

## **3        METHODEN**

### **3.1       Primäre T-Zellkultur**

Primärzellen sind Zellen, die frisch aus dem Gewebe isoliert werden und unter Kulturbedingungen eine begrenzte Lebensdauer besitzen. Sie haben den Vorteil, daß sie bezüglich ihrer Aktivitäten und Funktionen ein physiologischeres Bild als immortalisierte Zell-Linien widerspiegeln. Primäre T-Lymphozyten wurden sowohl in den Kollagen- als auch in den Membran-Kokulturen eingesetzt. Diese Kokulturversuche stellen geeignete Modellsysteme dar, um komplexe Vorgänge und Regulationsmechanismen vereinfacht zu betrachten und aufzuklären. Zusätzlich zu den *in vitro* Untersuchungen wurden Läsionsexperimente mit injizierten primären T-Zellen durchgeführt, um die Ergebnisse *in vivo* zu ergänzen bzw. zu bestätigen.

#### **3.1.1     Versuchstiere**

Die primären T-Zellen wurden aus T-Zell-Rezeptor (TCR)-transgenen Tieren gewonnen. Die transgenen DO11.10 Tiere, deren TCR antigenspezifisch für Ovalbumin (OVA) ist (Murphy et al., 1990; Lohning et al., 1998), wurden vom Deutschen Rheumaforschungszentrum zur Verfügung gestellt. Da es sich um einen heterozygoten Mausstamm handelt, erfolgte der Test auf Transgenität mit der dort etablierten Standardmethode (RT-PCR). Der genetische Hintergrundstamm dieser Tiere ist der BALB/c Mausstamm.

Die transgenen TG4 Mäuse, deren T-Zellen einen autoantigenspezifischen Rezeptor für das myelinbasierte Protein (MBP) tragen (Lui et al., 1995), stammten von David Wraith aus Bristol und wurden in der Tierhaltung des Institutes für Anatomie gezüchtet. Da es sich auch hier um einen heterozygoten Mausstamm handelt, wurden die Tiere im Alter von 6 bis 8 Wochen mittels FACS-Analyse auf ihre Transgenität getestet. Der genetische Hintergrundstamm dieser transgenen Tiere ist der B10.PL Mausstamm.

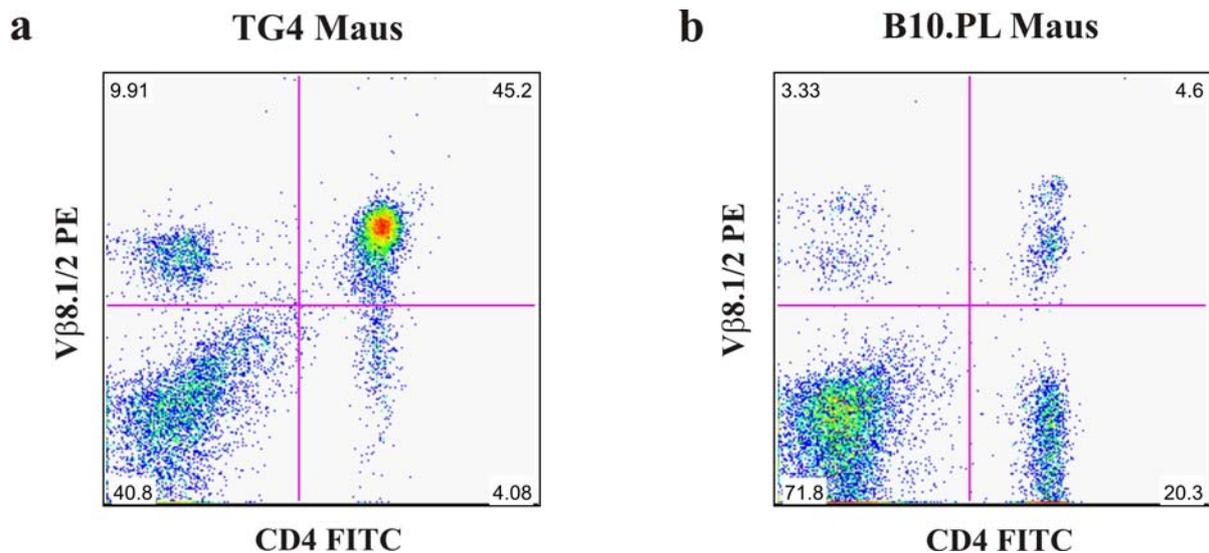
#### **3.1.2     Test auf Transgenität**

Um die TG4 Tiere auf ihre Transgenität zu testen, wurden jeder Maus 50 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen und in 500 µl 2 mM EDTA aufgenommen. Als Kontrolltiere dienten B10.PL Mäuse. Diese Lösungen wurden jeweils mit 500 µl Histopaque-1083 unterschichtet, um einen Dichtegradienten zu erzeugen und die Erythrozyten von den peripheren-Blut-mononukleären-Zellen (PBMCs) zu trennen, und anschließend 20 min bei

2000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Danach wurde bei allen Proben der sich an der Phasengrenze befindende Lymphozytenring vorsichtig abpipettiert und in 1ml FACS-Puffer in einem FACS-Röhrchen aufgenommen. Nach einem Waschschrift (1200 rpm, 5 min, 4°C) wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit zwei verschiedenen Antikörpern doppelt gefärbt. Alle Färbungen erfolgten in einem Volumen von 50 µl FACS-Puffer. Der direkt mit Fluoresceine Isothiocyanate (FITC) gekoppelte CD4-Antikörper (1 µg/ml) wurde für die Färbung aller CD4+ T-Zellen und der biotinylierte Vβ8.1/2-Antikörper (1 µg/ml) für die Markierung des MBP-spezifischen Rezeptors verwendet. Alle Proben wurden gevortext und 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden alle FACS-Röhrchen mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt, gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C) und die Überstände dekantiert. Da der Vβ8.1/2-Antikörper nicht direkt an eine Fluoreszenz gekoppelt war, erfolgte bei diesen Proben die Detektion mit dem sekundären Antikörper Phycoerythrin (PE; 0,5 µg/ml) über eine Avidin-Streptavidin-Reaktion. Die Proben wurden gevortext, 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert, anschließend noch einmal mit 1ml FACS-Puffer aufgefüllt und gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C). Nach Dekantierung der Überstände wurden die Zellpellets in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und gevortext.

Die Messung der Zellen erfolgte an einem FACS Calibur-Gerät. Zum Einstellen der optimalen Meßbedingungen wurden die ungefärbten bzw. einzeln gefärbten Proben der Kontrolltiere B10.PL (ungefärbt, CD4 FITC, Vβ8.1/2 PE, PE und die Doppelfärbung CD4 FITC/Vβ8.1/2 PE) verwendet.

Abb. 3.1 zeigt die typischen Verteilungsmuster von Lymphozyten einer positiv transgenen TG4 Maus im Vergleich zu einer negativen B10.PL Maus. Im linken unteren Quadranten ist jeweils die Autofluoreszenz der Zellen dargestellt. Der linke obere Quadrant zeigt nur Vβ8.1/2+ Zellen, der rechte untere Quadrant hingegen nur CD4+ Zellen. Bei der positiv transgenen TG4 Maus befindet sich der größte Teil der Zellen im rechten oberen Quadranten (45,2 %), der doppelt markierte Zellen darstellt. Fast alle CD4+ T-Zellen tragen somit den antigenspezifischen Rezeptor für MBP. Bei der negativen B10.PL Maus sind dagegen nur sehr wenige Zellen doppelt gefärbt (4,6 %). Die meisten CD4+ T-Zellen besitzen den MBP-spezifischen Rezeptor also nicht.



**Abbildung 3.1:** Test auf Transgenität. Die aus dem Blut von TG4 Mäusen und B10.PL Mäusen isolierten Lymphozyten wurden mit spezifischen Antikörpern gegen CD4 und V $\beta$ 8.1/2 doppelt gefärbt und anschließend mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Die Markierung von CD4 diente der Identifizierung von CD4+ T-Helferzellen. V $\beta$ 8.1/2 wurde zur Markierung des MBP-spezifischen Rezeptors verwendet. Im rechten oberen Quadranten befinden sich die doppelt gefärbten Zellen, d.h. die CD4+ T-Zellen, die den spezifischen Rezeptor für MBP tragen.

(a) TG4 Maus, (b) B10.PL Maus.

