

2 Material und Methoden

2.1 Puffer und Lösungen

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

Tabelle 2.1: Verwendete Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS pH 7,2-7,4 (Phosphat-gepufferte Saline)	1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 2,7 mM Kaliumchlorid (KCL) 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) 137 mM Natriumchlorid (NaCL)
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	2 mM Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS/BSA
Fixierungs-Reagenz	PBS-Puffer mit 2% oder 18,5% Paraformaldehyd (w/v), pH 7,0
Permeabilisierung-Puffer	FACS-Perm-Solution (BD), 1:10 in A.dest
TBS-Puffer (Tris-gepufferte Saline)	50 mM Tris 150 mM NaCl
TBST-Puffer (Tris-gepufferte Saline mit 0,05% Tween)	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % Tween-20
Western-Blot Blockierungs- Puffer	TBST+5% (w/v) BSA TBST+3% (w/v) Schweinegelatine (Sigma)
Western-Blot "Strip"-Puffer	TBS +1% (w/v) SDS+0,7% (v/v) Mercaptoethanol

2.2 Geräte

Brutschrank:	Heraeus 6000 (Heraeus, Deutschland)
Mikroskop:	Axiovert (Carl Zeiss, Deutschland)
Wasserbad:	WB7 (Memmert, Deutschland)
Sterile Werkbank:	HERA safe (Heraeus, Deutschland)
Durchflusszytometer:	FACSCalibur (BD, Deutschland)
Zell-Sorter:	FACSAria (BD, Deutschland)
Zentrifugen:	Multifuge 3 S-R (Heraeus, Deutschland)

	Biofuge fresco (Heraeus, Deutschland)
Zellzählgerät:	Casy DT (Schärfe Systems, Deutschland)
SDS-Gelsystem:	Biorad Mini-Gel
Western-Blot-Tank:	Biorad Mini Gel Tank Blot
Chemolumineszenz-Scanner:	Fuji LAS-3000

Alle Zentrifugationsschritte, im Folgenden auch als „Waschschritte“ bezeichnet, wurden zehn Minuten (min) bei 300xg mit lebenden Zellen und bei 480xg mit fixierten Zellen durchgeführt. Eine Ausnahme bildet die PBMC-Isolierung, bei der die Zentrifugationsschritte einzeln aufgeführt sind.

2.3 Zellkulturmedien und Kulturbedingungen

Die Kultivierung von 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 10% humanem AB-Serum (PAA, Linz, Österreich). Die Zellen wurden in 6-, 12-, 48- oder 96-Loch-Zellkulturplatten (Costar, USA, letztere mit rundem Boden) bzw. in FACS-Tubes (BD Falcon, USA) 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 Präparation humaner mononukleärer Zellen

2.4.1 Blutspender und Patienten

Zur Gewinnung der PBMC von gesunden Spendern wurden Buffy-Coats vom Blutspendedienst des Roten Kreuzes/Wannsee, Blutfilter aus der Blutspende der Charité, sowie Blut von freiwilligen Spendern aus dem Institut verwendet.

Für die Analyse von mononukleären Zellen aus Gelenkpunktaten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis wurden Proben verwendet, die von den behandelnden Ärzten aus therapeutischen Zwecken entnommenen wurden; nur Patienten mit zum

Zeitpunkt der Entnahme aktiver RA und gesicherter Diagnose (gemäß den ACR Kriterien von 1987) wurden in die Analysen eingeschlossen.

2.4.2 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Periphere mononukleäre Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können aufgrund ihrer Dichte mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten durch isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Dazu wurde Blut zu gleichen Teilen mit PBS/BSA/EDTA-Puffer verdünnt und in 50ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 12,5 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 zweimal mit PBS/BSA/EDTA gewaschen. Die Zellen wurden in PBS/BSA/EDTA resuspendiert und bis zur Weiterbehandlung bei 4°C gelagert.

2.4.3 Aufarbeitung von Synovialpunktaten von RA-Patienten

Frisch entnommene Synovialflüssigkeit wurden in heparinisierte Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur transportiert und gelagert. Zur Reduzierung der Viskosität wurden die Proben zweimal mit PBS/BSA/EDTA gewaschen, durch ein Zellsieb (Celltrics, Partec, Deutschland) zur Reinigung von verbliebenen Gewebstücken gegeben, ein weiteres Mal gewaschen und bis zur Weiterbehandlung bei 4°C gelagert.

2.4.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl in Suspensionen wurde das vollautomatische CASY DT System (Schärfe Systems, Deutschland) eingesetzt. Es basiert auf der elektronischen Pulsflächenanalyse und erlaubt die Messung von Zellzahl sowie

tot/lebend-Unterscheidung anhand der Zellgröße mit einer Messgenauigkeit von $0.1\mu\text{M}$. Die zu messende Probe wurde zunächst 1:1000 in PBS verdünnt, der zu erwartende Größenbereich gewählt (für lebende PBMC: $7\text{-}30\mu\text{m}$) und die gemessene Zellkonzentration (pro ml) über das LCD-Display ausgegeben.

