riemekasten et al. 1998</i> |

2.8 Magnetische Zellsortierung

Die Anreicherung von CD4⁺-Zellen aus PBMC wurde mittels magnetischer Zellsortierung (MACS: *magnet associated cell sorting*) durchgeführt.

Bei dieser Methode werden superparamagnetische Mikropartikel an monoklonale Antikörper gekoppelt. Die Antikörper sind entweder direkt gegen Oberflächenmoleküle der Zellen gerichtet oder gegen zwischengeschaltete spezifische Antikörper und können so die Zellen spezifisch markieren. Mithilfe eines Permanentmagneten wird ein Hochgradienten-Magnetfeld in einer aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehenden Säulenmatrix erzeugt. Läuft eine Zellsuspension durch diese Säule, werden die markierten Zellen in der Säule festgehalten (Positivfraktion), während die restlichen Zellen durch die Säule hindurch gespült werden (Negativfraktion). Nach Aufhebung des Magnetfeldes kann die Positivfraktion aus der Säulenmatrix isoliert werden. Die Technik kann zur Anreicherung oder zum Ausschluss (Depletion) einer oder mehrerer Zellpopulationen angewendet werden.

2.8.1 Magnetische Markierung der CD4⁺-Zellen

Die CFSE-markierten antigenstimulierten PBMC wurden nach mehrtägiger Kultivierung aus den Zellkulturplatten in Eppendorf-Gefäße überführt und nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA in dieser Pufferlösung resuspendiert. CD4

MultiSort MicroBeads[®] (*Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland*) wurde in einem Verhältnis von 1:6 hinzu gegeben. Zusätzlich wurde ein humanes IgG-Mischpräparat (Beriglobin[®], *Chiron Behring GmbH & Co, Marburg, Deutschland*) zum Blocken unspezifischer Bindung der Antikörper an die Fc-Rezeptoren der Zellen im Verhältnis 1:10 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über 20 min bei 4°C. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit PBS/BSA wurden die Zellen in je 500 µl Pufferlösung resuspendiert.

2.8.2 Magnetische Anreicherung der CD4⁺-Zellen

Die Separation der PBMC erfolgte mittels VS⁺Säulen[®] (neuer Name LS Säulen[®], *Miltenyi Biotech*) und einem Permanentmagneten (*Miltenyi Biotech*) im MidiMACS[®]-System. Zunächst wurde die im Magnetsystem befindliche Säule mit 2000 µl entgaster Pufferlösung (PBS/BSA) gespült. Dann wurden die in 500 µl suspendierten PBMC über einen Zellfilter appliziert. Es folgte eine dreimalige Spülung mit je 2000 bis 3000 µl entgaster Pufferlösung. Die Negativfraktion wurde verworfen. Die Positivfraktion wurde nach Aufhebung des Magnetfeldes mithilfe des im Set enthaltenen Säulensampels und 3000 µl Pufferlösung aus der Säule eluiert und in einem Schraubdeckelröhrchen aufgefangen. Es folgte ein zweiter Elutionsschritt mit 1000 µl Pufferlösung. Die so gewonnene Positivfraktion wurde zur weiteren Anreicherung über eine zweite Säule gegeben. Die Reinheit der CD4⁺-Zellen wurde nach der Zelltrennung durchflusszytometrisch (vgl. Kap. 2.10) mit einer CD4-Cy5-Färbung (vgl. Kap 2.10.3) kontrolliert (MACS-Check) und lag bei über 99%. Das Ergebnis der FACS-Analyse ist an einem Beispiel in Abb. 2.1 dargestellt.