### 3.1.3 Präparation und Restimulation primärer T-Zellen

Zur Gewinnung primärer T-Zellen wurden 8 bis 12 Wochen alte Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, um anschließend die Milzen sowie die axillären, inguinalen, zervikalen und dermalen Lymphknoten zu entnehmen. Das isolierte Gewebe von je zwei Tieren wurde in 10 ml Präparationsmedium aufgenommen, unter sterilen Bedingungen durch ein 70  $\mu$ m Nylon-Zellsieb gedrückt und einmal gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C). Nach Dekantierung des Überstandes erfolgte die Lyse der Erythrozyten, indem das Zellpellet in 5 ml frisch angesetztem Lysepuffer (siehe 2.12) aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 15 ml Präparationsmedium gestoppt. Nach einem Waschschrift (1200 rpm, 5 min, 4°C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 40 ml Präparationsmedium aufgenommen und die Zellzahl ermittelt (siehe 3.1.6). Die weitere Aufarbeitung der Zellen erfolgte nun in Abhängigkeit der verschiedenen Kokulturerperimente.

Einerseits wurden die Zellen aus TG4 transgenen Tieren mit Hilfe der magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) sofort auf CD4+ Lymphozyten selektioniert (siehe 3.1.4) und als naive T-Zellen, die noch keinen Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hatten und somit unaktiviert blieben, in den Kollagen-Kokulturen eingesetzt.

Andererseits wurde die Zellsuspension nach dem Zählen noch einmal gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in Inkubationsmedium mit einer Endkonzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen. Die Zellen wurden dann mit den entsprechenden TCR-spezifischen Peptiden stimuliert und somit aktiviert:

<b>Tiere</b>	<b>Stimulation von</b>	<b>Zusätze</b>
TG4 transgen	MBP-spezifischen T-Zellen	MBP Ac1-11 (4 µg/ml)
DO11.10 transgen	OVA-spezifischen T-Zellen	cOVA 323-339 (1 µg/ml)
B10.PL	unspezifischen T-Zellen	ConA (1 µg/ml)

**Tabelle 3.1:** Stimulation der antigenspezifischen und unspezifischen T-Zellen.

Die gerichtete Ausdifferenzierung der T-Zellen in die Subpopulationen Th1 und Th2 erfolgte durch Zugabe folgender Faktoren zum Inkubationsmedium:

<b>Th1-Zellen</b>	<b>Th2-Zellen</b>
Interleukin-12 (1 ng/ml)	Interleukin-4 (200 U/ml)
Anti Interleukin-4 (1 µg/ml)	Anti Interleukin-12 (1 µg/ml)

**Tabelle 3.2:** Differenzierung der T-Zellen in die Subpopulationen Th1 und Th2.

Die Zellen wurden in 6 well-Platten (4 ml/well) in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur Verstärkung der T-Zell-Proliferation erfolgte am Tag 2 bis 3 nach Präparation die Zugabe des Wachstumsfaktors Interleukin-2 (25 U/ml) zum Inkubationsmedium. Die weitere Proliferation und Morphologie der T-Zellen wurde durch die tägliche lichtmikroskopische Beobachtung der Zellen beurteilt. Eine starke Proliferation der Zellen ist durch die Ausbildung von Proliferationsclustern sowie eine hohe Dichte blastischer Zellen gekennzeichnet. In diesem Fall wurden die Zellen am Tag 4 bis 5 nach Präparation im Verhältnis 1:2 geteilt und frisches Inkubationsmedium zugesetzt. Bei einer weniger starken Proliferation erfolgte nur die Zugabe von Inkubationsmedium.

Am Tag 7 bis 9 nach Präparation erreichten die T-Zellen einen ruhenden Status, d.h. es waren keine Proliferationscluster, aber ein mit abgerundeten Zellen dicht bedeckter Plattenboden zu erkennen.

Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Restimulation der T-Zellen, d.h. eine erneute Präsentation des entsprechenden Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (APCs). Zur Gewinnung dieser Zellen wurden Milz- und Thymusgewebe des jeweiligen genetischen Hintergrundstammes B10.PL oder BALB/c präpariert und nach oben beschriebener Methode aufgearbeitet. Die Inaktivierung der APCs konnte durch eine Bestrahlung mit 30 gray (5000 rad) erreicht werden. Werden Zellen auf diese Weise radioaktiv bestrahlt, kommt es zu Doppelstrangbrüchen in der DNA und somit zum Verlust der Teilungsfähigkeit. Die antigenpräsentierenden Eigenschaften bleiben zunächst jedoch erhalten.

Die primären T-Lymphozyten Th1 und Th2 (Responder-Zellen) wurden getrennt gepoolt und gezählt, anschließend gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C) und nach Dekantieren des Überstandes zusammen mit den APCs in frischem Inkubationsmedium aufgenommen. Die Konzentrationen wurden auf ein Verhältnis 1:3, d.h.  $1,3 \times 10^6$  Responder-Zellen und  $2,7 \times 10^6$  APCs/ml Inkubationsmedium eingestellt.

Die spezifische oder unspezifische Restimulation der Th1- und Th2-Zellen erfolgte durch erneute Zugabe der Antigene (myelinbasisches Protein (MBP), Ovalbumin (OVA), Concanavalin A (ConA)) sowie durch Zugabe der entsprechenden Zytokine (IL-4, IL-12) und Antikörper (anti IL-4, anti IL-12) zum Inkubationsmedium.

Die Zellen wurden in 24 well-Platten (2 ml/well) in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 2 Tage inkubiert.

### **3.1.4 Aufreinigung der T-Zellen**

Die kultivierten CD4<sup>+</sup> Zellen wurden nun mittels der magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) von den übrigen Zellen in der Zellkultur abgetrennt.

Das MACS-System arbeitet mit submikroskopisch kleinen, super-paramagnetischen, antikörpergekoppelten Kügelchen (MACS-Beads), die keinen Einfluß auf die Funktion der Zellen ausüben (Schumm et al., 1999). Hierbei wird das Zelleluat über eine sterile Säule geleitet, die sich in einem Magneten befindet. Zellen, die mit einem Antikörper markiert sind, werden in diesem Magnetfeld zurückgehalten, unmarkierte fließen hindurch. Es wird zwischen einer Positiv- und einer Negativselektion unterschieden. Bei der Positivselektion erfolgt eine Markierung der Zellen, die man von den übrigen Zellen abtrennen und aufreinigen möchte. Hierfür wird die Säule nach dem Durchlaufen des Eluats aus dem Magnetfeld entfernt und die markierten Zellen werden mit einem Stempel aus der Säule gedrückt. Bei der Negativselektion hingegen erfolgt eine Markierung aller übrigen Zellen, die

somit in der Säule zurückgehalten werden. Die gewünschten Zellen, die man aufreinigen möchte, passieren die Säule und können aufgefangen werden.

Um CD4<sup>+</sup> Zellen nach diesem Prinzip zu selektionieren, wurden die MBP- und OVA-spezifischen sowie die unspezifisch mit ConA aktivierten Th1- und Th2-Zellen 48 h nach der Restimulation getrennt gepoolt und gezählt. Dann erfolgten ein Waschschrift (1200 rpm, 5 min, 4°C) und die Dekantierung des Überstandes. Jedes Zellpellet wurde nun in 5 ml eiskaltem MACS-Puffer aufgenommen und erneut gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C). Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte die Antikörperzugabe. Dem Prinzip der Negativselektion folgend, wurden nachstehend aufgeführte antikörpergekoppelten MACS-Beads für die CD4-Selektion verwendet: anti CD8a, anti CD11b und anti CD45R. Zu  $1 \times 10^7$  Zellen wurden 10 µl jedes Antikörpers, mit MACS-Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt, gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 4°C erfolgte die Zugabe von 5 ml MACS-Puffer zu jeder Probe und ein weiterer Waschschrift. Danach wurden die LS-Säulen mit einer Bindungskapazität von  $1 \times 10^8$  Zellen in den MidiMACS-Magneten eingebracht und mit je 3 ml MACS-Puffer gespült. Jedes Zellpellet wurde nun in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und vorsichtig auf eine Säule gegeben. Anschließend wurde jede Säule dreimal mit je 1 ml MACS-Puffer gespült. Da es sich um eine Negativselektion handelte, wurde das Eluat aus jeder Säule aufgefangen und die darin enthaltene Zellzahl ermittelt. Ein Teil der Zellen wurde für eine FACS-Analyse entnommen, um den Reinheitsgrad von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu bestimmen. Nachdem die T-Zellen noch einmal gewaschen wurden, erfolgte die Einstellung auf die gewünschten Konzentrationen. Die CD4<sup>+</sup> Th1- und Th2-Zellen konnten nun in den Kollagen- und Membran-Kokulturen sowie in den *in vivo* Läsionsexperimenten eingesetzt werden.

