

2 Material

2.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose (Ultrapure)	GibcoBRL/Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Steinheim
Ampicilin	Sigma, Steinheim
Beriglobin	Aventis Behring, Marburg
Brefeldin A	Sigma, Steinheim
BSA	Sigma, Steinheim
CsA	MPI für Enzymologie, Halle/Saale
Complete Protease Inhibitor (EDTA-free)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
dNTPs	Peqlab, Steinheim
DSP	Pierce Biotechnology, Rockford (IL), USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ficoll-Plaque™ PLUS	Amersham Biosciences, Uppsala, SW
Formaldehydlösung (min. 37%)	Merck, Darmstadt
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Indo-1 (I-1202)	Molecular Probes, Eugene (OR), USA
Ionomycin	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt

Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma, Steinheim
NP-40	Sigma, Steinheim
Nukleotid-Größenmarker (IV)	Roche, Mannheim
Orange G (Probenpuffer für Agarose-Gele)	Sigma, Steinheim
PCR-Puffer (10x)	DRFZ
Pefablock SC	Roche, Mannheim
Phorbol 12-myristat 13-acetat	Sigma, Steinheim
Polystyrene Beads (Ø 6µm)	Polyscience, Eppelheim
Rotiphoresegel (30% Acrylamid, 0.8%Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	GibcoBRL/Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Seebblue Plus2 [®] Prestained Standard (Protein-Größenmarker)	Invitrogen, Carlsbad, CA
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Spermidin	Sigma, Steinheim
Spermin	Sigma, Steinheim
Sucrose	Merck, Darmstadt
TCEP	Sigma, Steinheim
TEMED	Roth, Karlsruhe
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Steinheim

2.1.1 Puffer und Medien

PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	1,4 mM KH ₂ PO ₄
	4,3 mM Na ₂ HPO ₄ •H ₂ O

PBS/ BSA	PBS 0.5 % BSA (w/v)
PBS/ BSA/ Azid	PBS/ BSA 0.05 % NaN ₃
Zellkultur-Medium (RPMI ,komplett')	RPMI 1640 10 % FCS (hitze-inaktiviert) 10 mM L-Glutamat 10 µg/ml 2-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin
Nuklei-Lysepuffer (50 ml) (Zellkernisolation)	320 mM Sucrose 10 mM Hepes (pH 7.6) 8 mM MgCl ₂ 0.5 % Triton X-100 1 Complete Protease Inhibitor Tablette
NP-40-Lysepuffer (Restriktionsenzym-Accessibility-Assay)	10 mM Tris (pH 7.4) 10 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 0.5 mM Spermidin 0.15 mM Spermin 0.5 % NP-40
RE-Puffer (Restriktionsenzym-Accessibility-Assay)	10 mM Tris (pH 7.4) 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 0.2 mM EDTA 0.2 mM EGTA 1 mM DTT 0.5 mM Spermidin 0.15 mM Spermin
RIPA-Puffer (pH 7.6) (Proteinaufreinigung aus fixierten Zellen)	1 M NaH ₂ PO ₄ 10 mM HNa ₂ PO ₄

	154 mM NaCl
	12 mM Sodium Deoxycholate
	2 mM Pefablock
	2 mM EDTA
	0.95 mM Fluorid
	1 % Triton X-100
	2 % SDS
	1 µg/ml Aprotinin
	2 µg/ml Leupeptin
Laemmli Probenpuffer (4x) s.Ref [216]	250 mM Tris-HCl (pH 6.8)
	40 % Glycerin
	5 % SDS
	0.005 % Bromphenol Blau
	10 % β-Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)
APS (10%) (SDS-PAGE)	0.1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml H ₂ O
Laufpuffer pH 8.3 (10x) (SDS-PAGE)	30.3 g Tris-Base
	144 g Glycin
	10 g SDS
	Auffüllen auf 1l mit H ₂ O dest.
Blotpuffer pH 8.1-8.4 (10x) (Western Blot)	19.3 g Tris-Base
	90 g Glycin
	Auffüllen 1l mit H ₂ O dest.
Blotpuffer (1x) (Western Blot)	100 ml Blotpuffer (10x)
	100 ml Methanol (100%)
	800 ml H ₂ O dest.
Blockpuffer (3%) (Western Blot)	1.5 g BSA in 50 ml PBS

Waschpuffer (Western Blot)	0.1 % Tween 20 in PBS
Stripping-Puffer	200 mM Glycin (HCL pH 2.0) 2 % SDS 350 µl β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer (50x) (Agarose-Gelelektrophorese)	40 ml Tris-Acetat 1 ml EDTA

2.1.2 Reaktionskits

Name	Firma
ECL Detection Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
JETsorb	Genomed, Bad Oeynhausen
IL-2 Secretion Assay Detection Kit (APC)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Invisorb® Spin Cell Mini Kit (genomic DNA)	Invitex, Berlin
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Nuclear Extract Kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.3 Enzyme

Enzym	Firma
SuperSCRIPT II (Reverse Transkriptase)	GibsonBRL/Invitrogen, Freiburg
Taq-Polymerase	Gen-Express, Berlin
<i>DraI</i> (Restriktionsenzym)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

2.1.4 Oligonukleotid-Primer

Alle aufgeführten Primer wurden mit dem Softwareprogramm Oligo4 ermittelt und von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin hergestellt.

