

3. Material und Methoden

3.1 Reagenzien, Chemikalien, Puffer und Geräte

Wenn nicht anders erwähnt, werden in der vorliegenden Arbeit Chemikalien der höchsten Reinheitsstufe (p.A. Qualität) der Firmen Sigma (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Riedel-de-Haän (Sellze, Dänemark) verwendet.

Es sind folgende Antikörper benutzt worden:

Die Antikörper Anti-CD2 (blockierend), Anti-CD11a (blockierend), Anti-CD29 (blockierend) und Anti-CD54 (blockierend) sind von Leinco, St. Louis, USA.

Der Antikörper Anti-Phosphotyrosine (4G10) ist von Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA.

Die Antikörper Anti-CD122 (C-20), Anti-ICOS (W18), Anti-OX40 (G14) und Anti-Gata3 (HG3-35) sind von Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA.

Die Antikörper Anti-CD25-PE, Anti-CD3-PE (UCHT1), Anti-CD122-PE, Anti-CD132-PE, Anti-CD28-PE und Anti-CD54-PE sind von Becton-Dickinson (BD), San Jose, USA.

Die Antikörper Anti-Stat3 und anti Stat5 sind von Transduction Laboratories, Lexington, USA.

Die Antikörper Anti-Phosphotyrosin-Stat3 (Y705), Anti-Phosphoserin-Stat3 (S727), Anti-Phosphotyrosin-Stat6 (Y641) und Anti-Phosphotyrosin-Stat5 (Y694) sind von New England Biolabs, Beverley, USA.

Der Antikörper Anti-TcR (F101.01) ist von Dr. C.Geisler, Kopenhagen, Dänemark.

Der Antikörper Anti-IL-13R α 2 ist von Euroclone, Pero, Italien.

Die Isotypen Kontrollantikörper für Maus-IgG-FITC und Schaf-IgG-FITC, Anti-Maus-IgG-FITC, Anti-Schaf-IgG-FITC, Anti-Maus-IgG-HRP sowie Anti-Kanin-HRP sind von DAKO, Ballerup, Dänemark.

In den ELISA-Versuchen sind folgende Antikörper von Pharmingen, San Diego, USA benutzt worden:

- Ratte Anti-human IL-13- und Biotin-gekoppelter Kanin Anti-human IL-13-Antikörper;
- Maus Anti-human IL-4- und Biotin-gekoppelter Ratte Anti-human IL-4-Antikörper;
- Maus Anti-human IL-5- und Biotin-gekoppelter Kanin Anti-human IL-5-Antikörper;
- Maus Anti-human IFN γ und Biotin-gekoppelter Maus Anti-human IFN γ -Antikörper;

Als Detektionsreagenz im ELISA diene Avidin-HRP und ABTS-Substratlösung (Sigma). PMA, Cyclosporin A, Gö7874, RO318220, Ly294002, Wortmannin, Rapamycin, Tautomycin und Okadaic, Brefeldin A, Monensin und Cycloheximid waren von Alexis, San Diego, USA.

Die Zytokine IL-2, IL-4 und IL-13 waren von Pepro Tech, Rocky Hills, NY, USA.

Das IL-13R α 2-IgG-Fc-Chimärmolekül (614-IR) war von R+D Systems, Minneapolis, USA.

Die Biotin-gekoppelten Oligo-Nukleotide waren von DNA-Technologies, Aarhus, Dänemark und hatten folgende Sequenzen:

IL-2Ra-a: 5'-TTTCTTCTGGGAAGTACC

IL-2Ra-b: 5'-GGTACTTCCTAGAAGAAA

ICAM1-a: 5'-AGCTTAGGTTTCCGGGAAAGCAC

ICAM1-b: 5'-GTGCTTTCCCGGAAACCTAAGCT

Die hier benutzten Superantigene (SEA, SEB, SEC, SED, TSST) waren alle von höchster Reinheit (highly purified) von Toxin Technologies, Sarasota, USA.