### **3.1.5 Charakterisierung der T-Zellen**

Die Th1- und Th2-Lymphozyten wurden nach der Restimulation sowohl auf mRNA- und Protein-Ebene als auch mit Hilfe der Durchflußzytometrie bezüglich ihres spezifischen Zytokin- und Neurotrophin-Expressionsmusters und ihres Aktivierungsstatus untersucht.

#### **3.1.5.1 ELISA-Analyse**

Für die Analyse der Zytokine wurden die OptEIA ELISA Kits der Firma BD Pharmingen und zur Detektion der Neurotrophen Faktoren die Emax ImmunoAssay Systeme der Firma

Promega eingesetzt. Die Proteinbestimmungen erfolgten aus den Zellkulturüberständen nach Anweisungen der Hersteller.

Ein ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein serologischer Test, der häufig in der biologischen, medizinischen und immunologischen Forschung sowie in der Diagnostik verwendet wird. Ein Sandwich-ELISA weist mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit die Verknüpfung zweier monoklonaler Antikörper nach, die mit verschiedenen Epitopen auf einem Proteinmolekül reagieren. Zuerst werden unmarkierte capture-Antikörper an einen Kunststoffträger gebunden. Nach Hinzufügen des zu vermessenden Zellkulturüberstandes und einem anschließenden Waschschrift läßt sich das gebundene Protein durch einen zweiten, markierten detecture-Antikörper, der gegen ein anderes Epitop des Antigens gerichtet ist, nachweisen. Hierfür ist der detecture-Antikörper an ein Enzym, die Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nach Zugabe eines Chromogens, welches mit Hilfe des Enzyms und ebenfalls zugesetztem Wasserstoffperoxid zu einem Farbstoff oxidiert wird, kann die Antigenkonzentration anhand der Farbintensität in einem ELISA-Reader bestimmt werden. Durch das Mitführen von Standardproben bekannter Konzentrationen wird eine Referenzgerade erstellt und mit Hilfe dieser Gerade die Proteinkonzentration errechnet.

Folgende Proteinbestimmungen wurden nach dieser Methode durchgeführt:

<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>
IFN- $\gamma$	pro-inflammatorisches Zytokin, Markerzytokin der Th1 Zellen
IL-4	anti-inflammatorisches Zytokin, Markerzytokin der Th2 Zellen
IL-10, TGF- $\beta$	regulatorische Zytokine
TNF- $\alpha$	pro-inflammatorisches und zytotoxisches Zytokin
NT-3, NT-4, NGF, BDNF	Neurotrophe Faktoren, Wachstumsfaktoren

**Tabelle 3.3:** Untersuchte Proteine und ihre Funktionen.

Dafür wurden die Überstände MBP- und OVA-spezifischer Th1- und Th2-Zellkulturen an den Tagen 1 bis 7 nach Restimulation abgenommen und bis zur Messung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Da die Ausdifferenzierung der Th2-Zellen unter Zugabe von IL-4 zum Inkubationsmedium erfolgte und dies zu einer Verfälschung der gemessenen IL-4-Konzentration führt, wurde für die Detektion dieses Zytokins ein Teil der Th2-Zellen am Tag 2 nach Restimulation gepoolt, gezählt und gewaschen (1200 rpm, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Anschließend wurde das Zellpellet mit einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml in frischem Inkubationsmedium, das mit anti IL-12, IL-2

und dem entsprechenden Antigen (MBP, OVA) versetzt war, aufgenommen und für einen weiteren Tag im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und ebenfalls bis zur Messung bei –80°C aufbewahrt. Die so ermittelte IL-4-Konzentration entsprach allein der Menge, die von den Th2-Zellen freigesetzt wurde.

### **3.1.5.2 mRNA-Analyse**

Um die Zytokin-Expression der T-Zellen auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurden MBP-spezifische T-Zellen wie unter 3.1.3 beschrieben präpariert, restimuliert und in die Subpopulationen Th1 und Th2 ausdifferenziert. 48 h nach der Restimulation wurden die Zellen getrennt gepoolt, mit der MACS-Methode (siehe 3.1.4) aufgereingt, gezählt und als Zellpellet bei –80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Für die Analyse der Neurotrophin-Expression erfolgte die Restimulation der Th1- und Th2-Zellen mit PMA (5 ng/ml) und Ionomycin (1 µg/ml). Nach 6 h wurden diese Zellen ebenfalls gepoolt, aufgereinigt, gezählt und bis zur RNA-Präparation bei –80°C gelagert. Als Kontrolle diente mRNA aus Gehirngewebe von neugeborenen B10.PL Mäusen.

#### **3.1.5.2.1 RNA-Isolation**

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus T-Zellen und Mausgehirn erfolgte unter Verwendung des Stratagene Absolutely RNA Miniprep Kits nach Anweisungen des Herstellers. Dieses Kit ermöglicht eine schnelle und reine Isolation der totalen RNA aus geringen Zellkonzentrationen (Dolter und Braman, 2001). Für die RNA-Präparation wurden  $1 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen je Probe und 100 mg Gehirngewebe in jeweils 200 µl Lysepuffer mit 2-Mercaptoethanol aufgenommen. Die Zusammensetzung des Lysepuffers verhindert die Degradierung der RNA durch RNase (Chirgwin et al., 1979) und beschleunigt die Homogenisierung und Lyse der Zellen bzw. des Gewebes. Das Lysat wurde dann mit Ethanol gemischt und auf die Filtermatrix (Vogelstein und Gillespie, 1979) gegeben. Nach mehreren Waschschritten und einer DNase I-Behandlung der Filtermembran wurde die aufgereinigte totale RNA mit 2x25 µl Elutionspuffer vom Filter eluiert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurden je 2 µl der Proben mit 8 µl Wasser und 5 µl 5x RNA-Ladepuffer gemischt, auf ein 1,5 % iges Agarose-Gel (siehe 3.1.5.2.4) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend dokumentiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei –80°C aufbewahrt.

### 3.1.5.2.2 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wird die zuvor aus den T-Zellen und dem Gehirngewebe isolierte Gesamt-RNA revers in eine einsträngige cDNA umgeschrieben, welche anschließend in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt werden kann.

Zunächst wurde zusätzlich zum DNA-Verdau während der RNA-Isolation ein weiterer DNA-Verdau durchgeführt, um mögliche Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA zu beseitigen. Dafür wurden je Probe 2 µg totale RNA in Millipore Typ I Wasser in einem Gesamtvolumen von 19 µl aufgenommen. Nach Zugabe von 2 µl oligo dT-Primern wurden alle Proben gemischt und kurz abzentrifugiert. Zur Beseitigung von Sekundärstrukturen wurden die Ansätze für 10 min bei 75°C im Thermocycler inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gestellt. Zu jeder Probe wurde folgender Mix von 17,5 µl gegeben und vorsichtig gemischt:

#### Einfacher cDNA-Synthese-Ansatz

8 µl	5x First Strand Buffer (FSB)
4 µl	Dithiothreitol (DTT; 0,1 M)
4 µl	dNTP (2,5 mM)
1 µl	DNase (2 U/µl)
0,5 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)

Alle Proben wurden nun für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach folgten die Inaktivierung der DNase bei 75°C für 5 min und ein zweiminütiges Abkühlen der Proben auf Eis. Zu jedem Ansatz wurden 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) und 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) gegeben. Nun erfolgte die eigentliche cDNA-Synthese für 60 min bei 42°C. Um eine Verunreinigung der RNA durch genomische DNA auszuschließen, wurden jeweils Kontrollreaktionen ohne Zugabe der Reversen Transkriptase angesetzt (RT-Negativkontrollen). Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben nach der Synthese für 5 min auf 94°C erhitzt und abschließend auf 4°C abgekühlt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.1.5.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines bestimmten DNA-Bereiches. Man benötigt für diese Vervielfältigung zwei spezifische Primer, die so gewählt sind, daß sie den zu amplifizierenden DNA-Bereich einrahmen und sich jeweils an einen der beiden DNA-Stränge spezifisch anlagern. Im ersten Reaktionszyklus wird die DNA durch starkes Erhitzen in Einzelstränge gespalten (Denaturierung). Anschließend werden die beiden Primer bei einer für sie spezifischen Temperatur angelagert (Annealing). Mit Hilfe der DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) und in Gegenwart von dNTPs erfolgt nun die Synthese des Doppelstrangs (Extension). Als Produkt erhält man zwei neue, doppelsträngige DNA-Moleküle. Durch Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte (Denaturierung, Annealing, Extension) über mehrere Zyklen kommt es zur exponentiellen und selektiven Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen.