Gen	Name	Sequenz (5' → 3')
β-2-Mikroglobulin	β-2-microglobulin up β-2-microglobulin low	TggAgAgAgAATTgAAAAgTggAgC TTAAAAgCAAgCAAgCgAATTTgg
β-Actin (PCR)	hum β-actin fwd hum β-actin rev	gTggggCgCCCCAggCACCA CTCCTTAATgTCACgCACgATTTC
IL-2 (PCR)	hum IL-2 fwd hum IL-2 rev	CACAgCTACAActggAgCATTTA AgAAATTCTACAATggTTgCTgTC
IL-2 Promotor (proximal)	hum genIL2prom F1 hum genIL2prom R1	CCTAAgTgTgggCTAATgTA ATTCTggAAAAATATTATggg
IL-2 Gen (SetA) (genomische Sequenz)	hum genIL2gene fwd hum genIL2gene rev	CTACAActggAgCATTACTg TCAgATgAgCTgCTATTAgTC
Calcineurin Aβ (genomische Sequenz)	hum genCaN fwd hum genCaN rev	TATTTCCATgCACAgAAgACAgA gTACAgACCAgACAggTAACATTg

2.1.5 Plasmide

Plasmid	Enhancermotiv	Firma
pNFAT-GFP	(ggAggAAAAACTgTTTCATACAgAAggCgT) ₄	Stratagene, Amsterdam
pNF-κB -Luc	(TggggACTTTCCgC) ₅	Stratagene, Amsterdam
pCMV-EGFP	Konstitutive Expression von GFP	Clontech, Heidelberg
pDsRed1-1	Expressionsvektor mit <i>dsRed</i> -Gen	Clontech, Heidelberg

2.1.6 Antikörper

Antikörper	Klon	Firma
α-human CD28 (mouse IgG _{1,κ})	CD28.2	BD Biosciences, Heidelberg
α-human CD3 (mouse IgG _{1,κ})	UCHT1	BD Biosciences, Heidelberg
α-human CD4-Cy5 (mouse IgG ₁)	TT-1	DRFZ, hauseigen

α -human CD4 MicroBeads (MACS)	n.n.	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
α -human CD45RA-FITC (mIgG _{1,κ})	L48	BD Biosciences, Heidelberg
α -human CD45RO-FITC (mIgG _{2a,κ})	UCHL1	BD Biosciences, Heidelberg
α -human CD40L-PE (mIgG _{1,κ})	89-76	BD Biosciences, Heidelberg
α -human c-Fos (rabbit polyclonal)	4	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -human IL-2-APC (mIgG _{1,κ})	MQ1-17H12	BD Biosciences, Heidelberg
α -human Lamin B1 (goat polyclonal)	M-20	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -human NFAT-1-FITC (mIgG ₁)	1	BD Biosciences, Heidelberg
α -human NFATc2 (mIgG _{2a})	G1-D10	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -human NFATc2 (mIgG _{2a})	4G6-G5	BD Biosciences, Heidelberg
α -human NFATc2 (rabbit polyclonal)	n.n.	Immunoglob, Himmelstadt
α -human NF- κ B (p65)-FITC(mIgG ₁)	F6	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -human NF- κ B (p50) (mouse IgG ₁)	E-10	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -mouse IgG _{2a} -FITC	n.n.	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
α -goat IgG (rabbit) –HRP (H+L)	n.n.	Dianova, Hamburg
α -human β -Actin (mouse IgG ₁)	n.n.	Sigma, Taufkirchen

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Zur Gewinnung humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurden Buffy-Coats vom Blutspendedienst Wannsee bzw. Blutfilter aus der Blutspende der Charite von gesunden Spendern verwendet. Das Vollblut wurde mit PBS/BSA-Puffer zu gleichen Teilen verdünnt und auf einen Sucrosegradienten (Ficoll) geschichtet, dessen Dichte (1,077g/ml) so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren, während Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten sich in der Interphase ansammeln. Die peripheren mononukleären Zellen (Th-Zellen, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, Thrombozyten) wurden anschließend von Erythrozyten, Thrombozyten und toten Zellen durch isokynische Zentrifugation bei 800xg 20min bei Raumtemperatur ohne Bremse getrennt. Nach Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen und zweimal mit PBS/BSA für 10min bei 300xg und 4°C gewaschen. Die Zellen wurden in PBS/BSA resuspendiert und bis zur Weiterbehandlung auf Eis gelagert.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurden 20µl Zellsuspension mit 80µl 0.4% Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gemischt und 16 Felder unter einem 40x Objektiv eines Axiovert Mikroskopes (Carl Zeiss, Deutschland) ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension errechnete sich aus dem Kammerfaktor $10^4 \times \text{Zellzahl (pro 16 Felder)} \times \text{Verdünnungsfaktor}$. Alternativ wurde die Zellzahl/ml mit Hilfe eines automatischen Zellzählers CASY durch Mittelwertbestimmung einer Messung von drei Aliquots á 400 µl einer 1:1000 Verdünnung ermittelt.

3.1.3 Kultivierung und Stimulation von CD4⁺ Th-Zellen

Primäre humane CD4⁺ Th-Zellen wurden in einer Konzentration von $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI Kulturmedium ‚komplett‘ bei 37°C und 5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten (95%) Atmosphäre kultiviert. Alle *in vitro* -Stimulationen wurden unter diesen Bedingungen

durchgeführt. Für polyklonale Stimulationen wurden 10ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) und 1µg/ml Ionomycin verwendet, wenn nicht anders angegeben. Für intrazelluläre Zytokin- und Oberflächenrezeptorfärbungen wurden die CD4⁺ Th-Zellen fünf Stunden mit PMA/Ionomycin stimuliert und für die letzten zwei Stunden der Sekretionsinhibitor Brefeldin A (5µg/ml) zugegeben. Für rezeptorvermittelte Stimulationen wurden α-human CD3- und α-human CD28-Antikörpern beschichtete Polystyrenbeads verwendet und im Verhältnis 1:2 mit MACS sortierten CD4⁺ Th-Zellen eingesetzt. Polystyren-Plastikkügelchen (1x10⁸/ml) mit einem Durchmesser von 6µm wurden mit α CD3 (1µg/ml) und α CD28 (4µg/ml) Antikörpern in 10ml PBS für zwei Stunden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Beads pelletiert, für eine Stunde mit RPMI Medium/FCS (10%) blockiert und in 1ml RPMI Kulturmedium resuspendiert und bei 4°C gelagert.

3.1.4 Kultivierung der Jurkat Zelllinie

Bei der Jurkat-Zelllinie handelte es sich um eine humane T-Zelllinie des Klons E6-1 der *American Type Culture Collection* (ATCC), Manassa, USA. Die Zellen wurden mit RPMI Medium (10% FCS) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre (95%) bis zu einer Dichte von 1-2x10⁶ kultiviert und alle 2-3 Tage gesplittet. Zum Zeitpunkt der Transfektion betrug die Dichte idealerweise 3x10⁵.