Die verwendeten Mutanten von SEA, sowie das *wild typ* Molekül wurden uns freundlicher Weise von Dr. M. Dohlsten (Pharmacia, Lund, Schweden) zur Verfügung gestellt:

SEwt - *wild typ*

SEm9 - Punktmutation in der Zn²⁺ abhängigen Bindungsstelle der MHC Klasse II β Kette

SEm15 - Punktmutation in der Bindungsstelle der MHC Klasse II α Kette

SEm23 - Punktmutationen in beiden MHC II Bindungsstellen

SET12 - Punktmutation in Bindungsstelle für das TcR V β Segment

allgemeine **Puffer:**

Phosphat gepufferte Saline (PBS)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10,1 mM NaH₂PO₄ x 1 H₂O

pH 7,4 mit NaOH

Geräte:

Kühlzentrifuge: Juaon, GR412 mit variablen Rotoreinsätzen

Tischzentrifuge: Heraeus Sepatech Biofuge A oder Ole Dich microfuge 157.MP mit Kühlung

Wasserqualität:

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Wasser der Güte Milli-Q (Type 2, NCCLS, TOC 5 ppb und 0,055 μSi) angesetzt.

3.2 T-Zelllinien und T-Zellklone

Alle Zellkulturen wurden in liegenden Zellkulturflaschen (Gibco) unter sterilen Bedingungen in einem 37⁰ C warmen, mit Wasserdampf gesättigten Heraeus Function Line Inkubator mit 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert und in einer Holten Lamin Air *clean bench* versorgt. Die Messung der Zellkonzentration der lebenden Zellen (Vitalitätszählung) wurden mit Trypanblau (Gibco), einer Neubauer Zählkammer, und einem Leitz Labovert Kontrastmikroskop durchgeführt.

Das Standardmedium bestand aus:

RPMI 1640 (Sigma) mit 25 mM HEPES (pH 7,4)

+ 10% (v/v) vereinigt fötales Kälberserum (FKS)

+ 2 mM L-Glutamin (Sigma)

+ 100 mg/ml penicillin (Sigma)

+ 100 mg/ml streptomycin (Sigma)

Das fötale Kälberserum wurde vor Benutzung durch Inkubation bei 56⁰C für 30 Min. inaktiviert.

Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zellen wurden in Aliquots von 20 x 10⁶ Zellen pro 1,5 ml Gefriermedium in Kryoröhrchen (Nagene) schrittweise auf -80⁰C abgekühlt und in flüssigem N₂ gelagert.

Das Gefriermedium bestand aus:

RPMI 1640 (Sigma)

+ 20% (v/v) *gepooltes*, fötales Kälberserum Serum (FKS)

+ 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Merk)

Die gefrorenen Aliquots wurden in einem Wasserbad vollständig aufgetaut und mit kaltem Standardmedium rasch dreimal gewaschen.

Mykoplasmatest der Zellkulturen

Alle Zellkulturen wurden routinemäßig alle 6 Wochen an Hand eines PCR-basierten Mykoplasmatest auf Kontamination mit Mykoplasma hin getestet.

Alloaktivierte T-Zellen (PLT-Zellen)

Als Ausgangspunkt für ausreichende Mengen humaner aktivierter $CD4^+$ T-Zellen (meits $CD45RO^+$ Th0 T-Zellen des *memory* Typs) dienten in der vorliegenden Arbeit Allo-Antigen (Allogen) aktivierte, humane T Zelllinien, kurz alloaktivierte T-Zelllinien, oder *primed lymphocyte typing cells* (PLT-Zellen) (Ødum,1986). Die Aktivierung der PLT-Zellen geschah nach dem Schema der *mixed lymphocyte reaction* (MLR).

Die peripheren Blutzellen eines Donors A (mit HLA-DP, Resonder) wurde mittels Dichtezentrifugation aufgereinigt. Das Blut eines anderen Donors B (anderes HLA-DP, Stimulator) wurde ebenfalls aufgereinigt und bestrahlt (24 Rad). Die Zellen beider Patienten wurden vermischt, und ein Teil der T-Zellen von Patient A reagierte mit Proliferation auf die APC's des Stimulators mit dem "fremden" HLA-DP Molekül (Allogen).

Die T-Zellen Linien wurden nun wöchentlich restimuliert. An Tag 2, 3 und 4 wurde den T-Zellen 200 U/ml IL-2 (Pepro Tech) zugesetzt. Etablierte PLT-Zelllinien wurden am Tag 7 entweder untersucht oder restimuliert, jedoch nie länger als 4 Wochen in Kultur gehalten. Es sei erwähnt, dass aktivierte humane T-Zellen im Gegensatz zu murinen T-Zellen als APC fungieren können und MHC Klasse II Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen.