Um die aus der Gesamt-RNA synthetisierte cDNA zu überprüfen, wurde zunächst eine PCR mit  $\beta$ -Aktin-Primern (house-keeping Gen) durchgeführt. Anschließend folgte die Analyse der Zytokine und der Neurotrophen Faktoren aus Th1- und Th2-Zellen sowie aus Gehirngewebe. Jede PCR wurde im MJR Peltier Gradient Thermocycler unter Verwendung folgender Angaben durchgeführt:

#### Einfacher PCR-Ansatz

17,9 $\mu$ l	Millipore Typ I Wasser
2,5 $\mu$ l	10x PCR-Puffer II
1,5 $\mu$ l	MgCl <sub>2</sub> (5 mM)
1,0 $\mu$ l	dNTPs (2,5 mM)
0,5 $\mu$ l	Forward Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
0,5 $\mu$ l	Reverse Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
0,1 $\mu$ l	Taq DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
1,0 $\mu$ l	cDNA-Template

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1.	Denaturierung	95°C	5 min	1
2.	Denaturierung	95°C	20 s	39
3.	Annealing	55-64°C	20 s	
4.	Extension	72°C	30 s	
5.	Final Extension	72°C	5 min	1
6.	Kühlung	4°C	unendlich	1

**Tabelle 3.4:** PCR-Programm für Primer-Produkte < 400 bp.  $\beta$ -Aktin, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 und IL-10.

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1.	Denaturierung	95°C	5 min	1
2.	Denaturierung	95°C	30 s	39
3.	Annealing	57°C	30 s	
4.	Extension	72°C	40 s	
5.	Final Extension	72°C	5 min	1
6.	Kühlung	4°C	unendlich	1

**Tabelle 3.5:** PCR-Programm für Primer-Produkte > 400 bp. TGF-1 $\beta$ .

	Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
1.	Denaturierung	95°C	3 min	1
2.	Denaturierung	95°C	30 s	39
3.	Annealing	55-57°C	1 min	
4.	Extension	72°C	1 min	
5.	Final Extension	72°C	5 min	1
6.	Kühlung	4°C	unendlich	1

**Tabelle 3.6:** PCR-Programm für Primer der Neurotrophen Faktoren. NGF, BDNF, NT-3 und NT-4.

Die gesamte PCR-Reaktion (25  $\mu$ l) wurde mit 5  $\mu$ l Xylencyanol- oder Bromphenolblau-Ladepuffer gemischt. Davon wurden 20  $\mu$ l auf ein 1,5 % iges Agarose-Gel (siehe 3.1.5.2.4) aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend dokumentiert. Durch das

Mitführen eines 100 bp-Markers während des Gellaufs konnte die korrekte Größe der amplifizierten Produkte ermittelt werden.

#### **3.1.5.2.4 Agarose-Gelelektrophorese**

Für die qualitative Überprüfung der isolierten mRNA und der amplifizierten DNA wurden 1,5 % ige Agarose-Gele angefertigt. Dabei wurde die Agarose in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, mit Ethidiumbromid (20 µg/100 ml) versetzt und anschließend in der Gelkammer auspolymerisiert. Die Elektrophorese fand je nach Gelgröße für 30 bis 60 min bei 80 bis 120 V in TBE-Puffer, ebenfalls mit Ethidiumbromid versetzt, statt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung konnten die einzelnen mRNA-Untereinheiten und DNA-Fragmente anhand des fluoreszierenden, interkalierenden Ethidiumbromids im UV-Licht detektiert und mit Hilfe eines Gel Imaging Systems digital ausgewertet werden.

#### **3.1.5.3 FACS-Analyse**

Die Aktivitätsbestimmung der T-Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Dabei werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert und anschließend im FACS (Fluorescence activated cell sorting)-Gerät charakterisiert. Hierzu wird die Zellsuspension durch eine Fließkammer geleitet und die so erhaltenen Einzelzellen gelangen in den Strahlengang zweier Laser. Photomultiplikatoren messen die Streuung des Laserlichts. Neben Größe und Granularität (Kern/Plasma-Verhältnis) der Zellen kann auch deren Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Dabei korreliert die Intensität der Fluoreszenz mit der Antigendichte. Diese Methode ermöglicht sowohl die Detektion von Zelloberflächenmolekülen als auch von intrazellulären Faktoren.

Für die Charakterisierung der Th1- und Th2-Zellen wurden an den Tagen 1 und 2 nach Restimulation  $1 \times 10^6$  Zellen je Probe aus der MBP-spezifischen Zellkultur entnommen und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C). Nach Dekantierung des Überstands wurde das Zellpellet mit zwei Antikörpern doppelt markiert. Als Kontrollen dienten ungefärbte und einzeln gefärbte Proben. Jede Färbung erfolgte in einem Volumen von 50 µl FACS-Puffer. Für die Messung der CD4-Expression auf der Oberfläche von Th1- und Th2-Zellen wurde der direkt an FITC gekoppelte CD4-Antikörper (1 µg/ml) verwendet. Die Markierung von CD25,  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors und Aktivierungsmarker, erfolgte mit dem direkt an PE gekoppelten CD25-Antikörper (0,1 µg/ $1 \times 10^6$  Zellen). Alle Proben wurden gevortext, 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 1 ml FACS-Puffer

gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde jeder Ansatz in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und gevortext.

Die Messung der Zellen erfolgte nun an einem FACS Calibur-Gerät, wobei die Grundeinstellungen mit Hilfe der ungefärbten bzw. einzeln gefärbten Proben vorgenommen wurden. Für die Auswertung der Daten wurde die Software CellQuest Pro der Firma BD Biosciences verwendet.

### **3.1.6 Bestimmung der Zellzahl**

Um die Anzahl an vitalen Zellen in der Zellkultur zu ermitteln, wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt. Dieser Farbstoff wird durch die Plasmamembran lebender Zellen energieabhängig ein- und ausgeschleust. Während vitale Zellen nicht gefärbt werden, zeigt das Zytoplasma toter Zellen eine intensive Blaufärbung. Nach Anfärbung der Zellsuspension mit Trypanblau wurden 10 µl dieser Mischung in ein Haemocytometer mit einer Einteilung nach Neubauer eingebracht. Die Oberfläche dieser Zählkammer ist durch eingravierte Linien in ein feines Raster unterteilt, welches aus vier Quadraten besteht. Die Zahl der Zellen wurde in einem dieser Quadrate bestimmt und die Zellkonzentration je Milliliter Lösung wie folgt berechnet: Zellzahl x Verdünnungsfaktor x Kammerkonstante  $10^4$ .

## **3.2 Kollagen-Kokulturen**

Zur Untersuchung des axonalen Auswachsens wurde ein klassisches neurobiologisches Kokulturmodell modifiziert, welches ursprünglich dazu diente, die repulsiven oder attraktiven Eigenschaften eines Faktors zu analysieren, der von transfizierten Zellen im Überschuss sezerniert wurde (Steup et al., 1999, 2000). Die Veränderungen dieses Kokulturassays erfolgten dahingehend, den Einfluß sekretierter T-Zell-Faktoren auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex (EC)-Explantate zu untersuchen. Diese EC-Explantate stellen als Akutschnitte ein geeignetes Modell für einen primären mechanischen Schaden dar, der durch die Präparation gesetzt wurde.

### **3.2.1 Versuchstiere**

Für die Präparation der organotypischen entorhinalen Schnittkulturen wurden jeweils 2 Tage alte B10.PL oder BALB/c Mäuse verwendet.

### 3.2.2 Präparation organotypischer entorhinaler Schnittkulturen

Zur Präparation von organotypischen entorhinalen Schnittkulturen (Frotscher et al., 1995a) wurden die Mäuse dekapitiert und die Hirne unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Hemisphären wurden getrennt und in eiskaltes Präparationsmedium überführt. Mit Hilfe eines Binokulars wurde bei beiden Hemisphären der den Hippokampus und entorhinalen Kortex enthaltene Hirnanteil nach rostral vom restlichen Neokortex und nach kaudal vom Hirnstamm und Kleinhirn abpräpariert. Anschließend erfolgte das Herauspräparieren der entorhino-hippokampalen Formation. Für das Anlegen der Kollagen-Kokulturen wurde der entorhinale Kortex mit Hilfe eines Skalpells vom Hippokampus abgetrennt und vorsichtig mit einem Spatel auf die Unterlegscheibe eines Mc Ilwain-Gewebeschneiders transferiert. Mit diesem Geweschneider wurden 350 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit einem Spatel in frisches eiskaltes Präparationsmedium überführt und unter dem Binokular ausgewählt wurden. Die Ausbeute lag zwischen 10 bis 12 Hirnschnitten pro Tier. Die entorhinalen Kortex-Explantate konnten nun in den Kollagen-Kokulturen eingesetzt werden.