3.1.5 Transfektion von Jurkat Zellen

Die Transfektion der Jurkat Zellen basierte auf der Elektroporation und erfolgte nach der Methode von Amaxa[®] unter Verwendung des *Nucleotransfection Kit T* und des Transfektionsgerätes *Nucleofactor I* mit dem Programm C-16 nach Herstellerangaben. Es wurden 2x10⁶ Zellen mit insgesamt 5µg Plasmid-DNA transfiziert und vor der Stimulation zur Regeneration für 16h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Die Transfektionseffizienz wurde durch Detektion der konstitutiven Expression von GFP nach Transfektion mit dem pCMV-EGFP Vektor ermittelt.

3.1.6 Fixierung von Zellen mit Formaldehyd oder DSP

Die Fixierung von Zellen mit Formaldehyd erfolgte durch Kreuzvernetzung der Aminogruppen von Proteinen unter Beteiligung der Aldehydgruppen des Formaldehyd. Für die Fixierung wurden die Zellen zunächst pelletiert und zweimal mit PBS für 10min

bei 300xg und 4°C gewaschen, um sämtliche störende Medienrückstände, Serum- und Proteinbestandteile zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in einer frischgesetzten 2% Formaldehyd/PBS-Lösung bei Raumtemperatur für 20min fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und bei 4°C in PBS/BSA/Na₃ gelagert.

Parallel wurden CD4⁺ Th-Zellen in DSP fixiert. Die Fixierung mit DSP basiert auf Proteinkreuzvernetzung von primären Aminogruppen (pH6.5-pH8.5) über eine Thiolgruppe als Spacer, die unter Einfluss von reduzierenden Substanzen wie DTT oder Mercaptoethanol wieder aufgespalten werden kann (s. Abschnitt 3.3.2). Diese Fixierung ist somit reversibel und wurde für gelelektrophoretische Analysen genutzt, bei der sich die Reanalyse von Proteinen aus Formaldehyd-fixierten Zellen mit geringen Proteinkonzentrationen als sehr schwierig erwies. Es wurden 1x10⁷ Zellen einmal in PBS gewaschen und für 30min bei Raumtemperatur in 5ml PBS mit 20mM DSP fixiert. Die Fixierung wurde mit 50mM Glycin gestoppt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen und bei 4°C in PBS/BSA/Na₃ gelagert.

3.1.7 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen und Oberflächenmolekülen

Für intrazelluläre Färbungen wurden fixierte Zellen (s. Abschnitt 3.1.6) in einer 0.5% Saponin/ PBS/BSA Lösung permeabilisiert. Da die Permeabilisierung der Zellmembran mit Saponin reversibel ist, musste bei allen nachfolgenden Färbe- und Waschschrritten Saponin anwesend sein. Die Zellen wurden bei 300xg 10min gewaschen und 2–5x10⁶ Zellen in 100µl einer Färbelösung bestehend aus 0.5% Saponin/ PBS/ BSA, Beriglobin (1:50), und entsprechenden austitrierten Antikörpern (meist 1µg/ml oder nach Herstellerangaben) für 10min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde mit 0.5% Saponinlösung aufgefüllt und gewaschen. Die Zellen wurden in PBS/BSA resuspendiert und im Dunkeln bis zur Messung gelagert.

3.1.8 Färbung von Zelloberflächenmarkern

Die Klassifizierung weiterer Untergruppen der aus dem Blut isolierten peripheren mononukleären Zellen (s. Abschnitt 3.1.1), wie z.B. die Einteilung der Lymphozyten in B-Zellen und Th-Zellen, erfolgte über die Analyse der Expression bestimmter Oberflächenantigene, der sogenannten CD (*Cluster of Differentiation*)-Antigene. Diese *Immunphänotypisierung*, also Subklassifizierung einzelner Zellpopulationen, wird durch die Bindung von monoklonalen Antikörpern an spezifische CD-Antigene erreicht, die charakteristisch für die jeweilige Zellpopulation sind.

Die Zellen wurden mit PBS/BSA gewaschen und bis zu 5×10^6 Zellen für 10min in 100 μ l einer Antikörperlösung aus PBS/BSA-Puffer, 0.3mg/ml Beriglobin und je nach Experiment mit austitrierten Antikörpern (meist 1 μ g/ml oder nach Herstellerangaben) auf Eis im Dunkeln inkubiert. Beriglobin blockiert die Fc-Rezeptoren der Zellen und verhindert so unspezifische Bindungen und damit die Analyse oder Aufreinigung von Falsch-Positiven bei der nachfolgenden MACS-Aufreinigung oder durchflusszytometrischen Analyse. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS/BSA 10min bei 300xg und 4°C gewaschen und in 200–400 μ l PBS/BSA resuspendiert. Für die durchflusszytometrische Analyse lebender Zellen wurde unmittelbar vor der Messung 0.2 μ g/ml Propidiumjodid zugesetzt. Propidiumjodid diffundiert bei toten oder nekrotischen Zellen durch die beschädigte Zellmembran und interkaliert mit der DNA, wodurch tote Zellen von der Analyse lebender Zellen ausgeschlossen werden.

3.1.9 Beladung mit dem Calciumindikator Indo-1 für Ca^{2+} -Messung

Messungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden in CD4^+ Th-Zellen über eine Fluoreszenzmessung des Calciumindikators Indo-1 durchgeführt, dessen Emissionsspektrum sich mit der Calciumkonzentration ändert. Es wurden 5×10^6 CD4^+ Th-Zellen in 1ml 37°C warmen RPMI Kulturmedium resuspendiert, mit 4 μ M Indo-1 beladen und für 30min bei 37°C unter Lichtabschluss inkubiert. Indo-1 ist ein lipophiler membranpermeabler Acetoxymethylester, der durch die Zellmembran in alle Zellkompartimente diffundiert. Ausschließlich im Zytosol vorkommende unspezifische Esterasen spalten die Estergruppen des Indo-1 ab, so dass es die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Die Indo-1-freie Säure komplexiert mit den Ca^{2+} Ionen des Zytosols und verändert je nach Ca^{2+} Konzentration seine Konformation, was zu einer messbaren Fluoreszenzveränderung führt [217]. Der überschüssige Farbstoff wurde 2x mit RPMI Kulturmedium bei 300xg gewaschen und die Zellen bis zur Messung in 500 μ l RPMI Kulturmedium unter Lichtabschluss in einem Heizblock bei 37°C bis zur ratiometrischen-fluorimetrischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Bestimmung am FACS (s. Abschnitt 3.2.5) aufbewahrt.