2.5 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und, je nach verwendetem Gerät, derzeit bis zu 13 weiteren Parametern (LSRII, 4-Laser-Version, BD) anhand emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert werden. Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert und passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander einen Laserstrahl. Dabei werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt; zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem geringen Winkel ($3\text{-}10^\circ$) 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 von den verschiedenen Fluorochromen emittierte Fluoreszenzlicht wird durch Teilerspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangt dann auf photosensitive Detektoren, sog. Photomultiplier. Im verwendeten Analysegerät FACSCalibur stehen drei Sensoren für 530nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585nm (FL2) und $>650\text{nm}$ (FL3) über den ersten Laser (Argon, 488nm) zur Verfügung. Über einen zweiten Dioden-Laser (635nm) kann ein weiteres Fluoreszenzparameter mit einer anderen Anregungswellenlänge zur Verfügung gestellt werden (FL4: 670nm). Nach Verstärkung wird das optische Signal zunächst in elektrische Ströme und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt. FSC- und SSC-Signale wurden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Tab.2.2 zeigt die Absorptions- und Emissionswellenlängen der am FACSCalibur verwendeten Fluorochrome. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der CellQuest Research Software (BD, USA). Die Daten wurden als zweidimensionale „Punkt-Diagramme“ („dot-plots“) oder als eindimensionale Histogramme dargestellt. In den Punktdiagrammen repräsentiert

jeder Punkt eine Zelle. Durch das Setzen von Analysefenstern („gates“) kann die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt werden.

Tabelle 2.2: Absorptions- und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen.

Detektionskanal	Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FL1	FITC	495nm	519nm
FL2	PE	480/565nm	578nm
FL3	PerCP	536nm	670nm
FL3	PJ	536nm	670nm
FL4	Cy5	650nm	666nm
FL4	APC	650nm	660nm

2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung

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

2.5.1.1 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Die anzufärbenden Zellen wurden in PBS/BSA/EDTA gewaschen und für 10 min bei 4-8°C in einer Konzentration von $1-2 \times 10^7$ /ml Zellen in der Färbelösung inkubiert. Diese bestand aus PBS/BSA/EDTA, Beriglobin und den entsprechenden Färbeantikörpern. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/BSA/EDTA gewaschen und das Pellet in 200-400µl PBS/BSA/EDTA resuspendiert; die Analyse erfolgte am FACSCalibur, die Zellsortierung mit anschließender Analyse der Reinheit am FACS Aria. Unmittelbar vor der Messung wurde bei der Analyse von lebenden Zellen Propidiumjodid (PJ; 0,2-1µg/ml) zugesetzt, um eine tot/lebend-Unterscheidung zu ermöglichen. Propidiumjodid diffundiert durch die beschädigte Zellmembran toter Zellen und interkaliert mit der DNA-Doppelhelix. Die so markierten toten Zellen können in der durchflusszytometrischen Messung in FL3 analysiert werden.

2.5.1.2 Kombinierte intrazelluläre Zytokin- und Oberflächenfärbung

Zunächst wurden die für eine Kombinationsfärbung vorgesehenen Zellen durch Formaldehyd fixiert. Die Fixierung erfolgt im Wesentlichen durch die Quervernetzung von Proteinen unter Beteiligung der Aldehydgruppen des Formaldehyds. Dadurch wird der Proteinstatus der Zelle erhalten und es können die durch den zugegebenen Proteinsektionsinhibitor Brefeldin A akkumulierten Zytokine der aktivierten Zellen intrazellulär angefärbt werden. Zur Fixierung wurde soviel 18.5%iges Formaldehyd direkt in die Zellkultur pipettiert, dass eine Endkonzentration von 2% (v/v) erreicht wurde. Nach 15 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit BD FACSPerm Lösung für 10 min. bei RT permeabilisiert. Nach Waschen in PBS/BSA/Azid erfolgte eine Inkubation für 30 min bei RT in der Färbelösung, die Beriglobin und Färbeantikörper enthielt. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS/BSA/Azid, gefolgt von der Analyse am FACSCalibur. Nach Permeabilisierung bleibt die Färbung bei 4°C Lagertemperatur für ca. 24h stabil.

2.5.1.3 CFDA-Färbung zur einheitlichen Markierung von Zellen

Carboxyfluoreszein Diazetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE, Molecular Probes, Niederlande) 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 Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) umgewandelt, das weniger membrangängig ist. Der Farbstoff kann u.a. verwendet werden, um in Co-Kulturrexperimenten mit verschiedenen Zellpopulationen eine CFSE-markierte Zelle später im Durchflußzytometer re-identifizieren zu können, da der Farbstoff über lange Zeit stabil bleibt und in FL1 strahlt. Weiterhin ermöglicht die CFSE-Färbung die Analyse von proliferierenden Zellen, da die Farbstoffmenge pro Zellteilung nur zur Hälfte an die Tochterzellen weitergegeben wird und so die Helligkeit in FL1 um 50% reduziert wird.

