

4. Methoden

4.I. Molekularbiologische Methoden

4.I.1. DNA-Techniken

4.I.1.1. Isolation genomischer DNA aus Zellsuspensionen

Zur Isolation genomischer DNA aus Zellsuspensionen wurde das peqGOLD[®] Tissue DNA Mini Kit (Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet und nach Protokollangaben gearbeitet.

Zudem wurde genomische DNA mittels peqGOLD[®] TriFast (Peqlab) über Phenol-Chloroform Methode isoliert. Dazu wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen in 1 ml peqGOLD[®] TriFast resuspendiert und bei Raumtemperatur (RT) für 5 Minuten lysiert. Nach der Lyse wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, für 15 Sekunden per Hand geschüttelt und, zur Trennung der Phasen, für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 10 Minuten, 4°C) und vollständiger Phasentrennung wurde die oberste, wässrige Phase (beinhaltet die RNA) zur weiteren RNA-Isolation vorsichtig abgenommen (s. 4.I.2.2.)

Die DNA wurde aus der untersten, organischen Phenol-Chloroform-Phase und der Interphase isoliert. Zur Präzipitation der DNA wurden 300 µl 100% Ethanol hinzugegeben und mittels Inversion der Reaktionsgefäße vermischt. Die DNA wurde durch Inkubation für 2-3 Minuten bei RT und anschließender Zentrifugation (2000 g, 5 Minuten, 4°C) sedimentiert. Zur Reinigung der DNA von Phenol-Chloroform Rückständen wurde das DNA-Pellet zweimal mit 0,1 M Natriumcitrat (in 10% Ethanol) gewaschen, jeweils, unter gelegentlichem invertieren, für 30 Minuten bei RT inkubiert und abzentrifugiert (2000 g, 5 Minuten, 4°C). Dann wurden 1,5 ml 75% Ethanol hinzugegeben, unter gelegentlichem Invertieren für 15 Minuten bei RT inkubiert und erneut abzentrifugiert (2000 g, 5 Minuten, 4°C). Die DNA wurde für 5-10 Minuten luftgetrocknet und so das restliche Ethanol entfernt. Resuspendiert wurde die DNA in 8 mM Natriumhydroxid-Lösung und der pH-Wert mit 0,1 M HEPES-Lösung auf pH 7-8,0 adjustiert.

4.I.1.2. Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolation kleiner Plasmid-Mengen (Mini-Präp) wurden 3 ml Bakterienkultur über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 6000 rpm pelletiert. Die Resuspension des Bakterienpellets erfolgte in 400 µl Resuspensions-Puffer S1 (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Zur Lyse wurde 400 µl Lyse-Puffer S2 (Macherey-Nagel) hinzugegeben, fünfmal invertiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Lyse

durch Zugabe von 400 µl Neutralisations-Puffer S3 (Macherey-Nagel) und fünfmaligem Invertieren gestoppt. Nach Zentrifugation (15000 rpm, 5 Minuten, RT) wurde der Überstand abgenommen und mit dem 0,7fachen Volumen an Isopropanol versetzt. Die DNA wurde dann mittels Zentrifugation (15000 rpm, 15 Minuten 4°C) gefällt und mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Erneut wurde abzentrifugiert (15000 rpm, 15 Minuten, 4°C), das DNA-Pellet über Lufttrocknung (5-10 Minuten, RT) von Ethanol-Resten befreit und danach in 20-50 µl Millipore-H₂O resuspendiert.

Größere Plasmid-Mengen (Maxi-Präp) wurden mittels dem QIAGEN[®] Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) isoliert. Es wurde nach Herstellerprotokoll verfahren.

4.I.1.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten über Gel-Elektrophorese wurden, in Abhängigkeit von den Fragmentgrößen, 1-2 prozentige Agarosegele präpariert. Dazu wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer angesetzt, in der Mikrowelle geschmolzen und, zur Visualisierung der DNA, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 10 ng/ml) versetzt. Nach Abkühlen auf ca. 60°C wurde die Agarose-Lösung in die Gelkammern gegossen und polymerisieren lassen. Zur Elektrophorese wurden die Gelkammern in Laufkammern gesetzt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit dem 0,1fachen Volumen an 10x Ladepuffer versehen und in die Geltaschen geladen. Als Spannung wurde 60-100 Volt angelegt.

4.I.1.4. Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Nach erfolgter Elektrophorese wurde die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht und die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel herausgeschnitten und verwahrt. Zur Isolierung der DNA wurde das QIAexII[®] Gel extraction Kit (QIAGEN) benutzt und nach Herstellerprotokoll gearbeitet.