3.1.10 Intrazelluläre Färbung von Transkriptionsfaktoren

Da die Transkriptionsfaktoren NFAT und NF- κ B bei Aktivierung vom Zytoplasma in den Zellkern translozieren, mussten für die fixierten Zellen und fixierten Zellkerne andere Permeabilisierungen gewählt werden, weil Saponin in der Regel nicht in der Lage ist, die doppelwändige Zellkernmembran vollständig zu permeabilisieren, so dass die Antikörper

nicht in den Zellkern gelangen, sondern im perinukleären Raum ‚hängenbleiben‘. Das nicht-ionische Detergenz Triton-X 100 erzielte hierbei die besten Resultate. Die Zellen wurden mit einer 0.3% Triton-X 100/BSA(1%)/PBS Lösung für 5min bei Raumtemperatur permeabilisiert und anschließend mit PBS/BSA ohne Triton-X 100 für 10min bei 300xg gewaschen. Für die Färbung wurden die Zellen bzw. Zellkerne mit einer Antikörper (2µg/ml)/ PBS/BSA Färbelösung für 30min im Dunkeln inkubiert, einmal mit PBS/BSA gewaschen und im FACS Calibur analysiert.

3.1.11 Der IL-2 Sekretionsassay

Zur Detektion von IL-2 Zytokinproduzenten *ex vivo* wurde der *IL-2 Secretion Assay* der Firma Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach) verwendet (s. Abbildung 3.1). Das Prinzip des Sekretionsassays basiert auf einer Fangmatrix [218], in diesem Fall bestehend aus einem α IL-2-/ α CD45-Konjugat, mit dem $CD4^+$ Th-Zellen markiert werden, so dass die zelleigenen sezernierten IL-2 Moleküle direkt an der Zelloberfläche gebunden werden. CD45 ist ein Oberflächenmarker, der ubiquitär auf T-Lymphozyten exprimiert wird. Diese Methode war die Grundlage zur Untersuchung und Trennung von verschiedenen Populationen hinsichtlich ihrer Aktivierung und IL-2 Expression und ermöglichte die weitere Analyse auf Einzelzellebene, sowie die Isolation der Zellkerne für die Messung aktivierter Transkriptionsfaktoren (s. Abschnitt 3.2.4).

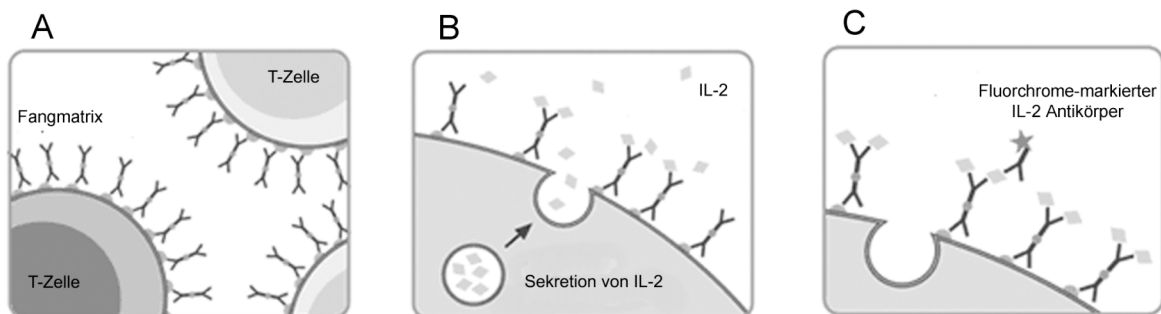


Abbildung 3.1 Prinzip des IL-2 Sekretionsassays. Der IL-2 Sekretionsassay dient zur Detektion von Interleukin-2 (IL-2) produzierenden humanen $CD4^+$ Th-Zellen. Die Zellen werden zunächst mit einer Fangmatrix inkubiert (A), die aus zwei gekoppelten Antikörpern besteht. Die Fangmatrix bindet mit dem einen Antikörper an spezifische Oberflächenmoleküle auf der Zelloberfläche. Produziert die Zelle nach Stimulation IL-2, bindet der zweite Antikörper der Fangmatrix spezifisch das sekretierte IL-2 (B). Durch Anfärben des an der Zelloberfläche gebundenen IL-2 mit einem Fluorochrome-markierten spezifischen Antikörper können die IL-2 Produzenten durchflusszytometrisch analysiert und durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung angereichert werden. Die Abbildung wurde von Miltenyi Biotech, Heidelberg entnommen und verändert.

Für den Sekretionsassay wurden $CD4^+$ Th-Zellen für 2h mit PMA/Ionomycin stimuliert und 3x mit eiskaltem PBS/BSA für 10min bei 300xg und 4°C gewaschen, um die Sekretionsaktivität zu stoppen und bereits sezerniertes IL-2 auszuwaschen. Die Zellen wurden 1:2 mit der Fangmatrix in eiskaltem RPMI Kulturmedium ‚komplett‘ für 3min auf Eis inkubiert

und anschließend in einer Zelldichte von 2×10^5 /ml in 37°C warmen RPMI Kulturmedium für 5min im Wasserbad kultiviert, um eine erneute Sekretionsphase einzuleiten. Während dieser Zeit wurde das sezernierte zelleigene IL-2 durch die Fangmatrix auf der Zelloberfläche gebunden. Die 37°C warme Zellsuspension wurde sofort auf Eis gestellt und mit eiskaltem PBS/BSA 1:1 aufgefüllt und bei $550 \times g$ für 15min pelletiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit eiskaltem PBS/BSA wurden die gebundenen Zytokine mit $\alpha\text{IL-2-APC}$ -konjugierten Antikörpern und $\alpha\text{CD40L-PE}$ -Antikörpern gefärbt. Mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (s. Abschnitt 3.2.2) wurden im Anschluss die IL-2 Produzenten von den IL-2 Nichtproduzenten getrennt und weiter analysiert.