Zur Markierung wurden Th-Zellen zweimal in PBS-Puffer gewaschen, mit PBS-Puffer auf eine Konzentration von 1×10^7 /ml eingestellt und 1 ml dieser Suspension in ein 15 ml Schraubdeckelröhrchen überführt. Es folgte die Zugabe von 1 µl einer 0.5 mM CFDA-SE-Lösung (=1:1000). Die Suspension wurde 4 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit RPMI-Medium aufgefüllt und zweimal

gewaschen, um das freie CFDA-SE vollständig an die Serumproteine im Medium zu binden und so aus der Zellsuspension zu entfernen. Anschließend wurden die markierten Zellen in Kulturmedium aufgenommen.

2.5.1.4 Antikörper

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), Peridinin-Chlorophyll-ProteinComplex (PerCP, Prozyme, San Leandro, CA, USA) und Cy5 (Cyaninfarbstoff, Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA) konjugiert.

Tabelle 2.3: Monoklonale Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle und Zytokine.

Spezifität	Klon	Markierung	Hersteller
CD3	UCHT-1	ungekoppelt	BD
CD4	TT1 SK3	FITC, PerCP, Cy5 PE-Cy7	Hybridomzelllinie/Kopplung DRFZ BD
CD14	TM1	FITC, Cy5	Hybridomzelllinie/Kopplung DRFZ
CD25	4E3	PE, APC	Miltenyi Biotec
CD28	CD28.2	ungekoppelt	BD
CD40L	TRAP1	PE	BD
CD45RO	UCHL1	FITC, APC	BD
CD45RA	HI-100	FITC, APC	BD
CD69	FN50	FITC, PE	BD
CD70	Ki-24	FITC, APC	BD
CD71	M-A712	FITC, APC	BD
CD134 (Ox40)	ACT35	PE, APC	BD
CD137 (4-1BB)	4B4-1	PE, APC	BD
HLA-DR	L243	FITC, Cy5	Hybridomzelllinie/Kopplung DRFZ
CCR5	2D7	PE	BD
CCR7	3D12	PE-Cy7	BD
IL-18R α	FAB840P	PE	R&D Biosystems
IFN γ	4SB3	FITC, PerCP, Cy5	Hybridomzelllinie/Kopplung DRFZ
TNF α	1D12	FITC	Hybridomzelllinie/Kopplung DRFZ

2.6 Zellsortierung

Zur Isolierung von definierten Zellpopulationen aus einem Zellgemisch wurde die Methode der magnetischen Zellseparation (MACS: Magnetic Cell Separation) sowie die Methode der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting) angewandt.

2.6.1 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, die aus spezifisch markierten und unmarkierten Zellen besteht (Abb.2.1A), wird über eine Trennsäule gegeben (Abb.2.1B), die sich in einem Permanentmagnetfeld befindet. Die Trennsäulen besitzen eine Matrix aus Stahlwolle. Während die unmarkierten Zellen die Säule im Hochgradientenfeld durchlaufen (Abb.2.1B), bleiben die markierten Zellen in der Trennsäule arretiert und können anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden (Abb.2.1C). Das MACS-System kann zur Anreicherung oder zum Ausschluss (Depletion) einer magnetisch markierten Zellpopulation aus einem Zellgemisch eingesetzt werden. Die Isolationsprozeduren wurden gemäß den Herstellerprotokollen für die konjugierten Antikörper, Isolations-Kits und MACS-Säulen (alles Miltenyi Biotec, Deutschland) durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden LS⁺-Säulen (Kapazität 1x10⁸ Zellen) sowie die automatisierte Variante der MACS-Sortierung, der AutoMACS (Kapazität 1x10⁹ Zellen) verwendet. Bei Depletionen wurde der Durchfluß durch die Säulen mit einer an den Säulenausgang angebrachten Gr.16-Blutentnahme-Kanüle (B. Braun, Deutschland) begrenzt, um die Reinheit der nicht-markierten Zellen zu erhöhen.