### 3.2.3 Kokultivierung entorhinaler Kortex-Explantate mit T-Zellen

Die Kokultivierung von CD4<sup>+</sup> Th1- und Th2-Zellen mit entorhinalen Kortex-Explantaten erfolgte in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix (Steup et al., 1999, 2000). Die T-Zellen wurden wie unter 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben präpariert, restimuliert und auf CD4<sup>+</sup> Zellen selektioniert. Das für diese Kokulturen notwendige Kollagengel ist aus Typ I Kollagen aus dem Rattenschwanz hergestellt worden. Es wurde in 0,1 M Essigsäure mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml gelöst, anschließend mit DMEM Medium gemischt und durch Zugabe von Rekonstituierungspuffer neutralisiert. 95 µl dieser Kollagenlösung wurden nun mit jeweils 5 µl der Th1- oder Th2-Zellsuspensionen ( $4 \times 10^5$  Zellen/5 µl Kulturmedium) gemischt. Zelltropfen mit einem Volumen von 30 µl und einer Konzentration von  $1,3 \times 10^5$  Zellen/Tropfen wurden auf Superfrost Plus Objektträger, die sich in einer 4 well-Kulturschale befanden, pipettiert und bei 37°C für 15 bis 30 min auspolymerisiert. Danach erfolgte das Positionieren der EC-Explantate in unmittelbarer Nähe zu den Th1- bzw. Th2-Zellaggregaten wie in Abb. 3.2 dargestellt. Anschließend wurden sowohl die T-Zell-Tropfen als auch die EC-Schnitte mit einer gemeinsamen Kollagenmatrix überschichtet, um eine Verbindung zwischen ihnen, jedoch keinen direkten Zell-Zell-Kontakt herzustellen. Nach dem erneuten Auspolymerisieren des Kollagens erfolgte die Zugabe von 6 ml Inkubationsmedium je well. Die Kokulturen wurden nun für 48 h in einem Brutschrank bei

37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, sodaß die auswachsenden Axone in die dreidimensionale Kollagenmatrix einwachsen und in Bezug auf ihre Länge und ihre axonale Dichte quantitativ ausgewertet werden konnten. Als Kontrollen dienten jeweils EC-Explantate ohne T-Zellen.

Folgende Kokulturrexperimente wurden nach dieser Methode durchgeführt:

<b>T-Zellen</b>	<b>entorhinale Kortex-Explantate</b>
MBP-spezifische Th1- und Th2-Zellen aus transgenen TG4 Tieren	aus B10.PL Tieren
OVA-spezifische Th1- und Th2-Zellen aus transgenen DO11.10 Tieren	aus BALB/c Tieren
unspezifische Th1- und Th2-Zellen aus B10.PL Tieren	aus B10.PL Tieren
naive T-Zellen aus transgenen TG4 Tieren	aus B10.PL Tieren

**Tabelle 3.7:** Kokultivierung verschiedener CD4<sup>+</sup> Th1- und Th2-Zellen mit entorhinalen Kortex-Explantaten.

### **3.2.4 Kokultivierung entorhinaler Kortex-Explantate mit rekombinanten Proteinen**

Da in diesem Modell der Einfluß löslicher Faktoren auf das axonale Wachstum entorhinaler Kortex-Schnitte untersucht werden sollte, wurden anstelle der T-Zellen auch rekombinante Proteine in den Kokulturen eingesetzt. Dabei wurden jeweils 95 µl Kollagen und 5 µl Proteinlösung gemischt. Als Kontrollen dienten zum einen EC-Explantate ohne Proteine. Zum anderen wurden die Explantate auch mit Mischungen aus Kollagen und dem jeweiligen Protein-Lösungsmittel (95 µl Kollagen und 5 µl Lösungsmittel) konfrontiert, um einen Effekt des Lösungsmittels auf das axonale Wachstum auszuschließen. Die EC-Explantate stammten aus 2 Tage alten B10.PL Mäusen.

Folgende Proteine wurden jeweils einzeln und in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt:

<b>Protein</b>	<b>Lösungsmittel</b>	<b>Konzentrationen</b>
IFN- $\gamma$	1 % BSA in PBS	100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml
IL-4	1 % BSA in PBS	10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml
IL-10	Tris-Puffer	10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml
NGF	1 % BSA in PBS	10 pg/ml, 100 pg/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml
NT-3	Aqua dest.	2 pg/ml, 20 pg/ml, 200 pg/ml, 10 ng/ml
NT-4	Aqua dest.	1 pg/ml, 10 pg/ml, 100 pg/ml, 10 ng/ml

**Tabelle 3.8:** In den Kollagen-Kokulturen verwendete rekombinante Proteine und ihre Lösungsmittel.

Zusätzlich zu diesen Kokulturansätzen, bei denen die rekombinanten Proteine anstelle der T-Zellen in die dreidimensionale Kollagenmatrix eingebracht wurden, erfolgte für einen weiteren Test die Zugabe von IFN- $\gamma$  oder IL-4 direkt in das Inkubationsmedium in einer Konzentration von 50 ng/ml. Die Kontrollen bestanden aus kollagenüberschichteten und in reinem Inkubationsmedium bzw. Inkubationsmedium mit dem entsprechenden Lösungsmittel (1 % BSA in PBS) kultivierten Explantaten. Die in diesem Versuch verwendeten EC-Schnitte stammten aus B10.PL Tieren.

### **3.2.5 Kokultivierung entorhinaler Kortex-Explantate mit T-Zellkulturüberständen**

In einem weiteren Versuch erfolgte der Einsatz von Th1- und Th2-Zellkulturüberständen in der Kokultur. Dazu wurden MBP-spezifische T-Zellen nach der MACS-Separation (siehe 3.1.4) erneut in Kulturmedium ( $4 \times 10^6$  Zellen/ml) aufgenommen und für 2 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte die Abnahme der Überstände und anschließend die Kokultivierung dieser Th1- und Th2-Zellkulturüberstände mit EC-Explantaten aus B10.PL Tieren, indem 95  $\mu$ l Kollagen mit je 5  $\mu$ l Th1- oder Th2-Überstand gemischt wurden. Als Kontrollen wurden EC-Schnitte mit einem überstandsfreien Kollagentropfen kokultiviert.

### **3.2.6 Kokultivierung entorhinaler Kortex-Explantate mit T-Zellen unter Zugabe neutralisierender Antikörper**

Um zu überprüfen, welche Rolle die Neurotrophine bzw. deren Rezeptoren bei den beobachteten Auswachseffekten spielen, erfolgte der Einsatz funktionsblockierender Antikörper in den Kollagen-Kokulturen. MBP-spezifische bzw. mit ConA unspezifisch

stimulierte CD4<sup>+</sup> Th1- und Th2-Zellen wurden mit EC-Explantaten 2 Tage alter B10.PL Mäuse wie unter 3.2.3 beschrieben kokultiviert. Die Zugabe der Antikörper in den entsprechenden neutralisierenden Konzentrationen erfolgte in die Kollagenmatrix, die sowohl für die T-Zell-Tropfen als auch zum Übersichten der Kulturen verwendet wurde. Eine Ausnahme bildete die Zugabe von K252a, welche direkt in das Inkubationsmedium erfolgte. Als Kontrollen wurden Kokulturen angelegt, die den jeweiligen Kontroll-Isotyp oder das entsprechende Lösungsmittel in der Kollagenmatrix bzw. im Inkubationsmedium enthielten. Die Effekte folgender funktionsblockierender Antikörper wurden untersucht:

<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Isotypkontrolle/ Lösungsmittel</b>	<b>Konzentration</b>
Anti NGF	2 µg/ml	Rabbit IgG	2 µg/ml
Anti NT-3	50 µg/ml	Chicken IgY	50 µg/ml
Anti NT-4	50 µg/ml	Chicken IgY	50 µg/ml
K252a	10 µmol	DMSO	gleiches Volumen