3.1.12 Isolation von Zellkernen aus humanen CD4^+ Th-Zellen

Um nukleäre Transkriptionsfaktoren auf Einzelzellniveau detektieren zu können, mussten zunächst die Zellkerne aus humanen CD4^+ Th-Zellen isoliert werden. Es wurden 5×10^6 Zellen einmal in eiskaltem PBS gewaschen und in $500 \mu\text{l}$ eiskaltem Nuklei-Lysepuffer (0.5% Triton-X 100) resuspendiert und für 15min auf Eis durch hypotonische Lyse aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde mit Nuklei-Lysepuffer ohne Triton-X 100 zweimal bei $600 \times g$ für 10min bei 4°C gewaschen und die Zellkerne durch den im Puffer enthaltenen Sucrosegradienten von übrigen Zellkomponenten und Zelltrümmern aufgereinigt. Die pelletierten Zellkerne wurden vorsichtig gevortext und in 3% Formaldehyd für 20min bei Raumtemperatur fixiert.

3.2 Durchflusszytometrie und Methoden der Zelltrennung

3.2.1 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können die Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und weiterer Parameter anhand emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert werden [219]. Hierbei passieren Zellen, die mit Fluorchrom-konjugierten Antikörpern markiert wurden, in einem Flüssigkeitsstrom durch hydrodynamische Fokussierung nacheinander einen Laserstrahl. Neben der dabei entstehenden Anregung der Fluorochrome, die zur Emission von Fluoreszenzlicht führt, beugen die Zellen das einfallende Laserlicht zum sogenannten Streulicht (*Scatter*). Man unterscheidet das in geringem Winkel (3° - 10°) gestreute Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward Scatter*), das proportional der Zellgröße ist, und das um 90° reflektierte Seitwärtsstreulicht (SSC, *Sideward Scatter*), das mit der Granularität und Membranfaltung der Zelle korreliert. Das emittierte

Fluoreszenzlicht wird durch Teilerspiegel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangt dann auf photosensitive Detektoren, die proportional zur Intensität des einfallenden Lichts elektrische Signale erzeugen. Diese Signale werden wiederum entweder linear (FSC und SSC) oder logarithmisch (Fluoreszenzen) verstärkt und in digitale Signale umgewandelt. Die Auswertung der digitalen Signale erfolgte mit Hilfe der CellQuest Research Software (BD Bioscience). Durch Setzen von elektronischen Analysefenstern („gates“) können die gewünschten Zellpopulationen analysiert werden. Das Setzen dieser Analysefenster wird im Folgenden als „Gating“ bezeichnet. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA) mit einem 488nm Argonlaser und einem roten Diodenlaser (635nm) verwendet. Über die Anregung mit dem Argonlaser können neben dem Streulicht die Fluoreszenzen der Wellenlänge 530nm (FL1), 585nm (FL2) und 650nm (FL3) und über die Anregung mit dem Diodenlaser zusätzlich die Fluoreszenz der Wellenlänge 670nm (FL4) gemessen werden. In Tabelle 4 sind die Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome dargestellt.

Tabelle 4: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

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

Zur Trennung und Anreicherung einer definierten Zellpopulation aus einer gemischten Zellsuspension wurden die Methode der magnetischen Zellseparation (*Magnetic Cell Sorting*, MACS) und die Methode der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS) angewendet.

3.2.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung basiert auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie, die in Abschnitt 3.2.1 beschrieben wird, und wurde am FACS Vantage (Becton-Dickinson) durchgeführt. Zellen, die mit Fluorchrom-konjugierten Antikörpern markiert sind, werden mit einer isotonischen Trägerflüssigkeit aufgenommen, mittels Druckluft auf 9m/s beschleunigt und passieren einen fokussierten Laserstrahl. Das dabei entstehende

Streulicht und die emittierte Fluoreszenz wird in elektrische Signale umgewandelt und graphisch in Form von Punktdiagrammen am Computer dargestellt. Durch Setzen von Regionen in diesen Punktdiagrammen können markierte Zellen abgelenkt werden. Am Abrisspunkt bricht der Flüssigkeitsstrahl in Tröpfchen auf, die, wenn sie eine zu isolierende Zelle enthalten, mit einer elektrischen Ladung versehen werden, so dass sie beim Durchfliegen des elektrischen Feldes zwischen den geladenen Ablenkplatten in Auffangröhrchen abgelenkt werden. Im Anschluss an die Sortierung wurde eine Reanalyse der sortierten Zellen an einem FACS Calibur (Becton-Dickinson) durchgeführt, um die Reinheit der sortierten Zellen zu überprüfen.

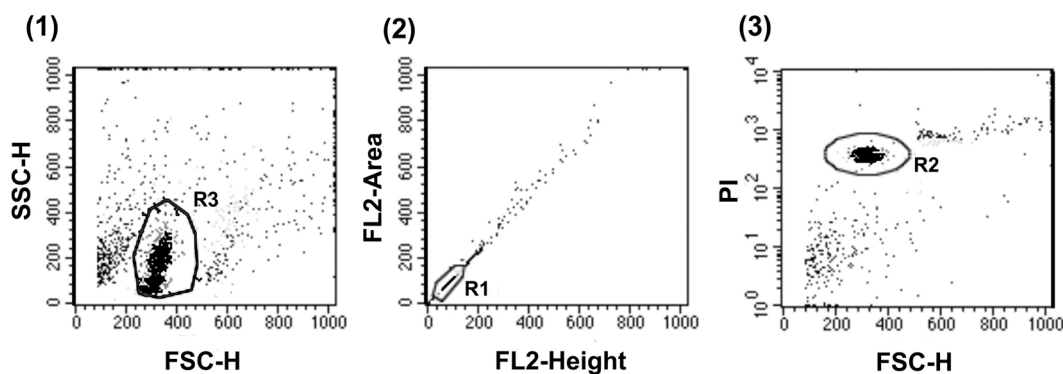
3.2.3 Magnetische Zellsortierung zur Isolierung von CD4⁺ Th-Zellen