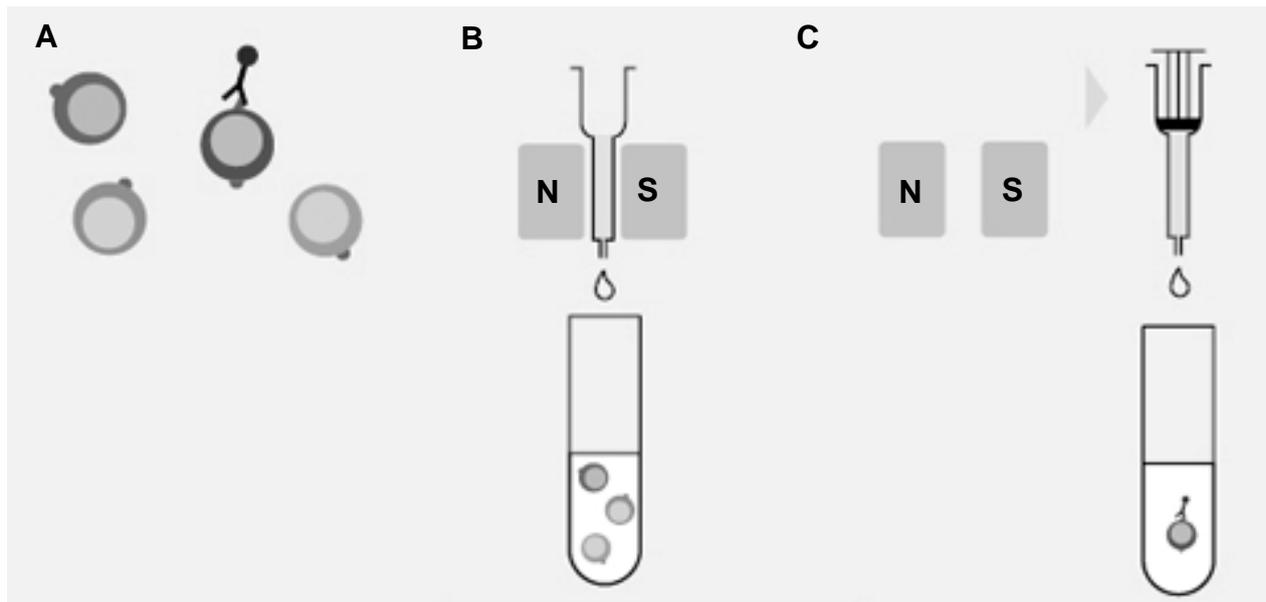


Abbildung 2.1: Prinzip der magnetischen Zellseparation. Quelle: Miltenyi Biotec, modifiziert.

2.6.1.1 Isolierung von CD4⁺ Th-Zellen

Zur Isolierung von CD4⁺ Th-Zellen wurden PBMC mit magnetisch markierten CD4-Antikörpern (CD4 Multisort Kit, Miltenyi Biotec, Deutschland) 1:5 mit PBS/BSA/EDTA 15 min bei 4-8°C inkubiert, mit PBS/BSA/EDTA gewaschen, in 2ml resuspendiert und über LS+ MACS-Säulen im Midi-MACS-System separiert. Die LS+ Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden zuvor mit 3ml PBS/BSA/EDTA äquilibriert. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld wurden die CD4⁺ Th-Zellen mit 3ml PBS/BSA/EDTA-Puffer eluiert und die magnetische Markierung durch Inkubation mit Release-Reagent (CD4 Multisort Kit, Miltenyi Biotec, Deutschland) für 15 min bei 4-8°C von den Antikörpern abgetrennt. Alternativ wurden CD4⁺ Zellen im AutoMACS mit dem Programm *posse/s* angereichert, welches eine höhere Ausbeute bei geringerer Reinheit ermöglicht. Aliquots der unsortierten, negativen und positiven Zellfraktionen wurden mit Antikörpern gegen CD4 gefärbt und im Durchflusszytometer auf ihre Reinheit analysiert. Analog dem ersten Anreicherungsschritt folgte in einigen Experimenten ein weiterer, um die Reinheit der magnetisch markierten Zellen zu erhöhen.

2.6.1.2 Isolierung von naiven ($CD45RA^+$) und Antigen-erfahrenen ($CD45RO^+$) Th-Zellen

Ausgehend von $CD4^+$ Th Zellen (s. 2.6.1.1) wurden analog dazu naive $CD4^+CD45RA^+$ Th-Zellen durch Depletion der Antigen-erfahrenen $CD45RO^+$ Zellen nach Markierung mit $CD45RO$ -Beads aus dem Zellgemisch angereichert.

Umgekehrt wurden Antigen-erfahrene $CD45RO^+$ Th-Zellen angereichert, indem naive Zellen mittels $CD45RA$ Beads aus dem Gemisch depletiert wurden. Zur Entfernung kontaminierender Monozyten, die das $CD4$ -Antigen gering exprimieren und im $CD4$ -Anreicherungsschritt nicht vollständig entfernt wurden, wurde in einigen Experimenten eine Depletion anhand des Monozytenmarkers $CD14$ mittels $CD14$ -Beads angeschlossen. Die verschiedenen Zellfraktionen wurden nach Anfärbung mit Antikörpern gegen $CD4$, $CD45RA$ und $CD45RO$ bzw. $CD14$ im Durchflußzytometer analysiert.

2.6.1.3 Isolierung von $CD14^+$ Monozyten

Nach Anreicherung von $CD4^+$ Th Zellen aus PBMC (s. 2.6.1.1) wurde die $CD4$ -negative Fraktion nach dem ersten Separationsschritt verwendet, um die darin enthaltenen $CD14$ -positiven Monozyten zu separieren. Die Isolierung erfolgte analog zu 2.6.1.1 mittels $CD14$ Microbeads unter Verwendung des AutoMACS und des Programms *posseId2*, bei dem die Anreicherung über zwei aufeinander folgende Säulen erfolgt. Die Reinheit der Monozyten wurde durchflußzytometrisch nach Anfärbung mit Antikörpern gegen $CD14$ bestimmt.