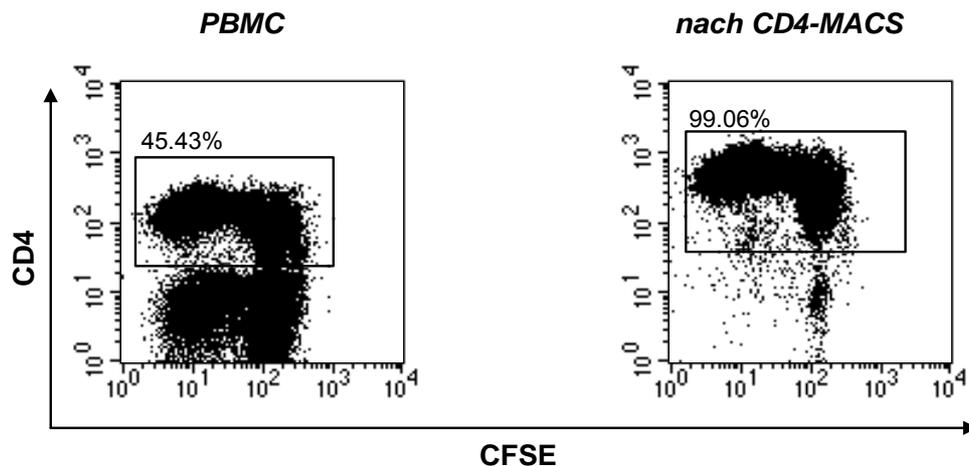


Abbildung 2.1 Magnetische Zellsortierung (MACS) von CD4⁺-Zellen. Aus CFSE-markierten PBMC wurden nach 6-tägiger TT-Stimulation die CD4⁺-Zellen durch magnetassoziierte Zellsortierung (MACS) isoliert. Die Reinheit wurde mit einer CD4-Cy5-Färbung kontrolliert (Y-Achse). Links ist die Ausgangsfraction dargestellt und rechts die Positivfraction nach CD4⁺-Separation. Die X-Achse zeigt die CFSE-Konzentration. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Zahl der analysierten Lymphozyten und -blasten nach Ausschluss toter Zellen mittels PJ.

2.9 Polyklonale *in vitro* Th-Zellstimulation

Zur Analyse des Zytokinprofils der CD4⁺-Zellen wurden diese nach ihrer Anreicherung polyklonal mit Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) und Ionomycin stimuliert. Die beiden Substanzen greifen direkt in die Signaltransduktion der T-Zellen ein, so dass eine TCR- und APC-unabhängige Stimulation erfolgt. Dabei bewirkt das Kalziumionophor Ionomycin einen Kalziumeinstrom in die Zelle, der zu einer Aktivierung von Calcineurin führt. PMA greift in den zweiten Arm der Signaltransduktionskette, die normalerweise über den TCR aktiviert wird, ein und aktiviert die Proteinkinase C (Scheiermann, 2004).

Für die Stimulation wurden je $1-5 \times 10^6$ CD4⁺-Th-Zellen in 1 ml RPMI 1640 (Zusätze s.o.) aufgenommen und mit 5 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin für 6h im Brutschrank inkubiert. Für die letzten 2h wurde der Sekretionsinhibitor Brefeldin A (1 µg/ml; alle 3 Reagenzien: Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben. Dies dient der Ansammlung der von den Zellen synthetisierten Zytokine im Zytosol.

2.10 Formaldehydfixierung von Zellen

Bei der Behandlung von Zellen mit Formaldehyd kommt es zu einer Quervernetzung von Proteinen der Zellen unter Beteiligung der Aldehydgruppen des Formaldehyds. Es resultiert eine Stabilisierung der Zellmembran und eine Fixierung des Proteinstatus.

Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit zweiprozentiger Formaldehydlösung (hergestellt aus Paraformaldehyd, vgl. Kap. 2.1, *Merck, Darmstadt, Deutschland*) in PBS resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C in PBS/BSA/Azid aufbewahrt.