Bei der magnetischen Zellsortierung (MACS) werden Zellen mit Antikörpern markiert, die an superparamagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von 100nm gekoppelt sind. Die Zellsuspension mit markierten und unmarkierten Zellen wird über eine mit Stahlwolle und Magnetkügelchen gefüllte Trennsäule gegeben, die sich in einem Permanentmagnetfeld befindet. Die unmarkierten Zellen durchlaufen die Säule, während die markierten Zellen an der Trennsäule haften bleiben und anschließend außerhalb des Magnetfeldes eluiert werden können. Es wurden ausschließlich Reagenzien der Firma Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach) verwendet. Zur Isolierung von CD4⁺ Th-Zellen wurden aufgereinigte PBMC mit CD4-Microbeads (magnetisch-gekoppelten α CD4-Antikörpern) und Beriglobin in PBS/BSA für 15min bei 12°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit PBS/BSA gewaschen und in 1ml PBS/BSA resuspendiert und über eine LS⁺ MACS Säule mit einer Kapazität von 1×10^8 positiven Zellen nach Herstellerangaben aufgetrennt und die CD4⁺ Th-Zellen nach Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld mit 3ml PBS/BSA eluiert. Analog dem ersten Anreicherungsschritt folgte ein weiterer mit einer frischen Säule, um die Reinheit der magnetisch markierten Zellen zu erhöhen. Zur Kontrolle der Sortierung wurden die Zellfraktionen mit Fluorchrom-markierten Antikörpern gegen CD4 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Reinheit der verwendeten CD4⁺ Th-Zellen für alle Experimente lag bei >98%.

3.2.4 Analyse von isolierten Zellkernen mittels Durchflusszytometrie

Um translozierte Transkriptionsfaktoren in isolierten und fixierten Zellkernen auf Einzelzellniveau durchflusszytometrisch analysieren zu können, wurden die mit Antikörpern gefärbten Zellkerne in PBS/BSA resuspendiert und der DNA-Farbstoff Propidiumjodid (PJ,

0.1mg/ml) 1:300 zugegeben [220]. Die Zellkerne wurden in einem FACS Calibur, das mit einem Puls Prozessor Modul, dem *Doublet Discrimination Module* (DDM), ausgestattet ist, analysiert. Der DDM Modus ermöglicht eine zeitliche Auflösung des Durchgangs der Zellen bzw. ihres Fluoreszenzparameters durch den Laserstrahl in Pulshöhe, -weite und fläche. Dadurch konnten Zell- oder Kerndoubletten, die im Vergleich zu Einzelzellen ein höheres Fluoreszenzsignal und eine längere Durchgangsdauer durch den Laserstrahl aufweisen und damit einen höheren DNA-Gehalt vortäuschen, unterschieden und ausgegated werden. Dies war wichtig, um die Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Transkriptionsfaktoren auf Einzelkernniveau richtig ermitteln zu können. Die Analyse der einzelnen Zellkerne erfolgte in drei Schritten durch Mehrfachgating:



- (1) Diskriminierung der Zellkerne (R3) von unspezifischer Debris bzw. unlysierten Zellen über SSC und FSC.
- (2) Ausschluss der Doubletten durch entsprechendes Gating in einem Punkthistogramm, indem linear FL-2-A (area) gegen FL-2-H (height) dargestellt wurde. Die Diagonale zeigt die einzelne Zellkerne (R1) oder Zellen.
- (3) Diskriminierung der Zellkerne (R2) von unlysierten fixierten Zellen und Debris auf Basis von PJ (FL-3) gegen FSC

Aus diesen drei Gates wurden 10.000 Ereignisse aufgenommen und im FL-1 mit FITC-konjugierten NFATc2-oder NF- κ B (p65)- Antikörpern analysiert.

3.2.5 Calciummessung mit dem Indo-1 Ca^{2+} Indikator in CD4^+ Th-Zellen

Für die Messung des Ca^{2+} Einstroms wurden die mit Indo-1 beladenen Zellen (s. Abschnitt 3.1.9) in einem FACS LSR II (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Anregungswellenlänge von Indo-1 liegt bei 355nm. Das Emissionsmaximum verlagert sich dabei von 485nm unter Ca^{2+} -freien Bedingungen nach 405nm in der Ca^{2+} -gesättigten Form. Damit einher geht eine Veränderung der Fluoreszenzintensität, die als Quotient

F_{405}/F_{485} unabhängig von der Farbstoffbeladung der Zelle die Veränderung in der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration anzeigt. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit $1\mu\text{g/ml}$ Ionomycin für maximalen Calciumeinstrom oder $\alpha\text{CD3}/\alpha\text{CD28}$ Antikörpern, die über αIgG_1 Antikörper im Verhältnis 1:3:1 vor Zugabe 30min bei 37°C kreuzvernetzt wurden. Zur Inhibierung des Ca^{2+} Einstromes diente der Ca^{2+} Chelator EGTA, der 15min vor Stimulation in einer Konzentration von 5mM zugegeben wurde.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Präparation von Proteinproben für die Gelelektrophoretische Analyse

Ausgangsmaterial für alle Western Blot Analysen waren humane CD4^+ Th-Zellen. Die Zellen wurden in gleicher Zellzahl aufgenommen und einmal in eiskaltem PBS für 10min bei 300xg bei 4°C gewaschen und in $50\mu\text{l}$ Laemmli Puffer/ 5×10^6 Zellen aufgenommen, bei 98°C denaturiert und die DNA mit einem Ultraschallstab sonifiziert.

3.3.2 Isolierung von Proteinen aus fixierten Zellen

Für die Analyse von Proteinen aus DSP fixierten Zellen (s. Abschnitt 3.1.6), wurden die Zellen in Laemmli Puffer mit 5% Mercaptoethanol für 15min bei 100°C denaturiert und analog Abschnitt 3.3.1 behandelt. Durch die Erhitzung werden die Thiolgruppen des DSP aufgespalten und die darübervernetzten Aminogruppen wieder freigegeben. Formaldehyd-fixierte Zellen (s. Abschnitt 3.1.6) wurden zunächst einmal mit PBS gewaschen und dann 20min bei 100°C und für weitere 2h bei 60°C in RIPA-Puffer schüttelnd inkubiert [221]. Die Zellsuspension wurde 1:1 mit Laemmlipuffer versetzt und analog Abschnitt 3.3.1 behandelt.