Psoriasis Zelllinie Psor2

Die kontinuierliche T-Zelllinien (Psor2a +b) stammen von einem Patienten mit Psoriasis Vulgaris. Diese T-Zelllinie wurde aus einer Biopsi von erkrankten Hautbereichen gewonnen (Kaltoft, 1995) und wurde uns freundlicher Weise von Dr. Keld Kaltoft (Århus

Universität) zur Verfügung gestellt. Diese T-Zelllinien wurde in Medium mit 1000 U/ml IL-2 und 500 U/ml IL-4 kultiviert.

RB4.1

Die kontinuierliche T-Zelllinie RB4.1 stammt von einem Patienten mit atopischer Dermatitis. Diese T-Zelllinie wurde aus einer Biopsie von erkrankten Hautbereichen gewonnen und wurde uns freundlicher Weise von Dr. Keld Kaltoft (Århus Universität) zur Verfügung gestellt. Diese T-Zelllinie wurde in Medium mit 1000 U/ml IL-2 und 2000 U/ml IL-4 kultiviert.

AF-Zellen

Die T-Zellklone AF19, AF 24 und AF28 mit einer Spezifität für das Birkenpollen Epitop Bet v1 wurden uns freundlicher Weise von ALK-Abelló (Hørsholm, DK) zur Verfügung gestellt. Diese Klone wurden mit 5 µg/ml rekombinantem Bet v1 (ALK-Abelló) und bestrahlten, autologen, EBV-transformierten B-Zellen, bestrahlten allogenen PBMC's und 1 µg/ml PHA (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland) jeden 10. Tag stimuliert oder zu Versuchen verwendet (Sparholt, 1997).

3.3 Stimulation und Lyse von T-Zellen

T-Zelllinie oder Klone wurden, wenn nicht anders angegeben vor jeder Stimulation gewaschen (durch dreimaliges Zentrifugieren bei 1250 rpm in der Juon Kühlzentrifuge für 5 min und resuspendieren in frischem Medium) und für 2-6 h in Medium mit 5% hitzebehandeltem, fötalem Kälberserum (FCS) und ohne Interleukine bei einer Zelldichte von 3×10^6 /ml zur Ruhe gebracht ("gehungert"). Nach Zugabe der verschiedenen Modulatoren und Abschluss der verschiedenen Experimente wurden die T-Zellen (in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen) kurz und unter Kühlung zentrifugiert, in kaltem Aufschlusspuffer resuspendiert, auf Eis für 30 min lysiert und abschließend für 15 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Gefäße überführt und, wenn nötig, bei -20°C gelagert.

Der Aufschlusspuffer bestand aus:

1% NP-40

20 mM Tris-HCl pH 8,0

137 mM NaCl

10% Glyzerin

mit einem Inhibitorgemisch aus:

1 mM PMSF

5 mM EDTA

1mM Na₃VO₄

10 µg/ml Aprotinin

10 mM NaF

4 mM IAA

Eine einzelne Probe für einen Western-Blot bestand normaler Weise aus 2×10^6 T-Zellen und wurde in 75 µl Lysierungspuffer lysiert. Für eine Immunpräzipitation wurden 20×10^6 T-Zellen in 100 µl Lysierungspuffer nach gleichem Verfahren lysiert.

3.3.1 Fraktionelle Lyse

20×10^6 T-Zellen wurde in 600 µl *cyt/nuc*-Aufschlusspuffer für 30 min auf Eis lysiert und für 5 min bei 3500 rpm kalt zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend dreimal in *cyt/nuc*-Lysierungspuffer gewaschen und in 100 µl Hochsalzpuffer für 30 min auf Eis lysiert. Das Lysat wurde für 15 min bei 13000 rpm kalt zentrifugiert. Der Supernatant (100 µl + 600 µl *cyt/nuc*-Lysierungspuffer für IP) stellt die Kerne-Fraktion dar. Der Überstand der ersten Zentrifugation (600 µl) stellt die Zytoplasma-Fraktion dar.