**Tabelle 3.9:** In den Kollagen-Kokulturen verwendete neutralisierende Antikörper und ihre Isotypkontrollen.

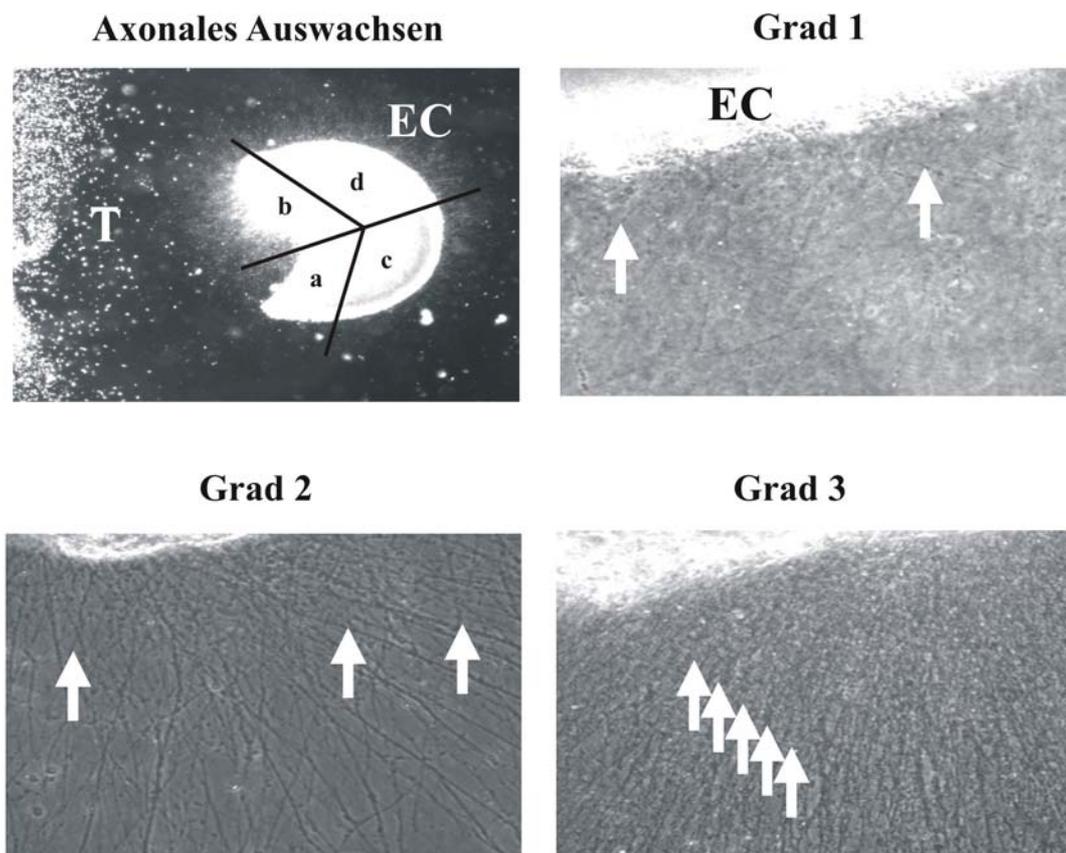
### 3.2.7 Auswertung der Kollagen-Kokulturen

Die Analyse des axonalen Wachstums erfolgte zu jeder Fragestellung in mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten durch zwei verblindete Personen. Zur Auswertung wurde das gesamte EC-Explantat in zwei dem Zellaggregat zugewandte (proximale) und zwei dem Zellaggregat abgewandte (distale) Regionen unterteilt, wie in Abb. 3.2 dargestellt. In diesen Regionen wurde die Axondichte nach folgenden morphologischen Kriterien bestimmt:

<b>Dichtegrad</b>	<b>morphologische Kriterien</b>
0	< 3 Axone in der gesamten Region
1	> 3 Axone, deren Ursprünge mit Abstand nebeneinander entspringen
2	viele Axone, deren Ursprünge ohne Abstand nebeneinander entspringen
3	gebündelte, parallel verlaufende Axone

**Tabelle 3.10:** Morphologische Kriterien für die Auswertung der axonalen Dichte.

Für die Auswertung der axonalen Dichte wurden nun die ermittelten Werte der zwei proximalen Explantatregionen addiert, sodaß Gesamtwerte zwischen 0 und 6 erreicht werden konnten. Diese berechneten Zahlenwerte dienten als Maß für das axonale Auswachsen. Neben der axonalen Dichte der proximalen Explantathälfte wurde auch das Verhältnis aus proximaler axonaler Dichte und distaler axonaler Dichte bestimmt, um attraktive oder repulsive Effekte zu erfassen. Hierzu wurde die Summe der zwei proximalen Dichtewerte durch die Summe der zwei distalen Dichtewerte dividiert. Das Auswachsmuster wurde als attraktiv eingestuft, wenn sich die Ratio zugunsten der proximalen Hälfte des Explantates verschoben hat (Werte  $> 1$ ). Dagegen wurde das Auswachsverhalten als repulsiv bewertet, wenn die Faserdichte in der proximalen Hälfte geringer als in der distalen Hälfte war (Werte  $< 1$ ). Die Längenauswertung der Axone erfolgte mit Hilfe eines Rasterokulars mit definierter Längeneinteilung, indem jeweils die 10 längsten Neuriten in jeder Region gemessen und anschließend daraus die Mittelwerte bestimmt wurden. Die Wachstumseffekte wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop beobachtet und digital dokumentiert.



**Abbildung 3.2:** Auswertung der axonalen Dichte. Unterteilung des EC-Explantates in zwei dem Zellaggregat zugewandte (a, b) und zwei dem Zellaggregat abgewandte (c, d) Regionen. Beispielhafte Darstellung der Dichtegrade 1, 2 und 3.

### **3.3 Membran-Kokulturen**

Da eine immunhistochemische Aufarbeitung der entorhinalen Kortex-Explantate in den Kollagen-Kokulturen nicht möglich war und außerdem kollagenfreie Kokulturüberstände für die ELISA-Analyse gewonnen werden sollten, wurden Membran-Kokulturen angelegt. Auch in diesem Kokulturmodell sollte der Einfluß löslicher T-Zell-Faktoren auf entorhino-hippokampale Schnittkulturen untersucht werden.

#### **3.3.1 Versuchstiere**

Für die Präparation der organotypischen entorhino-hippokampalen Schnittkulturen wurden 2 Tage alte B10.PL Mäuse verwendet.

#### **3.3.2 Präparation organotypischer entorhino-hippokampaler Schnittkulturen**

Die Präparation von organotypischen entorhino-hippokampalen Schnittkulturen erfolgte wie unter 3.2.2 beschrieben. Für das Anlegen der Membran-Kokulturen wurden jedoch 350 µm dicke Schnitte der gesamten entorhino-hippokampalen Formation angefertigt. Jeweils 3 dieser Schnitte wurden mit einer Pasteurpipette auf eine Filtermembran (Porengröße 0,4 µm) gebracht, die wiederum in die Vertiefung einer 6 well-Platte eingesetzt wurde. Die Vertiefungen enthielten bereits je 1,2 ml auf 37°C vorgewärmtes Inkubationsmedium, welches die auf der Filtermembran liegenden Schnittkulturen nur von unten erreicht, jedoch nicht zum Austrocknen der Kulturen führt. Die Inkubation der Schnittkulturen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Der Mediumwechsel wurde direkt einen Tag nach der Präparation unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### **3.3.3 Kokultivierung entorhino-hippokampaler Explantate mit T-Zellen**

Für die Kokultivierung von CD4<sup>+</sup> Th1- und Th2-Zellen mit organotypischen entorhino-hippokampalen Schnittkulturen wurden MBP-spezifische T-Zellen wie unter 3.1.3 und 3.1.4 beschrieben präpariert, restimuliert, ausdifferenziert und auf CD4<sup>+</sup> Zellen selektioniert. Wie in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, kommt es 6 bis 9 Tage nach Präparation der Schnittkulturen zu einer Wiederherstellung organotypischer Bedingungen und zur Herunterregulation von Aktivitätsmarkern auf Mikrogliazellen in den inneren Schichten der Hirnschnitte (Hailer et al., 1996). Diese innere Zone der Hirnschnitte verhält sich somit wie unverletztes Gewebe, welches alle Zellkompartimente in ihrer ursprünglichen Zytoarchitektur

und teilweisen Funktionalität enthält. Deshalb erfolgte die Zugabe der CD4<sup>+</sup> Th1- und Th2-Zellen in dieser Kokultur bereits 3 Tage nach Präparation der Schnittkulturen, um sie als Modell für verletztes Hirngewebe, d.h. für einen primär gesetzten mechanischen Schaden verwenden zu können. Die T-Zellen wurden in einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml in Inkubationsmedium suspendiert und anschließend anstelle von Medium direkt unter die Explantate gegeben (1,2 ml je 6 well-Vertiefung). Zu den Kontrollen wurde nur frisches Inkubationsmedium pipettiert. Da die Zellen durch die semipermeable Membran von den Explantaten getrennt waren, konnte ein direkter Zell-Zell-Kontakt ausgeschlossen werden. Nach einer Kokultivierung von 3 Tagen wurden alle Explantate für die immunhistochemische Auswertung fixiert und die Kokulturmedien für die ELISA-Analyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.3.4 Kokultivierung entorhino-hippokampaler Explantate mit rekombinanten Proteinen

Da auch in diesem Kokulturmodell der Effekt löslicher Faktoren auf verletztes Hirngewebe untersucht werden sollte, wurden 3 Tage nach Präparation der Explantate folgende rekombinante Proteine anstelle der T-Zellen einzeln in den Kokulturen eingesetzt. Als Kontrolle erfolgte die Zugabe des jeweiligen Lösungsmittels zum Inkubationsmedium.