3.3.3 Fraktionierung von Zellextrakten aus CD4^+ Th-Zellen

Humane CD4^+ Th-Zellen wurden nach Herstellerangaben mit dem Nuclear Extract Kit von Active Motif (Rixensart, Belgien) in eine Kernfraktion und eine zytosolische Fraktion getrennt und nach Zugabe von Laemmlipuffer mittels SDS-PAGE analysiert.

3.3.4 Fällung von Proteinen

Zur Konzentrierung der zytosolischen Proteinfraction wurde diese mit dem 2-fachen Volumen an eiskaltem Aceton gut gemischt und für 30min bei -20°C gefällt. Die Proteine wurden anschließend bei $15.000\times g$ für 10min sedimentiert, an der Luft getrocknet und in Laemmli-Puffer resuspendiert.

3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE in Tris-Glycin-Gelen aufgetrennt [216]. Für die Analyse wurden Proteine mit einem Molekulargewicht bis 90kDa über 10% Trenngele, $>90\text{kDa}$ über 7.5% Trenngele bei konstanter Spannung von 140V aufgetrennt. Als Protein-Größenmarker diente der Seeblue Plus2® Prestained Standard (Invitrogen), die verwendeten Puffer sind unter Abschnitt 2.1.1 beschrieben.

3.3.6 Western Blot

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine nach der Tank-Blot Methode elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierzu wurde das Blot-Sandwich luftblasenfrei zusammengesetzt, so dass die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode gerichtet waren. Der Transfer fand für Proteine mit einem Molekulargewicht bis 90kDa bei 4°C für 1h, für Proteine mit einem Molekulargewicht $>90\text{kDa}$ bei 4°C für 3h bei konstanter Spannung von 100V statt. Zur Überprüfung des Transfers wurden Proteine auf der Membran mit Ponceau S (0.2-3% in 3% TCA) angefärbt. Die hydrophoben Bereiche der Membran wurden für 1h mit 3% BSA/PBS bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper in PBS-T mit 1% BSA über Nacht bei 4°C . Der primäre Antikörper wurde mit Peroxidase-konjugierten α -Maus bzw. α -Kaninchen IgG (1:5000 in PBS-T mit 1% BSA) für 45min bei Raumtemperatur detektiert und die Peroxidase-Aktivität durch Chemilumineszenz mit dem ECL-System (ECL Western Blotting Protocols, Amersham, 1994) visualisiert. Alternativ wurden die Blots mit dem auf Infrarot basierenden Odyssey® Imaging System der Firma LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, analysiert. Die Blots wurden hierzu mit einem speziellen Blotpuffer der Firma LI-COR für 1h geblockt und nach Inkubation der primären Antikörpern mit IrD800-konjugierten (LI-COR) bzw. Alexa680-konjugierten (Molecular Probes, Eugene, OR) α -Maus oder α -Kaninchen IgG für 45min bei Raumtemperatur ge-

gengefärbt. Hierdurch konnten simultan zwei unterschiedliche Zielproteine äußerst sensitiv detektiert werden.

3.3.7 Strippen und Rehybridisieren von Western Blots

Um Proteine ähnlicher molekularer Größe auf demselben Blot nachzuweisen, mussten die spezifischen Primär- und Sekundärantikörper der ersten Nachweisreaktion entfernt („gestrippt“) werden. Dies geschah durch Aufspaltung der ionischen Wechselwirkungen zwischen Antikörper und Protein unter Verwendung eines stark sauren Stripping-Puffers. Hierzu wurde der Blot für 10min in destilliertem Wasser geschwenkt und für 3x20min in einer frisch mit β -Mercaptoethanol angesetzten Stripping-Solution inkubiert. Danach wurde der Blot 3x10min in PBS gewaschen und für 1h in 3% BSA/PBS Lösung blockiert und mit dem nächsten Primärantikörper analog Abschnitt 3.3.6 rehybridisiert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Extraktion von Gesamt-RNA und mRNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen CD4⁺ Th-Zellen erfolgte unter RNase-freien Bedingungen nach Protokollen und Verwendung von RNeasy-Spin-Säulen des RNeasy-Mini-Kits von Qiagen, Hildesheim. Anschließend wurde die RNA (1-5 μ g) mit DNase I behandelt (1U/1 μ g RNA). Die Poly(A)⁺-mRNA wurde in der Folge über Oligo(dT) Hybridisierung unter Verwendung des Oligotex mRNA Kit (Qiagen) isoliert. Die Menge der erhaltenen RNA bzw. später cDNA wurde mit einem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer ermittelt.

3.4.2 Reverse Transkription von mRNA

Zur Synthese von cDNA wurde 1 μ g RNA in einem Reaktionsmix aus 10mM dNTPs und 0,5 μ g Oligo (dT)-Primern zunächst für 5min bei 65°C erhitzt, um alle Sekundärstrukturen der RNA zu schmelzen, und sofort auf Eis gestellt. Nach Herstellerangaben (Gibco BRL/Invitrogen) wurde 5x First-Strand-Puffer mit 0.1M DTT zugegeben und für 2min bei 42°C inkubiert. Mit der Zugabe von 100U des Enzyms SuperScript II RT (Gibco BRL/Invitrogen) wurde die reverse Transkription bei 42°C für 50min durchgeführt. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurden die Proben für 15min auf 70°C erhitzt.

Durch Überprüfung des Haushaltsgens β -Actin mit spezifischen Primern wurde mittels PCR die Menge der transkribierten cDNA ermittelt. Die optimale Annealing-Temperatur der Primer wurde über eine Gradienten-PCR ermittelt (s. Abschnitt 3.4.3). Die PCR-Ansätze wurden in einem 1.5% Agarosegel aufgetragen und über den Größenmarker VI (Roche) identifiziert.

3.4.3 PCR Amplifikation von cDNA

Alle Primer wurden mit dem Softwareprogramm Oligo4 ermittelt und von der Firma Tibmolbiol, Berlin, synthetisiert. Die Annealing-Temperatur wurde mit dem Softwareprogramm Oligo4 nach Basenzusammensetzung und Länge der verwendeten Primer errechnet und über eine Gradienten-PCR optimiert. Den PCR-Ansatz und das Gradienten-PCR Programmprotokoll zeigt Tabelle 5. Das Gradienten-PCR Programm wurde für alle PCR Läufe benutzt.