Der *cyt/nuc*-Aufschlusspuffer bestand aus:

0,5% NP-40

20 mM Tris-HCl (pH 8,0)

137 mM NaCl

5 mM MgCl

+ Inhibitorgemisch (siehe 3.3, jedoch ohne EDTA);

Der Hochsalzpuffer wurde bei -20°C aufgewart und bestand aus:

300 mM NaCl

50 mM KCl

2% Glyzerin

40 mM Tris-Base

5 mM MgCl_2

2 mM EDTA

0,1 mM NH_4 -Molybdat

10 mM β -Glycerinphosphat

5 mM DTT

15 mM *p*-Nitrophenylphosphat

+ Inhibitorgemisch (siehe 3.3);

3.4 Aggregationsversuche

T-Zellen wurden zur einleitenden Untersuchung ihres Aggregationsverhaltens gewaschen, gehungert und mit verschiedenen Modulatoren (z.B. Superantigenen) bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6/\text{ml}$ in 24-Loch nunc-Platten behandelt. Zu den bezeichneten Zeitpunkten wurde das Verklumpen der Zellen durch eine Kombination von Mikroskop (Nikon TS 100 Eclipse Kontrast/Flourescence Microscop) und einer digitalen Kamera (Nikon Coolpix 990) festgehalten und qualitativ ausgewertet.

3.5 Proliferationsversuche

Um die Viabilität der untersuchten Zellen zu sichern, wurde ein Proliferationstest durchgeführt. Hierbei wurde ausgenutzt, dass dem Medium zugesetztes, ^3H -markiertes Thymidin nur in die neusynthetisierte DNA sich teilender Zellen eingebaut wird.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in 96-Loch-Rundboden-Platten (NUNC, Dänemark) und Standardmedium bei einer Zelldichte von 4×10^3 Zellen in 200 μl kultiviert. Nach 24, 48 oder 72 Stunden wurden die Zellen auf Glasfiberfilter (UniFilter GF/C, Pachard, Canberra) überführt. 6 Stunden vor der Thymidinmessung wurde dem Medium $1\mu\text{Ci}$ per Loch ^3H -Thymidin (Amersham) zugesetzt.

Der trockenen Filterplatte wurde 25 µl MicroScint (Pachard) per Loch zugesetzt, und das eingebaute ³H-Thymidin mittels eines Top Count, microplade β-scintillation counter (Pachard) als *mean counts per minute* von Quadruplikaten gemessen. Das Wachstum der Zellen ließ sich mittels unbehandelten Kontrollzellen beurteilt.

3.6 Natriumdodecylsulfat-Polyakrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nach Molekulargewicht wurden 16x20 cm x 1.0 mm große denaturierende, diskontinuierliche SDS (Sodiumdodecylsulphat)-Polyakryl-amid-Gele in einem Gelsystem von Bio Rad (Protean II Slab Cell) benutzt.

Diese auf Laemmli zurückgehende Methode basiert auf der unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeit von durch SDS negativ ummantelten Proteinen in einem Spannungsfeld. Die Laufgeschwindigkeit der entfalteten Proteine ist hierbei annähernd umgekehrt proportional dem Molekulargewicht.

Für einen Western-Blot mit Immunoblot wurden Zelllysate von 2×10^6 T Zellen in 75 µl Aufschlussbuffer mit 25 µl denaturierendem 4x Laemmli-Probenpuffer vermischt und für 3 min bei 98⁰C gekocht.

Der Probenpuffer bestand aus:

200 mM Tris-HCl, pH 6,8

10% SDS

40%Glyzerin

20% 2-Mercapto-Ethanol

0,04% Bromphenolblau

Das 10%-ige Trenngel setzte sich wie folgt zusammen:

13,2 ml H₂O

8,2 ml Separations-Tris (1,5 M Tris-Base, 0,4% SDS, pH 8,9 durch konz. HCl)

11,0 ml 30% bis-Akrylamid (Protogel, National Diagnostics, CA, USA)

17 µl TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin, Sigma)

135 µl 10% Ammoniumpersulphat (APS, Sigma)

Diese Mischung wurde entgast und zwischen die Glasplatten gegossen. Nach Polymerisierung des Trenngels wurde ein 4,5%-iges Sammelgel wie folgt gemischt:

5,85 ml H₂O

2,5 ml Stacking-Tris (0,5 M Tris-Base, 0,4% SDS, pH 6,7 mit HCl)

11,0 ml 30% bis-Akrylamid (Protogel)

14 µl TEMED (Sigma)

67 µl 10% APS (Sigma)

Das Sammelgel wird über das Trenngel geschichtet und ein 15-zackiger Kamm eingesetzt. Der Kamm ermöglicht das Einfüllen von bis zu 150 µl Probe. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in die Bio Rad Gel-Apperatur eingespannt und mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Laufpuffer setzte sich wie folgt zusammen:

25 mM Tris-Base (Sigma)

0,2 M Glyzin (Sigma)

0,1% SDS

Neben den aufzutrennenden Proben wird ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker (Rainbow Marker, Amersham) in eines der Zacken eingefüllt und gewährleistet eine schnelle, abschätzende Molekulargewichtsbestimmung der auftretenden Proteinbanden. Die SDS-PAGEs wurden über Nacht (16 h) mittels einer Bio-Rad Power Pac 300 Stromversorgung bei konstant 60 V durchgeführt.