2.6.1.4 Isolierung bzw. Analyse von lebenden Zellen anhand von Zytokinsekretion

Der Zytokin-Sekretionsassay (Technologie der zellulären Affinitätsmatrix, Miltenyi Biotec, Deutschland) bietet die Möglichkeit, durch Stimulation induzierte Zytokin-Produzenten lebend von Nicht-Produzenten zu separieren oder nur zu analysieren. Abb.2.2 zeigt exemplarisch die Funktionsweise für das Zytokin Interferon gamma: Nach Induktion der Zytokinsekretion z.B. durch Stimulation des T-Zell-Rezeptors wird $IFN\gamma$ in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und freigesetzt; eine zuvor

aufgebrachte Affinitätsmatrix („catch-matrix“), die über das auf allen mononukleären Zellen exprimierte CD45 auf der Zelloberfläche verankert ist und eine zweite Spezifität für IFN γ besitzt, fängt während der 45-minütigen Sekretionszeit das freigesetzte Zytokin ein. Eine Markierung der Zelle erfolgt dann über einen zweiten spezifischen Detektionsantikörper, der Fluorochrom-gekoppelt ist (z.B. PE) und so zytometrische Analysen oder die weitere Sortierung im FACS ermöglicht. Alternativ können die PE-positiven Zellen nach Inkubation mit anti-PE Microbeads mit Hilfe des MACS-Systems angereichert werden. Alle Versuchsschritte wurden entsprechend den Herstellerprotokollen durchgeführt; um eine unspezifische Bindung von sezerniertem IFN γ an Nachbarzellen zu verhindern, wurden die Zellen in der Sekretionsphase stets bewegt und auf eine Konzentration von 10^5 - 10^6 /ml eingestellt.

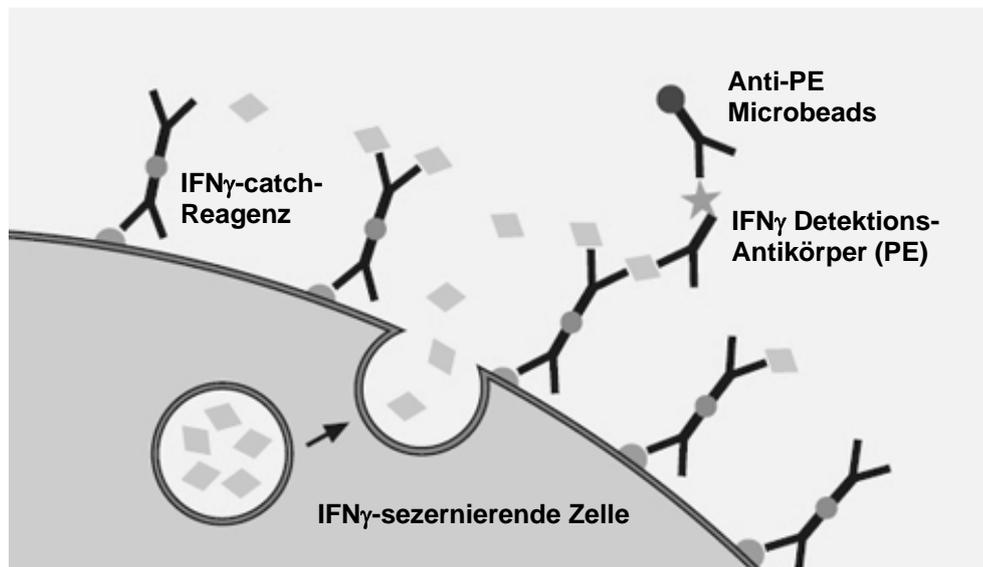


Abbildung 2.2: Prinzip der Identifizierung und Anreicherung von Zytokin-sezernierenden Zellen mittel Zytokin-Sekretions-Assay-Technologie. Quelle: Miltenyi Biotec, modifiziert.

2.6.1.5 MACS Beads

Tabelle 2.4: MACS Beads

Spezifität	Klon	Typ	Hersteller
CD4	M-T321	Micro-/Multi-sortbeads	Miltenyi Biotec
CD14	unbekannt	Microbeads	Miltenyi Biotec
CD45RA	L48	Microbeads	Miltenyi Biotec
CD45RO	unbekannt	Microbeads	Miltenyi Biotec
Anti-PE	unbekannt	Microbeads	Miltenyi Biotec

2.6.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Funktionsweise des verwendeten FACSAria entspricht im Wesentlichen der des FACSCalibur (2.5); zur Sortierung von definierten Zellfraktionen werden Analysefenster („gates“) in den korrespondierenden Punktwolkendiagrammen gezogen, deren Schnittmenge die zu isolierenden Zellen definiert, welche dann von der Elektronik abgelenkt werden. Die Zellen fliegen nach der Messung zum Abrisspunkt, wo der Flüssigkeitsstrahl, durch einen piezoelektronischen Schwingungsgeber stabilisiert, in Tröpfchen aufbricht ($20\text{-}2 \times 10^5$ Tröpfchen/sec). Dabei werden die Zellen in einzelne Tröpfchen verpackt. Soll eine Zelle isoliert werden, wird das Tröpfchen kurz vor dem Abreißen vom Strahl mit einer elektrischen Ladung versehen. Es durchfliegt ein elektrostatisches Feld, welches von zwei geladenen Metallplatten (3kV) erzeugt wird und wird in Richtung des Auffangröhrchens abgelenkt.