4.I.1.5. Photometrische Quantifizierung der DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA wurde im Photometer die Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Dazu wurde die zu vermessende DNA-Lösung 1:10 bis 1:100 verdünnt und gegen das reine Lösungsmittel gemessen. Die Konzentration der DNA wird von dem Photometer automatisch berechnet: bei doppelsträngiger DNA entspricht dabei eine OD_{260 nm} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Der Koeffizient OD_{260 nm}/OD_{280 nm} gibt die Reinheit an und sollte über 1,8 liegen.

4.I.1.6. Quantifizierung der DNA mittels γ /HindIII-Fragmenten

Bei sehr geringen DNA-Konzentrationen wurde die genaue Konzentration nicht photometrisch, sondern mittels Gel-Elektrophorese ermittelt. Dazu wurden die zu bestimmende DNA-Lösung 1:5-1:20 verdünnt und auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Zudem wurden 50, 100, 200 und 400 ng γ /HindIII-Marker (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) aufgeladen.

Die DNA-Mengen der unterschiedlichen γ /HindIII-Fragmente sind bekannt. So kann nach erfolgter Elektrophorese durch einen Vergleich der Intensität der DNA-Proben-Banden mit den Intensitäten der γ /HindIII-Fragmentbanden die DNA-Konzentration bestimmt werden.

4.I.1.7. Klonierung des retroviralen Vektors *BCL-2*Mieg3

4.I.1.7.1. Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

Beim Klonieren wird ein DNA-Insert-Fragment in einen Vektor ligiert und so Plasmide mit neuer Sequenzfolge hergestellt, die dann in Bakterien amplifiziert werden können.

Zur Klonierung des retroviralen Vektors *BCL-2*Mieg3 wurde das humane *BCL-2* mittels EcoRI-Restriktionsverdau (MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) aus dem Plasmid *BCL-2*pBabe-puro (Ulf Rapp, Institut für Medizinisches Strahlentherapie und Zellforschung der Universität Würzburg, Deutschland) herausgeschnitten und in das EcoRI-linearisierte Vektor-Plasmid Mieg3 (Dr. David Williams, Cincinnati, USA) inseriert (Abbildung 6).

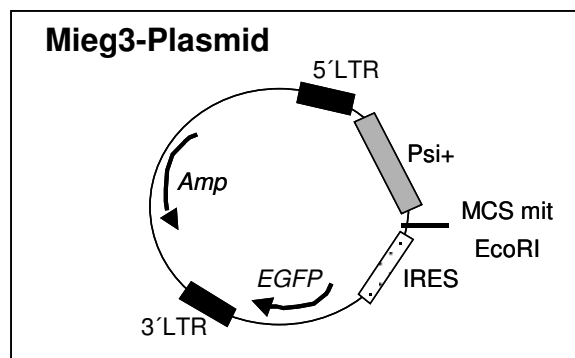


Abbildung 6: Mieg3 Plasmid: Das 6,7 kb große Plasmid kodiert das Reportergen *EGFP* und das Ampicillinresistenz-Gen (*Amp*). Über die „multiple cloning site“ (MCS) können weitere Gene inseriert werden, die mit dem EGFP über eine „internal ribosomal entry site“ (IRES) verbunden sind. Die „long terminal repeats“ (LTR; 5' und 3') garantieren die stabile Integration des Plasmides in das Genom. Psi+ = RNA-Verpackungssignal.

Restriktionsverdau:

1-10 µg Plasmid-DNA (*BCL-2pBabe-puro* bzw. *Mieg3*)

1-3 U EcoRI pro 1 µg DNA

0,1faches Volumen an 10x EcoRI Restriktionspuffer

mit Millipore-H₂O bis 20-50 µl auffüllen

Restriktionsansatz für 1-2 h bei 37°C inkubieren.

Dephosphorylieren: Damit der linearisierte Vektor sich nicht sofort religiert, wurden die 5'DNA-Enden mittels der CIAP-Phosphatase (MBI Fermentas) dephosphoryliert. Dazu wurde pro 1 µg DNA 1 U CIAP hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

Die Enzyme wurden vor der Ligation der Fragmente hitzeinaktiviert (10 Minuten, 65°C).

4.I.1.7.2. Ligation

Nach der Auftrennung der Restriktionsfragmente über Gel-Elektrophorese (bei maximal 80 Volt), Extraktion der DNA aus der Agarose und Konzentrationsbestimmung mittels γ /HindIII-Marker wurden das Insert-Fragment und der Vektor ligiert.

Ein molares Verhältnis von 1:3 für das Verhältnis Vektor:Insert wurde bei der Ligation verwendet.