3.7 Western Blot

Westernblotting mit Immunodetektion diente dazu, die durch SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennten Proteine mittels Antikörpern zu identifizieren. Dazu wurde das Polyakrylamid-Gel von den Glasplatten auf eine befeuchtete Nitrozellulosemembran (NZM, Protran 0,45, Schleicher&Schüll) passender Größe überführt und in Transferpuffer getränkte Papierlagen (Whatman) eingebettet.

Der Transferpuffer bestand aus:

25 mM Tris-Base

0,2 M Glyzin

0,02% SDS

18% Ethanol

Diese Sandwich (12 x Papier/NZM/12 x Papier) wurde in einem Semi Dry Blotter II (Kem En Tec, Kopenhagen, DK) bei 0,8 mA/cm² für 90 min *geblottet*. Die Proteinübertragung wurde anhand des vorgefärbten Rainbow Markers kontrolliert, die Nitrozellulosemembran wurde anschließend kurz in PBS gespült und freie Protein-bindungsstellen für 90 min bei Raumtemperatur in Blockingpuffer abgesättigt. Alle nachfolgenden Inkubations- und Reinigungsschritte wurden durch sanftes Schwenken auf einem Schwenktisch durchgeführt.

Der Blockingpuffer bestand aus:

PBS

3% Magermilchpulver (Matas)

1% Bovine Serum Albumin (BSA)

Der Western Blot-Waschpuffer (PBS/Tween) bestand aus:

PBS

0,05% Tween-20

Die blockierte NZM wurde nun über Nacht mit verschiedenen primären Antikörpern (meist 1:1000 in Blockingpuffer) bei 4⁰C inkubiert. Eine Liste der verwendeten Antikörper findet sich unter 3.1. Der inkubierte Blot wurde einmal 5 min in PBS/Tween und danach dreimal für 10 min in PBS gewaschen. Nachfolgend wurde der Blot mit *horseradish-peroxidase* (HRP)-konjugiertem sekundären Antikörper für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde der Blot einmal 5 min in PBS/Tween und fünfmal für 10 min in PBS gewaschen.

Der Blot wurde mittels eines *enhanced chemiluminescenc kit* (ECL), den Anweisungen des Herstellers (Amersham) entsprechend, behandelt. Dazu wurde der gewaschene Blot für 1 min in der 1:1 ECL-Mischung inkubiert, abgetropft und zwischen Küchenfilm (*vita-wrap*) gelegt. Dem Blot wurde dann in einer lichtdichten Kassette in der Dunkelkammer ein Film (Curix Blue, HC-S-Plus, AGFA; Belgien) aufgelegt und der Intensität entsprechend exponiert und entwickelt.

Reblotting

Falls eine weitere Inkubation mit einem anderen Antikörper notwendig war, wurde der Blot dreimal für 5 min in PBS gewaschen und mit einem *Stripping*-Puffer für 30 min bei 56⁰C in Plastikfolie eingeschweißt und inkubiert.

Der *Stripping*-Puffer bestand aus:

63 mM Tris HCL, pH 6,7

2% SDS

0,714 % 2-Merkapto-Ethanol

Der gestrippte Blot wurde fünfmal für 10 min in PBS gewaschen und wie oben beschrieben wiederholt mit Antikörpern inkubiert und der sekundäre Antikörper mit einem ECL-Kit visualisiert.

3.8 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ermöglicht die Fällung und Identifikation (mittels nachfolgenden SDS-PAGE und Western Blot) von nativen Proteinen aus Zellysaten und ermöglicht Aufschlüsse über das Assoziationsverhalten der untersuchten Proteine. Dazu "fischt" man mit einem Antikörper das gesuchte Protein aus einem Zellysat und fällt den Immunkomplex mit an Agarosekügelchen (*beads*) gekoppeltem Protein A aus. Das gesuchte Protein wird durch SDS-PAGE von Antikörpern und Protein A-Kügelchen getrennt und durch Immunoblot identifiziert.