Im Unterschied zum FACSCalibur verfügt der FACSAria über 3 Laser, deren korrespondierende Photodetektorkassetten in zwei Trignons sowie einem Oktagon angeordnet sind (Abb.2.3). Die technischen Daten sind Tabelle 2.5 zu entnehmen. Der FACSAria wurde ebenfalls zur Re-Analyse der sortierten Populationen eingesetzt; die generierten Daten konnten nach Umwandlung in das FCS2.0-Format mittels FACSConvert (BD) in CellQuest analysiert werden.

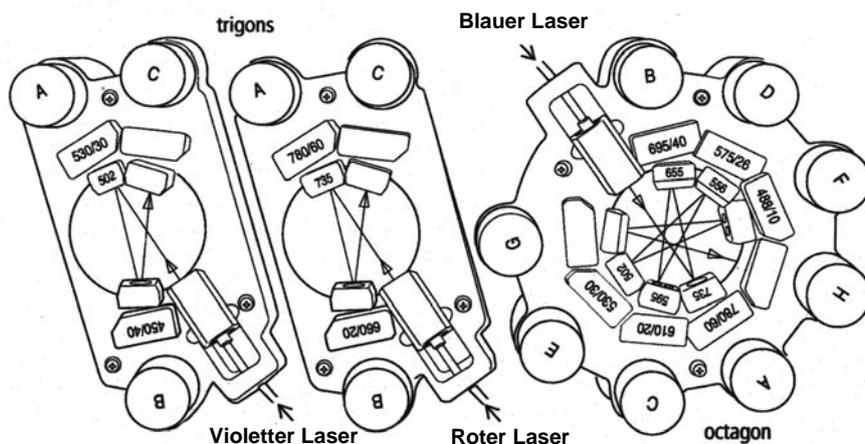


Abb. 2.3: Anordnung der Laser, Filter und Photodetektoren im FACSAria. Quelle: BD

Tabelle 2.5: Fluorochrom-Detektion im FACS Aria.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge	dichroischer Spiegel/Longpass	Bandpassfilter
PE-Cy7	488nm blauer Laser	735	780/60
PerCP/ PE-Cy5	488nm blauer Laser	635	670/14
PE/PJ	488nm blauer Laser	550	575/26
FITC	488nm blauer Laser	505	530/30
Alexa Fluor/ DAPI	405nm violetter Laser	-	440/40
APC-Cy7	633nm roter Laser	735	780/60
APC	633nm roter Laser	-	660/20
Cy5	633nm roter Laser	-	675/20

2.6.2.1 Anreicherung von Zellpopulationen mittels FACS

Zur Isolierung von Th Subpopulationen aus magnetisch vorangereicherten CD4⁺ Th Zellen oder CD4⁺CD45RA⁺ bzw. CD4⁺CD45RO⁺ Zellen wurde die FACS-Technologie verwendet. Dazu wurden frisch isolierte Th Zellen mit den entsprechenden Antikörpern für 10 min bei 4°C inkubiert, einmal mit PBS/BSA/EDTA gewaschen, durch Filtration durch Celltrics von Aggregaten befreit und auf eine Zellkonzentration von ca. 1x10⁸/ml eingestellt. Abweichend von diesem Standardprotokoll wurden Zellen mit Chemokin-Rezeptor-Antikörpern (CCR5 und CCR7) für 20 min bei 37°C bzw. mit Interleukin-Rezeptor-Antikörpern (IL-18R) für 45 min bei 4°C inkubiert. Wie in 2.6.1.4 beschrieben, wurden Zytokin-sezernierende Th Zellen, die mittels anti-Zytokin-PE-Antikörpern markiert wurden, in einigen Experimenten ebenfalls mit Hilfe der FACS Technologie nach vorangegangenem MACS-Schritt angereichert.

2.7 Stimulation von Th Zellen

2.7.1 Stimulation durch α CD28 und/oder α CD3

Die Stimulation von Th Zellen durch Quervernetzung („crosslinking“) der Oberflächenmoleküle CD28 und/oder CD3 erfolgte mittels α CD28- und/oder α CD3-beschichteter („gecoateter“) 96-Loch Zellkultur-platten mit rundem Boden oder FACS-Tubes und anschließender Ausplattierung der Zellen. Zur Beschichtung wurden die Antikörper in PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt und 100ul bzw. 250ul in 96-Loch-Platten bzw. FACS-Tubes überführt. Die Inkubation erfolgte entweder für 3-4h bei 37°C oder ü.N. bei 4-8°C. Unmittelbar vor Kultivierung

der Zellen wurde die Antikörper/PBS-Lösung vorsichtig abpipettiert und die Löcher zweimal mit PBS gewaschen. Alternativ zur Beschichtung der Kulturgefäße wurden die Antikörper löslich zum Kulturmedium zugegeben.