Protein	Lösungsmittel	Konzentrationen
IFN- $\gamma$	1 % BSA in PBS	50 ng/ml
IL-4	1 % BSA in PBS	50 ng/ml
IL-10	Tris-Puffer	50 ng/ml
IL-13	Aqua dest.	50 ng/ml
NGF	1 % BSA in PBS	50 ng/ml

**Tabelle 3.11:** In den Membran-Kokulturen verwendete rekombinante Proteine und ihre Lösungsmittel.

### 3.3.5 Fixierung und Kryostatschnitte

Zur Fixierung der Schnittkulturen wurde zunächst das Inkubationsmedium für die ELISA-Analyse vollständig abgenommen. Danach erfolgte die Zugabe von 2 ml PFA 4 % sowohl in die Vertiefungen als auch auf die Schnitte. Nach 5 min wurde das PFA wieder abgezogen und durch frisches PFA ersetzt. Die Fixierung der Schnittkulturen erfolgte nun für 2 h bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Nach dem Entfernen des Fixativs wurden die Schnitte zweimal mit 0,1 M PB gewaschen und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  in 0,1 M PB aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die fixierten

Schnittkulturen in 0,8 M Saccharoselösung überführt, wodurch sie in ihrer Dichte dem Gefriermedium angeglichen wurden. Durch diese Behandlung wird ein besserer Gewebeerhalt garantiert und somit die Bildung von Gefrierartefakten beim Schneiden verhindert. Nach einer Lagerung von mindestens 14 Tagen bei 4°C in der 0,8 M Saccharoselösung wurden 10 µm dicke Schnitte bei -30°C am Kryostaten angefertigt. Die Dünnschnitte wurden sofort auf Superfrost Plus Objektträger aufgebracht, 1 h bei RT getrocknet und bis zur immunhistochemischen Analyse bei -80°C gelagert.

### **3.3.6 ELISA-Analyse des Kokulturmediums**

Um zu überprüfen, ob die Kokultivierung von entorhino-hippokampalen Schnittkulturen mit T-Zellen eine Veränderung der Neurotrophinkonzentrationen im Kokulturmedium bewirkt, erfolgte die Analyse von NGF, NT-3 und NT-4 in den Kokulturmedien mittels ELISA. Die Proteinbestimmungen wurden wie unter 3.1.5.1 beschrieben nach Anweisungen der Hersteller durchgeführt.

### **3.3.7 Immunhistochemische Analyse der entorhino-hippokampalen Explantate**

Neben den sezernierten Faktoren im Kokulturmedium wurde auch die Neurotrophin-Rezeptor-Expression an den Schnittkulturen immunhistochemisch untersucht. Erstens sollte gezeigt werden, welche Zellen in den Explantaten die Neurotrophin-Rezeptoren exprimieren und zweitens sollte die Neurotrophin-Rezeptor-Expression unter dem Einfluß von T-Zellen oder rekombinanten Faktoren analysiert werden.

Für alle Färbungen wurden die Kryostatschnitte der Schnittkulturen verwendet. Nach dem Auftauen und Trocknen der Präparate wurden die Schnitte zunächst 1x5 min mit 0,1 M PB gewaschen, um Reste des Gefriermediums zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Dako Pen) umrandet. Danach erfolgte das Blockieren unspezifischer Bindungen mit Serum aus der Tierspezies, in welcher der Sekundär-Antikörper (AK) gewonnen wurde (0,1 M PB mit 10 % Serum; 100 µl je Objektträger) für 1 h bei RT. Dann wurden die Präparate 1x5 min mit 0,1 M PB gewaschen und anschließend der Primär-AK in der in Tab. 3.12 angegebenen Konzentration aufgetragen (AK in 0,1 M PB mit 1 % Serum; 100 µl je Objektträger). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x10 min mit 0,1 M PB gewaschen und danach der Sekundär-AK in der ebenfalls in Tab. 3.12 angegebenen Konzentration aufgetragen (AK in 0,1 M PB mit 1 % Serum; 100 µl je Objektträger). Nach einer

Inkubationszeit von 1 h bei RT im Dunkeln wurden die Präparate 3x5 min mit 0,1 M PB gewaschen. Danach erfolgte noch eine Kern-Gegenfärbung mit Höchst-Lösung (500 ng/ml in 0,1 M PB; 100 µl je Objektträger). Nach abschließendem Waschen 3x5min mit 0,1 M PB erfolgte das Eindeckeln der Präparate mit Immu-Mount. Die Objektträger wurden über Nacht im Dunkeln getrocknet und konnten am nächsten Tag fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und ausgewertet werden.

Handelte es sich um eine intrazelluläre Färbung, wurde der Blockierlösung sowie jeder AK-Lösung 0,5 % Triton X-100 zugesetzt. Bei Doppelfärbungen erfolgten beide Einzelfärbungen hintereinander. Es wurden Doppelfärbungen der Neurotrophin-Rezeptoren TrkA, TrkB, TrkC und p75NTR jeweils mit NF (Neurone), GFAP (Astrozyten) und GFS-IB4 (Mikroglia) sowie Einzelfärbungen der Neurotrophin-Rezeptoren durchgeführt. Folgende AK wurden dafür verwendet:

<b>Primär-Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Sekundär-Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Serum</b>
Goat anti-mouse Neurofilament	5 µg/ml	Donkey anti-goat FITC	7,5 µg/ml	DS
Rat anti-mouse GFAP	5 µg/ml	Goat anti-rat Alexa Fluor 488	8 µg/ml	NGS
GFS-IB4 FITC	2 µg/ml			NGS
Rabbit anti-mouse TrkA	66,7 ng/ml	Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568	8 µg/ml	NGS
Rabbit anti-mouse TrkB	2 µg/ml	Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568	8 µg/ml	NGS
Rabbit anti-mouse TrkC	667 ng/ml	Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568	8 µg/ml	NGS
Rabbit anti-mouse p75NTR	4 µg/ml	Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568	8 µg/ml	NGS

**Tabelle 3.12:** Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper.

### **3.4 Entorhinale Kortex-Läsion und T-Zellinjektion**

Abschließend sollte überprüft werden, ob sich die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen bezüglich des axonalen Wachstums auch *in vivo* erzielen lassen. Dafür wurde das axonale Auswachsen am bereits etablierten Modell der entorhinalen Kortex-Läsion (ECL) näher analysiert.

#### **3.4.1 Versuchstiere**

Für die Läsionsexperimente wurden 6 bis 8 Wochen alte B10.PL Mäuse verwendet.

#### **3.4.2 Präparation der entorhinalen Kortex-Läsion und T-Zellinjektion**

Für dieses Läsionsmodell wurden die Mäuse mit einem Ketamin-Rompun-Gemisch anästhesiert (0,1 ml/10 g Körpergewicht der Maus) und in einen Stereotakten eingespannt. Nach dem Eröffnen der Kopfschwarte erfolgte die Lokalisation des Bregma- und des Lambda-Punktes der Schädelnähte, um eine standardisierte Kopfposition einzustellen. Anschließend wurde mit einem Minibohrer ein schmales Loch in die Schädeldecke gebohrt, um mit einem chirurgischen Messer den Tractus perforans zu durchtrennen. Dafür wurde das 2 mm breite Messer an bestimmten optimalen stereotaktischen Koordinaten (2,1/0,0), die in Vorversuchen ermittelt wurden, 3,5 mm tief in das Hirngewebe eingeführt. Direkt im Anschluß an die Läsion wurden den Kontrolltieren 5 µl PBS und den Testtieren je  $1 \times 10^4$  Th1- oder Th2- Zellen in 5 µl PBS in die Läsionsstelle injiziert. Bei den T-Zellen handelte es sich um unspezifisch mit ConA stimulierte Th1- und Th2-Zellen, die wie unter 3.1.3 und 3.1.4 erläutert präpariert, restimuliert, ausdifferenziert und auf CD4+ Zellen selektioniert wurden. Nach der Injektion wurde die Hautwunde verschlossen und wundversorgt. Die transkardiale Perfusion der Mäuse erfolgte 14 Tage nach Läsion mit 4 % PFA. Die fixierten Gehirne wurden entnommen, weitere 2 h in 4 % PFA bei 4°C nachfixiert und anschließend einmal mit 0,1 M PB gewaschen. Über Nacht erfolgte die Lagerung der Gehirne in 10 % iger Saccharoselösung bei 4°C, sodaß sie am nächsten Tag in 2-Methylbutan eingefroren werden konnten. Bis zur immunhistochemischen Weiterverarbeitung wurden die Gehirne bei -80°C aufbewahrt.