Für eine Immunpräzipitation wurden T-Zellysate (siehe 3.3 Lyse von Zellen) von 2×10^7 T-Zellen (in 100 µl Aufschlusspuffer) mit 50 µl Protein A-Perlen-Lösung für 60 min bei 4⁰C auf einem *end-over-end-Mixer* inkubiert (*preclearing*). Die Eppendorf-Röhrchen wurden für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in neue Röhrchen überführt. Das Zellysat wurde nun mit dem fällenden Antikörper (z.B. 1 µg 4G10, anti Phosphotyrosin mAb, UBI) über Nacht bei 4⁰C *end-over-end* inkubiert. Danach wurden die Lysate mit 50 µl Protein A-Perlen-Lösung für 60 min bei 4⁰C *end-over-end* inkubiert. Nach der Zentrifugation (2 min, 13.000 rpm) wurden die beads fünfmal mit 1 ml Lysierungspuffer (siehe 3.3) gewaschen und zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die beads mit einer Rüsselpipette trocken gesaugt und in neue Röhrchen überführt,

abermals zentrifugiert und mit 100 µl denaturierendem 1x Laemmli-Probenpuffer vermischt und für 3 min bei 95°C gekocht. Die Proben der Immunpräzipitation wurden anschließend im SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot identifiziert. Bei erhöhtem Hintergrund wurden die Proben neben den beads auch mit 10 µl des entsprechenden Normalserums (z.B. Kanin oder Maus) inkubiert.

Die Protein A-Perlen-Lösung bestand aus:

Net-NO vermischt 1:1 (v/v) mit Protein A-Perlen (Protein A sepharose CL-4B, Pharmacia)
Die Perlen wurden in Net-NON 30 min inkubiert, dann dreimal mit Net-NO gewaschen und 1:1 in Net-NO resuspendiert.

Net-N bestand aus:

50 mM Tris HCL, pH 8

150 mM NaCl

5 mM EDTA

0,5% (v/v) NP-40

0,05% (w/v) NaN₃

Net-NO bestand aus

Net-N

+ 1 mg/ml ovalbumin (Sigma)

Net-NON bestand aus:

Net-NO

+ 0,5 M NaCl

3.8.1 Präzipitation mit Biotin-gekoppelten Oligo-Nukleotiden

Die DNA-Bindungsfähigkeit ("biologische Aktivität") von Transkriptionsfaktoren (wie z.B. Stat-Proteinen) kann relativ einfach durch ihre Bindungsfähigkeit zu Biotin-gekoppelten Oligo-Nukleotiden (Bio-Oligos) der betreffenden DNA-Bindungsregion getestet werden. Dazu werden die gewünschten DNA-Sequenzen mit Biotin gekoppelt und dem Zytosol- oder Kernelysat hinzugefügt. Nun ließen sich die an Bio-Oligos gebundenen Transkriptionsfaktoren mit Avidin-gekoppelten Agarosekügelchen (*beads*) präzipitieren.

Die Vorgehensweise der Präzipitation mit Bio-Oligos ist genau wie unter Immunpräzipitation beschrieben durchgeführt worden. Notwendige Änderungen sind hier kurz skizziert.

Nach einem *Preclearings*-Schritt des Lysates von 20×10^6 T Zellen mit 50 μ l Avidin-*beads* (Kem-en-Tec, Dänemark) wurde den Proben 12 μ l Biotin-gekoppelten DNA-Oligos (hier für DNA-Bindungssequenzen für Stat3) zugesetzt und für 16 h bei 4° C *end-over-end* inkubiert. Der Rest des Versuches entsprach der oben beschriebenen Immunpräzipitation, nur wurden die Komplexe aus Bio-Oligos und Transkriptionsfaktoren mit Avidin-*beads* gefällt.

Die verschiedenen Biotin-gekoppelten Stat3-DNA-Bindungssequenzen (DNA-Technologies, A/S Denmark, Sequenzen siehe 3.1) wurden mit einer Konzentration von 12 pmol/ μ l in H₂O als Doppelstrang (A+B) für 3 min bei 95° C erwärmt, bei Raumtemperatur abgekühlt und aliquotiert. Pro Probe wurden 12 μ l dieser Aliquots (144 pmol) verwendet.