2.7.2 Antigen-spezifische Stimulation und Generierung Antigen-spezifischer Th-Zelllinien

2.7.2.1 Isolierung CMVpp65-spezifischer Th-Zellen

Zur hohen Anreicherung Antigen-spezifischer Th1-Zellen, deren TCR spezifisch für pp65, ein immundominantes Protein des Cytomegalovirus (CMV) ist, wurde eine Kombination aus IFN γ -Sekretionsassay (2.6.1.4) mit anschließender Sortierung der PE-markierten Zellen per FACS (2.6.2.1) verwendet. Dazu wurden PBMC aus ca. 50ml Vollblut eines CMV-positiven, gesunden Spenders für 6h mit 10 μ g/ml rekombinantem, im Baculovirussystem synthetisierten CMVpp65 (Imtec, Deutschland) in der Gegenwart von 1 μ g/ml α CD28-Antikörper in Medium mit 10% AB-Serum stimuliert. α CD28 bewirkt nach Bindung an CD28 auf der T-Zell-Oberfläche und Quervernetzung durch Antigen-präsentierende Zellen eine ausreichende Kostimulation, die innerhalb von 6h nicht durch APZs allein erreicht wird. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen 2x in PBS/BSA/EDTA gewaschen und anschließend ein Zytokin-Sekretionsassay durchgeführt, mit dem die IFN γ produzierenden Zellen innerhalb der PBMC markiert wurden. Nach einer MACS-Anreicherung über eine LS+ -Säule wurden nach Anfärbung mit Antikörpern gegen CD4 und den Aktivierungsmarker CD69 sowie PJ-Zugabe die lebenden, aktivierten CD4⁺CD69⁺IFN γ -PE⁺ Th Zellen am FACS Aria isoliert.

2.7.2.2 Expansion der CMVpp65-spezifischen Th Zellen

Da nach Sortierung der angereicherten CMVpp65-spezifischen IFN γ -Produzenten mit typischerweise ca. 5x10³-5x10⁴ zu wenige Zellen für weitere Analysen zur Verfügung standen, wurden diese innerhalb von 10-14 Tagen um einen Faktor von durchschnittlich 10⁴ expandiert. Dazu wurden den Th-Zellen direkt nach Isolierung mit 30 Gray bestrahlte „Feeder“-Zellen in 50-fachem Überschuß hinzugefügt, die aus

der IFN γ -negativen PBMC-Fraktion nach der magnetischen Voranreicherung bestanden. Zusätzlich wurden der Kultur die Wachstumsfaktoren IL-7 und IL-15 zu je 25ng/ml zugegeben.

2.7.3 Stimulation durch Zytokine und Chemokine

Die Stimulation von Th Zellen durch Zytokine und Chemokine (Tab. 2.6) erfolgte durch Zugabe der Faktoren in das Kulturmedium, typischerweise in einer Konzentration von 25ng/ml, wenn nicht anders im Ergebnisteil bezeichnet.

Tabelle 2.6: Eingesetzte Cytokine und Chemokine

Name	Hersteller
Interleukin-1 β (IL-1 β)	Mobitec, Deutschland
Interleukin-2 (IL-2)	Roche Diagnostics, Deutschland
Interleukin-4 (IL-4)	Strathmann, Deutschland
Interleukin-6 (IL-6)	R&D Systems, USA
Interleukin-7 (IL-7)	R&D Systems, USA
Interleukin-8 (IL-8)	Mobitec, Deutschland
Interleukin-10 (IL-10)	R&D Systems, USA
Interleukin-12 (IL-12)	Strathmann, Deutschland
Interleukin-15 (IL-15)	R&D Systems, USA
Interleukin-17 (IL-17)	Mobitec, Deutschland
Interleukin-18 (IL-18)	Strathmann, Deutschland
Monocyte Inflammatory Protein α (MIP1 α)	Mobitec, Deutschland
Tumor Necrosis Factor α (TNF α)	Strathmann, Deutschland

2.7.4 Inhibitoren

Zur pharmakologischen Charakterisierung von Signaltransduktionswegen in Th-Zellen wurden Inhibitoren (Tab. 2.7) verwendet, die Zielmoleküle blockieren und so die Signalfortleitung hemmen.

Tabelle 2.7: Verwendete Signaltransduktionsinhibitoren

Name	Zielmolekül	Hersteller
CyclosporinA (CsA)	Kalzineurin	Calbiochem, USA
SB202190	p38	Sigma Aldrich, Deutschland
SB203580	p38	Sigma Aldrich, Deutschland
JAK3 Inhibitor I	JAK3	Calbiochem, USA
Wortmannin	PI3-K	Calbiochem, USA
PD98059	MEK/Erk	Calbiochem, USA

2.7.5 Suppression von Zytokinproduktion in Th Zellen durch Kokultur mit CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs)