2.11 Durchflusszytometrische Zellanalyse mittels fluoreszenzaktivierter Zellsortierung

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der lasergestützten Messung verschiedener optischer Parameter von Zellen auf Einzelzellebene. Die Einzelzellsuspension wird durch eine hydrodynamische Fokussierung der Zellsuspension erreicht. Hierbei wird die angesaugte Zellsuspension (Probenstrom) durch das Innere eines Mantelstroms mit höherer Flussgeschwindigkeit geleitet. Die durch den Mantelstrom erzeugten Kräfte ziehen die Flüssigkeit in ihrem Inneren quasi auseinander, wodurch die Zellen einzeln den Laser passieren (*Radbruch, 2000*).

Die einzelnen Zellen passieren dann monochromatisches Licht, das von einem Laser erzeugt wird. Die Streuung dieses Lichts gibt bereits Auskunft über bestimmte Zelleigenschaften. Das in geringem Winkel (3-10°) abgelenkte Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bezeichnet. Es korreliert über den Brechungsindex mit der Zellgröße. Das rechtwinklig reflektierte Licht wird Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) genannt. Es dient als Maß für die Granularität und Membranfaltung der Zellen.

2.11.1 Fluorochrome in der Durchflusszytometrie

Um weitere Zelleigenschaften erfassen zu können bedient man sich fluoreszierender Farbstoffe (Fluorochrome). Diese werden durch monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und emittieren daraufhin Licht in einem für jedes Fluorochrom charakteristischen Wellenlängenbereich. Dieses emittierte Licht wird in

einem Durchflusszytometer mittels hochempfindlichen Lichtsensoren (Photomultiplerröhren) vom optischen zunächst in ein elektrisches und dann in ein digitales Signal umgewandelt.

Bestimmte Fluorochrome färben das gesamte Zytosol oder den Zellkern an. Will man aber spezifische Molekülstrukturen der Zelle erfassen, kann man gegen diese gerichtete monoklonale Antikörper an fluoreszierende Farbstoffe koppeln. Auf diese Weise können eine Vielzahl von Zellstrukturen auf der Zelloberfläche oder nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellmembran auch intrazellulär markiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Aufgeführt sind jeweils Einsatzgebiet und Messkanal, der sich durch die spezifische Emissionswellenlänge jedes Farbstoffes ergibt.

Tabelle 2.8: Verwendete Fluorochrome

| Fluorochrom | Abkürzung | Einsatzgebiet/Funktionsweise | Messkanal (Emissions- maximum in nm) |
|--------------------------------------|-----------|---|---|
| Carboxyfluoreszein-Succinimidylester | CFSE | Anfärben des Zytosols lebender Zellen durch Bindung an Proteine | FL 1 (518) |
| Phycoerythrin | PE | Kopplung an monoklonale Ak | FL 2 (575) |
| Peridinin-Chlorophyll-a | PerCP | Kopplung an monoklonale Ak | FL 3 (680) |
| Propidiumjodid | PJ | Anfärben der DNA toter Zellen | FL 2/3 (617) |
| Allophycocyanin | APC | Kopplung an monoklonale Ak | FL 4 (660) |
| Cy5 | | Kopplung an monoklonale Ak | FL 4 (666) |

2.11.2 Funktionsweise des FACS Calibur™

In der vorliegenden Arbeit wurden alle durchflusszytometrischen Messungen mit einem FACS Calibur™ der Firma Becton Dickinson durchgeführt (FACS: *fluorescence activated cell sorting* = Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung). In diesem Gerät können bis zu vier verschiedene Fluorochrome parallel erfasst werden. Das emittierte Fluoreszenzlicht der verschiedenen Fluorochrome wird dabei durch Teilerspiegel in verschiedene Fluoreszenzkanäle (FL) umgelenkt. Da sich die

Wellenlängenbereiche teilweise überlappen, muss über optische Interferenzfilter eine Kompensation erfolgen. Diese wird für jeden Versuchsaufbau individuell eingestellt. Die Messung in vier unterschiedlichen Kanälen ist durch den Einsatz zweier Laser möglich. Der erste Laser, ein Argonlaser generiert Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm. In diesem Wellenlängenbereich liegen die Absorptionsspektren der Fluorochrome CFSE, PE, PerCP und PJ. Dadurch werden die Messungen im ersten bis dritten Kanal (FL 1 bis FL 3) ermöglicht. Ein zusätzlicher roter Diodenlaser (635 nm) ermöglicht die Messung in einem vierten Kanal. In seinem Wellenlängenbereich liegen die Absorptionsspektren von Cy5 und APC.