3.9 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie (oder FACS-Analyse, für *Fluorescence activated cell sorting*) ermöglicht durch Vorbeiführen von einzelnen, Fluorochrom-markierten Zellen an einem Laser in einem kapillaren Flüssigkeitsstrom die rasche, gleichzeitige Beschreibung von mehreren unterschiedlichen Faktoren einer Zellpopulation. Durch Streuung vermittelt das detektierte Laserlicht Information über die Anzahl, die Größe und die Granularität der Zellen. Fluorochromgekoppelte Antikörper binden sich an die verschiedenen Oberflächenantigene und emittieren Licht entsprechend dem Vorkommen der markierten Proteine. Durch die Wahl verschiedener Fluorochrome lassen sich mehrere Proteine gleichzeitig quantitativ bestimmen.

Alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschrte (+ 2 ml FACS-Puffer, zentrifugiert bei 1250 rpm) wurden bei 4° C durchgeführt. Die einzelnen Zellproben ($0,5 \times 10^6$ Zellen per Probe) wurden in FACS-Röhrchen (5 ml Falcon, round-bottom, Becton-Dickinson) überführt, dreimal in FACS-Puffer gewaschen, mit den verschiedenen Antikörpern (normalerweise 5 μ g per Probe) für eine Stunde inkubiert und wieder dreimal gewaschen. Ungekoppelte Antikörper wurden mit einem sekundären, fluorochromgekoppelten,

speziesspezifischen Antikörper inkubiert und nachfolgend gewaschen. Markierte Zellproben wurden mit mit 0,5 ml Fixer-Puffer fixiert und die Zellen in einem FACS-Calibur (Bekton-Dickinson) Durchflußzytometer analysiert. Die gewonnen Daten wurden mit Hilfe der Cell-Quest Software (Beckton-Dickinson) analysiert und dargestellt.

Der FACS-Puffer bestand aus:

PBS

5% (v/v) fötales Kälberserum

0,05% (w/v) NaN₃

Der Fixer-Puffer bestand aus:

PBS

1% para-Formaldehyd

3.10 Enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der induzierten Zytokinmengen im Zellkulturüberstand wurden *Sandwich-Catching-ELISA-Assays* durchgeführt. Dazu werden Anti-Zytokin-Antikörper an 96-Loch maxi-sorb Plastikplatten (Nunc) gebunden, mit Zellkulturüberstand inkubiert und das gebundene Zytokin mit einem enzymgekoppelten Detektionsantikörper gegenüber eine Standardreihe quantifiziert. Alle verwendeten Antikörperpaare waren von Pharmingen (San Diego, USA).

Der Anti-Zytokin-Antikörper (z.B. Anti-IL-4) wurde auf 0,5 µg/ml in ELISA-Bindungspuffer verdünnt und 50 µl per Loch in 96-Loch flat-bottom MaxiSorp Plates (Nunc, Dänemark) wurden für 16 h bei 4⁰C inkubiert. Die Platte wurde zweimal in 200 µl ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 200 µl ELISA-Blockpuffer für 2h bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde die Platte mit 100 µl Standardverdünnungen und den Proben für 4 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurde die Platte mit 100 µl biotinylierten Detektionsantikörpern (0,5 µg/ml in Blockpuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurde die Platte mit 100 µl Avidin-gekoppelter Peroxidase (verdünnt zu 2 µg/ml in Blockpuffer, Sigma) für 30 min bei RT inkubiert. Nach achtmaligem Waschen wurde die Platte mit 100 µl ABTS-Substrat (Sigma)

inkubiert, die Farbreaktion mit 100 µl SDS/DMF gestoppt und die Färbung mittels ELISA-Reader (ImmunoReader NJ 2000, InterMed, Dänemark) bei OD 405 nm quantifiziert.

Der ELISA-Washpuffer bestand aus:

PBS

0,5% Tween-20

Der ELISA-Bindungspuffer bestand aus:

0,1 M NaHCO₃, pH 8,2

Der ELISA-Blockpuffer bestand aus:

PBS

10% FKS

Die ABTS-Substratlösung bestand aus:

150 mg 2,2 Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure) (Sigma)

500 ml 0,1 M Zitronensäure (Merk), pH 4,35 mit NaOH

Aliquots zu 11 ml wurden bei -20⁰C gefroren und 5 min vor Gebrauch aufgetaut und mit 10 µl 30%-iges H₂O₂ (Merk) versetzt.