In Suppressionsansätzen wurde der Einfluß von natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen auf die Zytokinproduktion von CD4⁺CD25⁻ Effektorzellen untersucht. Dazu wurden sortierte CD4⁺ Th Zellen mit Fluorochromen gegen CD4, CD25, IL-18R α und CD45RA angefärbt. Mittels FACS wurden dann zunächst die CD25 hoch exprimierenden CD4⁺ Tregs, die typischerweise 1-2% der CD4⁺-Fraktion ausmachen, sowie die CD25⁻ Th Zellen sortiert. Letztere wurden anhand von IL-18R α -Expression nach „gating“ auf CD45RA-negative Gedächtniszellen in IL-18R α ⁺ und IL-18R α ⁻ Populationen weitersortiert. Zur späteren Identifizierung der CD25⁻IL-18R⁺ Effektor Th-Zellen in Kokulturansätzen wurden diese wie beschrieben mit CFDA-SE angefärbt (2.5.1.3). Die regulatorischen T-Zellen wurden unmittelbar nach der Sortierung in mit α CD3 (Beschichtung mit 10 μ g/ml für 3h bei 37°C) beschichtete FACS-Röhrchen in der Gegenwart von 1000U/ml IL-2 überführt und für 16-24h voraktiviert. Der Einfluß von CD25⁺ Tregs wurde untersucht, indem CFDA⁺CD25⁻ Effektorzellen in 96-Loch-Platten mit rundem Boden entweder 1:1 mit CD25⁻CFDA⁻ Effektorzellen (Kontrolle) oder regulatorischen T Zellen in Gegenwart eines TCR- oder Zytokin-Stimulus kultiviert wurden. Dazu wurde in einigen Experimenten dieselbe Anzahl an CD14⁺ Monozyten (s. 2.6.1.3) als akzessorische Zellen hinzugefügt. Am Ende der Kultur wurden die Zellen fixiert und die IFN γ -Produktion der Effektorzellen durchflußzytometrisch untersucht.

2.8 SDS-PAGE und Western Blot

Der Western-Blot dient der Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen. Nach größenabhängiger elektrophoretischer Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (SodiumDodecylSulphate-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) werden diese auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers. Der gebundene proteinspezifische erste Antikörper wird durch einen zweiten anti-Isotyp-spezifischen Antikörper, der Peroxidase-(=HRP-) gekoppelt ist, detektiert.

Die Methode wurde zur Analyse der Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und Enzyme eingesetzt. Dazu wurden Th Zellen in Laemmli-Puffer (Biorad, Deutschland) lysiert und die Proteine über ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurde ü.N. ein Western Blot auf Nitrozellulose-Membran (Schleicher&Schüll, Deutschland) im Tanksystem von Biorad („wet blot“, Biorad) durchgeführt, gefolgt von Inkubation in 5%iger Blockierungs-Lösung für 1h. Daraufhin erfolgte eine Inkubation ü.N. in 5%iger Blockierungs-Lösung, der der Primärantikörper zugesetzt wurde; nach 3-maligem Waschen in TBST schloß sich die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper in Blockierungs-Puffer an, der nach 3-maligem Waschen in TBST die Detektion unter Verwendung von Chemolumineszenz-Reagenz (Amersham, USA) folgte. Die angefärbten Proteinbanden wurden in einem digitalen CCD-Scanner (LAS-3000, Fuji, Japan) visualisiert.

2.9 Quantifizierung von Zytokinen in Zellkulturüberständen

Als Alternative zur ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbant Assay)-Technik zur Quantifizierung von Proteinen in Zellkulturüberständen wurde die CBA-Technologie (BD, USA) verwendet, um synchron mehrere Zytokine in Überständen gleichzeitig zu messen. Mit dem verwendeten Produkt konnten IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ und TNF α detektiert werden. Der CBA beinhaltet 6 verschiedene mit Antikörpern gegen das jeweilige Zytokin gekoppelte Polystyrol-Partikel, die sich in ihrer Autofluoreszenz um jeweils etwa eine halbe log-Stufe unterscheiden. Wird eine Partikelmischung mit Zellkulturüberständen inkubiert, binden die Zytokine spezifisch an die Antikörper-konjugierten Partikel; ein zweiter PE-gekoppelter „Sandwich“-Antikörper markiert das gebundene Protein. Im Durchflusszytometer ist es nun einerseits möglich, die verschiedenen Partikel anhand Ihrer Autofluoreszenz im FL-1-Kanal den jeweiligen Zytokinen zuzuordnen; weiterhin korreliert die Helligkeit des gebundenen PE-Antikörpers mit der Menge an gebundenem Protein. Mittels einer Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration können nun die in der Probe enthaltenen Proteine in einem Konzentrationsbereich von ca. 10-5000 pg/ml quantifiziert werden. Die Auswertung erfolgte mittels eines von BD bezogenen Zusatzmoduls für MicrosoftExcel zur direkten Quantifizierung der unbekanntenen Proben.

2.10 Statistische Auswertung

Die Analyse der Koexpression von 4-1BB auf synovialen IFN γ -produzierenden Th-Zellen wurde statistisch ausgewertet. Die Aussage über die Signifikanz wurde mit dem Programm Prism 4.0 nach Durchführung eines Wilcoxon matched pairs tests getroffen, da es sich bei dem Vergleich um verbundene Werte handelte. Als signifikant galt, wenn $p < 0,05$ war.