2.11.3 Oberflächenfärbungen für die durchflusszytometrische Analyse

Bei den Oberflächenfärbungen wurden Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper der Maus eingesetzt, die gegen bestimmte Oberflächenmoleküle auf humanen mononukleären Zellen gerichtet sind. Bestimmte Oberflächenmoleküle sind dabei charakteristisch für bestimmte Lymphozytensubpopulationen. Die allgemeine Abkürzung lautet CD (*cluster of differentiation*). Die Färbungen können sowohl auf lebenden als auch auf formaldehydfixierten Zellen durchgeführt werden. Sie wurden auf PBMC und auf den magnetisch angereicherten CD4⁺-Zellen angewendet.

Die verwendeten Antikörper sind mit Spezifität, Klon, Fluorochrommarkierung, Bezugsquelle und eingesetzter Verdünnung in der Tabelle 2.5 aufgeführt. Die eingesetzten Konzentrationen lagen zwischen 1-5 µg/ml.

Die Färbungen wurden in Eppendorf-Gefäßen durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS/BSA bei 4°C und 300 x g gewaschen und 10 min auf Eis im Dunkeln mit den fluorochrom-gekoppelten Oberflächenantikörpern (Verdünnung s.o.) und Beriglobin[®] in einer Verdünnung von 1:50 zum Blocken unspezifischer Bindungen in 100 µl PBS/BSA inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit Puffer gestoppt und die Zellen erneut gewaschen. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die gefärbten Zellen in 200-300µl PBS/BSA aufgenommen.

Zum Ausschluss toter Zellen wurde den Proben (bei unfixierten Zellen) unmittelbar vor der Messung 0,1-2 ng/ml Propidiumjodid (PJ) zugesetzt. Das fluoreszierende PJ diffundiert durch beschädigte Membranen toter Zellen in den Zellkern und interkaliert dort in die DNA.

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper gegen Oberflächenantigene

| Spezifität | Klon | Markierung | Verdünnung | Bezugsquelle |
|------------|--------|-------------|------------|--------------|
| CD3 | HIT 3a | PE | 1:100 | 3 |
| CD4 | SK3 | PerCP | 1:10 | 3 |
| CD4 | TT1 | Cy5 | 1:100 | 1 |
| CD8 | SK1 | PE | 1:200 | 4 |
| CD19 | HIB 19 | PE | 1:100 | 4 |
| CD19 | SJ25C1 | PerCP.Cy5.5 | 1:10 | 3 |
| CD19 | HIB 19 | APC | 1:10 | 4 |
| CD20 | 2H7 | PE | 1:10 | 4 |
| CD20 | L27 | PerCP | 1:10 | 3 |
| CD27 | M-T271 | Cy5 | 1:300 | 4 |
| CD138 | DL-101 | PE | 1:50 | 4 |

¹ aus Maus-Hybridom-Kulturüberständen mittels Protein-G-Affinitätssäule aufgereinigten Antikörper wurden in unserem Labor mit Phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) oder Cy5 (Amersham Life Science, USA) konjugiert

² Unkonjugierte Antikörper wurden in unserem Labor mit Fluorochromen konjugiert

³ Becton Dickinson, San Jose, USA

⁴ BD Pharmingen, San Jose, USA

2.11.4 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen für die durchflusszytometrische Analyse

Das Prinzip der intrazellulären Färbung unterscheidet sich von der Oberflächenfärbung dadurch, dass die Antikörper die Zellmembran passieren müssen. Für die dazu erforderliche Permeabilisierung der Zellmembran müssen die Zellen grundsätzlich fixiert sein. Für die Permeabilisierung wurde der Pflanzengerbstoff Saponin verwendet, der durch Interaktion mit den Phospholipiden der Zellmembran diese durchlässig macht.