Die SDS/DMF-Lösung bestand aus:

220 ml H₂O

80 g SDS (Sigma)

200 ml N,N-Dimethylformamid (Sigma)

3.11 RNase Protektion Assay (RPA)

Zur gleichzeitigen Bestimmung von verschiedenen Zytokin-mRNAs in einer Probe wurde der *RNase Protektion Assay* (Pharmingen, San Diego, USA) verwendet. Hierbei extrahiert man die einzelsträngige mRNA der Probe, hybridisiert diese zu *in vitro* Transcription/³²P-Phosphor-markierten RNA-Oligos (hCK1, hier Kit für humane Zytokine) verschiedener, zytokinspezifischer Länge und degradiert anschließend mit RNase nicht hybridisierte RNA. Die doppelsträngigen, markierten RNA-Oligos werden nun durch PAGE der Größe nach aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. Die RNA-Mengen der einzelnen Zytokine können nun anhand von Standards identifiziert und densitometrisch quantifiziert werden.

Proben-RNA wurde mittels RNeasy (Qiagen, Hilden, Deutschland) dem Hersteller-Protokoll entsprechend isoliert. Behandelte Zellpellets (20×10^6 Zellen) wurden in 600 μ l RTL Lysierungspuffer resuspendiert und in *QIA-shredder*-Säulen (Qiagen) zentrifugiert. Das Lysat wurde mit Ethanol versetzt und die RNA an *RNeasy-Säulen* (Qiagen) gebunden, gewaschen und eluiert. Eine Probe der in 80 μ l eluierten RNA wurde durch OD 260 nm/280 nm spektrophotometrisch (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) quantifiziert und die Integrität der RNA in einem 0,2% Agarose-TBE-Gel (SEA-Kem, GTG) mit Ethidiumbromid untersucht. 32 P-Markierte RNA-Proben wurden dem Hersteller-Protokoll folgend mittels RiboQuant Kit (Pharmingen, San Diego) hergestellt.

Mittels T7-Polymerase, 32 P-UTP (Amersham, Freiburg, Deutschland) und längenspezifischen Zytokin-DNA-Templates wurden 32 P-markierte *Anti-sense* Zytokin-RNA-Proben ($\sim 6 \times 10^5$ cpm per Probe) hergestellt und mit den Proben-RNAs (10 μ g/Probe) hybridisiert. Mittels RNase wurde die einzelsträngige RNA abgebaut, die Doppelstrang RNA durch ein denaturierendes 5%-iges PAGE aufgetrennt und die Proben mRNA durch Autoradiografie (Film: BioMax, MS, Kodak) densitometrisch identifiziert und quantifiziert.

3.12 GeneChip Assay

Um die durch ELISA und RPA gewonnene Zytokindaten abzusichern und einen Überblick über andere Superantigen induzierte Proteine zu erhalten, wurde ein GeneChip Assay (Affymetrix, Santa Clara, USA) durchgeführt. Diese Methode erlaubt die gleichzeitige, quantitative Messung von bis zu 12.000 aktiven Genen.

Dazu wird die gesamte RNA von behandelten und Kontrollzellen isoliert. Mittels photolithografischer Aktivierung und Festphasensynthese von Oligo-Nukleotiden wird eine Vielzahl von Oligonukleotiden (Proben) an vorher festgelegten Plätzen auf einem Array synthetisiert. Die isolierte RNA wird amplifiziert und mit Fluorochromen markiert. Nach der Hybridisierung werden die Fluoreszenzwerte mittels eines Laser-Scanners gemessen und die betreffenden mRNA-Sequenzen identifiziert und quantifiziert.

Die GeneChip Assays wurden mit Hilfe der Gruppe von Prof. Klaus Bendtzen (Universitätshospital Kopenhagen) durchgeführt und analysiert. 20×10^6 mit Superantigen inkubierten T-Zellen wurden in 6 ml Trizol (Life Technologies, Rockwill, USA) lysiert,

und die RNA mittels RNeasy Säulen (Qiagen, Hilden) isoliert. Chip-Arrays (HuGene fl Array und Hu U95 Array) mit biotinylierten cDNA Doppelsträngen wurden aus oligo dT-Primern und *in vitro*-Transkription und Biotinylierung mittels T7 RNA-Polymerase (Affymetrix, Santa Clara, USA) hergestellt und mittels Streptavidin gekoppeltem Pycoerythrin visualisiert (HP G2500A GeneArray Scanner). Die Behandlung der Daten erfolgte mittels GeneChip Analysis Suite Software (Affymetrix).