Tabelle 5: PCR Ansatz und Gradienten-PCR Programm

PCR - Ansatz	Gradienten - PCR Programm
2 μ l cDNA (1:10)	94°C 5 min
2 μ l PCR-Puffer (10x)	94°C 1 min
1 μ l MgCl ₂ (25mM)	x°C 1 min
0,2 μ l dNTPs (25mM)	72°C 1 min
2 μ l Forward Primer (10mM)	72°C 10 min
2 μ l Reverse Primer (10mM)	4°C ∞
0,5 μ l Taq-Polymerase	x = Annealing Temperaturgradient
10,8 μ l H ₂ O	

} 32 x

3.4.4 Amplifikation von cDNA im Light Cycler

Zur Quantifizierung der cDNA im Light Cycler wurde in Doppelansätzen zu je 20 μ l je 100ng cDNA mit je 5pmol der jeweiligen spezifischen Primer im Light Cycler mit dem LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche) gemäß den Herstellerangaben untersucht. Für jedes Primerpaar wurde zunächst die richtige MgCl₂-Konzentration ausgetestet, die ausgewählten Elongationszeiten richteten sich nach der Amplikonlänge (1sec/25bp).

Tabelle 6: Light Cycler Parameter für die untersuchten Gene

Gen	Annealing	MgCl ₂ -Konzentration	Amplikonlänge	Elongationszeit
β-2 Mikroglobulin	56°C	3.5 mM	248 bp	11sek
CaN Aβ (genom DNA)	62°C	4 mM	206 bp	9sek
IL-2 (cDNA)	58°C	4 mM	307 bp	13sek
IL-2 proximaler Promotor	61°C	3.5 mM	194 bp	8 sek
IL-2 (genom DNA)	61°C	3.5 mM	297 bp	12 sek

Die Annealing-Temperatur wurde mit dem Softwareprogramm Oligo4 nach Basenzusammensetzung und Länge der verwendeten Primer errechnet und über eine Gradienten-PCR optimiert (s. Abschnitt 3.4.3). Tabelle 6 zeigt die ermittelten Werte für die untersuchten Gene. Der Programmablauf der PCR im Light Cycler ist in Tabelle 7 dargestellt. Als interne Kontrolle ohne Zellzyklus-spezifische Schwankungen und zur Normalisierung der eingesetzten DNA Menge diente die Amplifikation eines Fragments der β-2 Mikroglobulin cDNA. Für die Normalisierung der genomischen DNA wurde ein Fragment des humanen CaNAβ-Gens verwendet. Die PCR-Produkte wurden darüber hinaus über eine Schmelzpunktanalyse überprüft, um eine unspezifische Amplifikation auszuschließen.

Tabelle 7: Protokoll der Light Cycler PCR

Aktivierung der Taq-Polymerase	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	10 sek	} 45 x
Annealing	s.Tab.3	10 sek	
Elongation	72°C	1 min	
Schmelzkurve	{ 95°C 10 min 65°C 15 sek 0.1°C / sek bis 95°C		
Kühlung	4°C	∞	

Als Standardproben zur Ermittlung einer Standardkurve wurden verschiedene Konzentrationen cDNA oder genomischer DNA von 1:10 bis 1:500 eingesetzt. Die Standardkurve diente zur Ermittlung des Faktors, um den sich die Anzahl der Amplikons pro Zyklus erhöht und wurde durch Auftragen der erhaltenen *Crossing points* (cp, Schnittpunkte) aller verdünnten Proben gegen ihre logarithmisierten Konzentrationen mit Hilfe der Software RelQuant 1.01 errechnet. Die Amplifikationseffizienz (E) berechnete sich wie folgt: $E = 10^{1/\text{Steigung}(\Delta cp)}$. Über die Differenz der cp der unstimulierten Kontrolle mit der ermittelten cp der gemessenen Probe konnte die vielfache mRNA Expression errechnet werden: $Xy = E^{(cp \text{ unstim} - cp \text{ Probe})}$.

3.4.5 Quantitative PCR zur Amplifikation genomischer DNA

Die genomische DNA wurde aus präparierten Zellkernen (s. Abschnitt 3.4.6) oder intakten humanen CD4⁺ Th-Zellen mit dem Invisorb® Spin Cell Mini Kit (Invitex, Berlin) nach Herstellerangaben extrahiert. Als Standardproben wurden 100ng genomische DNA eingesetzt. Um eine Standardkurve zu erstellen, mit der die genomischen Kopien unbekannter DNA Proben ermittelt werden können, wurden die PCR ermittelten Schnittpunkte oder CP-Werte (*crossing points*) auf der y-Achse gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentration (x-Achse) aufgetragen.

3.4.6 CHART-PCR Assay

Der *Chromatin Accessibility by Real-Time PCR* (CHART-PCR) Assay basiert auf der RT-PCR gestützten Untersuchung und Charakterisierung von Chromatinveränderungen und Umlagerungen induzierbarer Gene durch Verwendung DNA modifizierender Enzyme [136, 137]. Stimulierte und unstimulierte Zellen (5×10^6) wurden pelletiert und einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500µl NP-40 Lysispuffer resuspendiert und für 5min auf Eis inkubiert. Das im Lysispuffer enthaltene Spermin und Spermidin schützte dabei die Histon-gepackte DNA vor unspezifischer Entfaltung. Die Zellkerne wurden 10min bei 150xg und 4°C pelletiert und in einmal in RE-Puffer gewaschen. Für den Verdau mit dem Restriktionsenzym *DraI* wurden die Zellkerne in 50µl NEB 4 Puffer (New England Biolabs) resuspendiert und mit 20U *DraI* für 1h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde für jede Probe ein Aliquot ohne *DraI* inkubiert, um ein Maß für die Endonuklease-Aktivität und die damit verbundene Degradation der genomischen DNA während der Inkubationszeiten zu erhalten. Nach Hitze-Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 20min wurde die genomische DNA isoliert (s. Abschnitt 3.4.5) und bei –20°C gelagert.