Die Zytokinfärbungen wurden mit CD4⁺-Zellen nach PMA/Ionomycin-Stimulation und anschließender Formaldehydfixierung durchgeführt. Die in PBS/BSA/Azid suspendierten Zellen wurden bei 4° und 300 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Färbelösung bestehend aus 0,5 prozentiger Saponinlösung mit Beriglobin (Verdünnung 1/50) und den Färbeantikörpern gegen Zytokine resuspendiert. Es folgte eine Inkubation auf Eis im Dunkeln über 10 min. Anschließend wurden die Zellen mit Saponin bei 300 x g gewaschen und zur FACS-Analyse in 200 bis 300 µl PBS/BSA/Azid resuspendiert. Die verwendeten Antikörperkonjugate sind in der Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Antikörper gegen Zytokine

| Spezifität | Klon | Markierung | Konzentration | Bezugsquelle |
|---------------|-----------|------------|---------------|--------------|
| IL-2 | N748A | PE | 1:200 | 1 |
| IL-4 | 4D9 | PE | 1:50 | 1 |
| IL-5 | TRFK5 | APC | 1:100 | 4 |
| IL-10 | JES-19F1 | Cy5 | 1:100 | 5 |
| IL-13 | JES10-5A2 | PE | 1:50 | 4 |
| INF- γ | 4SB3 | Cy5 | 1:200 | 1 |
| TNF- α | Mab11 | APC | 1:800 | 4 |
| TNF- β | 359-81-11 | PE | 1:100 | 4 |

¹ aus Maus-Hybridom-Kulturüberständen mittels Protein-G-Affinitätssäule aufgereinigten Antikörper wurden in unserem Labor mit Phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) oder Cy5 (Amersham Life Science, USA) konjugiert

² Unkonjugierte Antikörper wurden in unserem Labor mit Fluorochromen konjugiert

⁴ BD Pharmingen, San Jose, USA

⁵ Hölzel Diagnostika, Köln

2.11.5 Messungen und Datenanalyse

Alle Messungen in dieser Arbeit wurden mit CFSE-markierten Zellen durchgeführt. Die Einstellung der Kompensation erfolgte mithilfe von Einzelfärbungen. Gleiche Färbekonstellationen wurden im weiteren Verlauf immer in der gleichen gespeicherten Kompensationseinstellung gemessen. In der Regel wurden 10^5 Zellen je Probe gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mit der „Cellquest Research Software“ (Becton Dickinson, San Jose, USA) gespeichert und analysiert. Die Daten wurden in der Regel als zweidimensionale Punktdiagramme (*dot plots*) dargestellt, wobei jeder Punkt im Koordinatensystem eine Zelle repräsentiert. FSC und SSC wurden dabei in linearer Skalierung dargestellt. Die vier Fluoreszenzkanäle erschienen in logarithmischer Skalierung. Anhand der Informationen über Größe und Granularität wurde ein Analysefenster um die Lymphozyten- und Lymphoblastenpopulation gesetzt, auf das sich die weiteren Auswertungen bezogen.

2.12 Statistische Auswertung

Die erhaltenen Daten aus den durchflusszytometrischen Analysen wurden mit klinischen und paraklinischen Patientendaten in Beziehung gesetzt. Als Statistikprogramm wurde dabei das Microsoft-Programm „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS) verwendet. Die im Einzelnen angewandten statistischen Tests sind im Ergebnisteil unter den entsprechenden Punkten aufgeführt.