### **3.4.3 Immunhistochemische Analyse der Gehirne nach der entorhinalen Kortex-Läsion**

Das axonale Auswachsen nach der ECL wurde immunhistochemisch mit Hilfe eines Antikörpers gegen Growth associated protein (GAP43) untersucht. GAP43 wird auf sich entwickelnden und regenerierenden Neuronen exprimiert und eignet sich daher als Marker für axonales Wachstum bzw. Sprouting nach einer experimentell gesetzten Läsion.

Für diese immunhistochemische Analyse wurden 10 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und anschließend wie unter 3.3.7 beschrieben gefärbt. Als Blockierlösung wurde 0,1 M PB mit 10 % NGS und 0,5 % Triton X-100 (50 µl je Schnitt), als Primär-AK rabbit anti-mouse GAP43 (4 µg/ml in 0,1 M PB mit 1 % NGS und 0,5 % Triton X-100; 50 µl je Schnitt) und als Sekundär-AK goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 (8 µg/ml in 0,1 M PB mit 1 % NGS und 0,5 % Triton X-100; 50 µl je Schnitt) verwendet. Die gefärbten Präparate wurden fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und ausgewertet.

### **3.5 Auswertung und Analyse der Daten**

Die Beobachtung der T-Zellkulturen sowie die Auswertung der Kollagen-Kokulturen erfolgten an einem inversen Durchlichtmikroskop (Olympus IX 70). Um die immunhistochemischen Färbungen der entorhino-hippokampalen Gewebeschnitte sowie der ECL-Gehirnschnitte auszuwerten, wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX 50 oder Olympus BX 51) verwendet, an das jeweils eine digitale Kamera (Photometric Coll Snap ES oder Intas) angeschlossen war. Diese Präparate wurden mit den entsprechenden Filtern für grüne, rote oder Doppelfluoreszenz und Objektiven mit 10-facher und 40-facher Vergrößerung fotografiert und als Tiff-Dateien digital abgespeichert. Die Analyse der Neurotrophin-Rezeptor-Expression sowie des axonalen Sproutings unter dem Einfluß von T-Zellen und rekombinanten Proteinen erfolgte nun über einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten. Diese Intensitäten wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm Metamorph ermittelt. Dabei war es wichtig, daß alle Präparate, die miteinander verglichen werden sollten, in derselben Vergrößerung und mit derselben Belichtungszeit fotografiert wurden. Für die Auswertung der Neurotrophin-Rezeptor-Expression wurde jedoch eine ältere Version des Metamorph-Programmes verwendet, bei der ein direkter Intensitätsvergleich der Fluoreszenzen nicht möglich war. Hier wurde an einem Kontroll-Explantat eine bestimmte Intensität als Schwellenwert festgelegt und anschließend für jedes Bild die Größe der Fläche ermittelt, die eine über diesem Schwellenwert liegende Fluoreszenzintensität aufwies. Deshalb ist in den Diagrammen der Neurotrophin-Rezeptor-Färbung jeweils der prozentuale

Anteil der Rezeptor-positiven Fläche an der Gesamtbildfläche, die bei allen fotografierten Explantaten gleich groß war, dargestellt. In den Abbildungen der GAP43-Färbung hingegen konnte direkt die Fluoreszenzintensität in Graustufen angegeben werden.

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Test.

### **3.6 Statistische Verfahren**

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden zunächst die Mittelwerte und Mediane aus den jeweiligen Daten gebildet und anschließend die Standardabweichungen sowie die Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Die Standardabweichung wird hierbei als Maß für die Meßwertstreuung durch zufällige Fehler angegeben.

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests sollte nun herausgefunden werden, ob sich die durchschnittlichen Werte eines Versuches signifikant voneinander unterscheiden. Der Mann-Whitney-U-Test gehört zu den parameterfreien oder verteilungsunabhängigen statistischen Tests und findet seine Anwendung bei nicht-normalverteilten, voneinander unabhängigen Stichproben. Ausgegangen wird von der Nullhypothese, daß es keinen Unterschied zwischen den Medianen zweier Stichproben gibt.

Die Prüfung dieser Signifikanz erfolgte unter Verwendung des Software Programms SPSS. War der mit dem Programm errechnete Signifikanzwert kleiner als 0,05, so bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen zweier Stichproben und die Nullhypothese konnte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % abgelehnt werden. Ergab sich ein größerer Wert als 0,05, so bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stichproben und die Nullhypothese wurde angenommen.

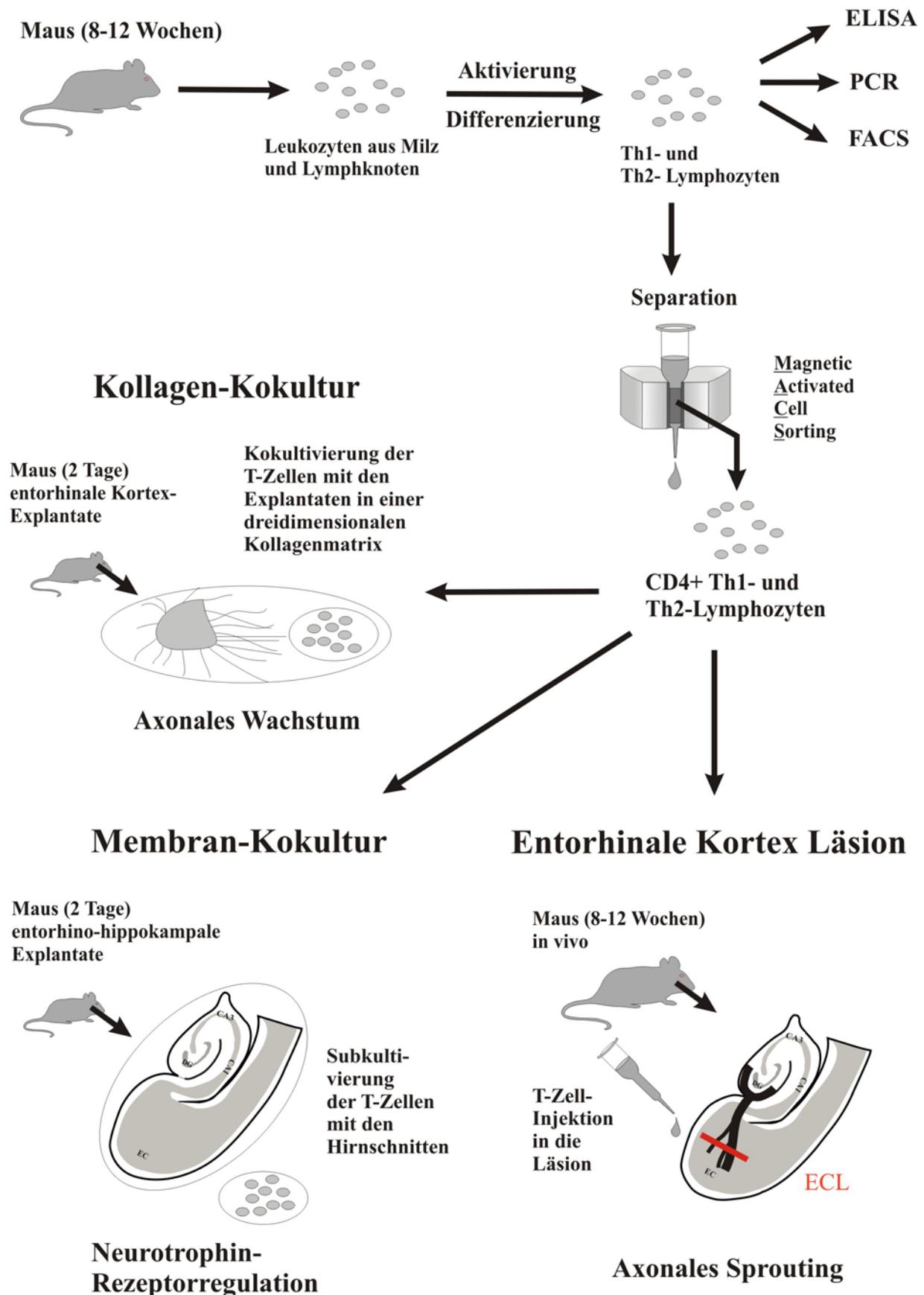


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Methoden.