Die Menge an Insert-DNA wurde dabei folgendermaßen berechnet:

$$(\text{ng}_{\text{Vektor}} \times \text{kb}_{\text{insert}}) / (\text{kb}_{\text{Vektor}} \times \text{molares Verhältnis}_{\text{Vektor/Insert}}) = \text{ng}_{\text{Insert}}$$

Es wurden immer 50-100 ng Vektor-DNA eingesetzt.

Ligationsansatz:

50-100 ng Vektor-DNA

berechnete ng Insert-DNA

2 µl T4-Ligase (5 U/µl) (MBI Fermentas)

2 µl T4-Ligase Puffer, 10x (MBI Fermentas)

mit Millipore-H₂O bis 20 µl auffüllen

Der Ligationsansatz wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die T4-Ligase hitzeinaktiviert (10 Minuten, 65°C).

4.I.1.7.3. Transformation in kompetente DH5 α Bakterien

5-10 μ l Ligationsansatz wurden in das mindestens 10fache Volumen an chemisch kompetenten DH5 α Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Dazu wurde der Ligationsansatz vorsichtig mit den Bakterien vermischt und dann 20 Minuten auf Eis heruntergekühlt. Zur DNA-Aufnahme erfolgte dann der Hitzeschock (42°C, 50 Sekunden) und anschließend erneutes Platzieren auf Eis für 2 Minuten.

Zur Vorkultur wurde 800 μ l 37°C-warmes LB-Medium, ohne Antibiotika, hinzugegeben und 30-60 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten, versetzt mit 100 ng/ml Ampicillin, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.I.1.7.4. Screening der Bakterien-Kolonien

Von den Kolonien auf den LB-Agarplatten wurden Mini-Präps (s. 4.I.1.2) angefertigt.

Zur Bestimmung einer erfolgreichen Insertion und Ermittlung der gewünschten Orientierung des Inserts im Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und NotI (MBI Fermentas) verdaut (DNA-Fragmente: 338bp und 7111bp). Von einem positivem Bakterienklon wurde dann eine Maxi-Präp hergestellt.

4.I.1.7.5. Sequenzierung des retroviralen Konstrukts *BCL-2Mieg3*

Vor der retroviralen Transduktion wurde das Plasmid *BCL-2Mieg* mit den Primern Mieg3 5.0 und Mieg3 3.0 sequenziert (Sequenzier-Service von Agowa, Berlin, Deutschland) und mittels der SeqMan DNA Star Software (DNA Star, Konstanz, Deutschland) analysiert.

4.I.1.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen wurden folgendermaßen angesetzt:

Standard-PCR-Ansatz:

- 1x PCR Puffer (DNA: Puffer B Roboklon, Berlin, Deutschland;
cDNA: Bioline, Luckenwalde, Deutschland)
- 2 mM MgCl₂ (Zugabe nur bei Verwendung des PCR-Puffers von Bioline)
- 0,2 mM dNTP-Mix (Bioline)
- 0,5 μ M je Primer (Biotex, Berlin, Deutschland)
- 2,5 U Taq-Polymerase (Bioline)
- 20-100 ng genomische DNA
bzw. 50-100 ng cDNA

Alle PCR-Reaktionen wurden in 25 µl Gesamtvolumen durchgeführt.

Als Template diente genomische DNA und cDNA (RT-PCR). Die Primer sind unter 3.V. angegeben.

Standard-PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	4-5 Minuten	} 35-40 Zyklen
Denaturierung	95°C	25-30 Sekunden	
Annealing	57/58°C	25-30 Sekunden	
Elongation	72°C	s.u.	
Abschließende Elongation	72°C	10 Minuten	

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Für alle Primer der PCR an DNA wurde eine Annealing-Temperatur von 58°C gewählt, für die Primer der PCR an cDNA eine optimale Annealing-Temperatur von 57°C bestimmt.

Die Elongationszeit wird durch die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes bestimmt. Generell gilt: pro 1 kb zu amplifizierendes Material 1 Minute elongieren. Die Fragmentgrößen lagen hier bei 100-1000bp, so wurde als Elongationszeit 30 Sekunden bis 1 Minute gewählt.

4.I.1.9. Mikroarray-basierende comparative Genomhybridisierung (Array CGH)

Zur Array CGH wurde genomische DNA aus murinen Knochenmarkzellen isoliert, eine cDNA Mikroarray Plattform von „Stanford Functional Genomics Facility“ verwendet und wie publiziert verfahren (Sander et al., 2005). Durch Festlegung der mittleren Fluoreszenz-Rate für alle Array-Elemente auf 1 wurden die Hintergrund-abgegliche Fluoreszenz-Raten für alle Arrays normalisiert. Gemessen Gene wurden als signifikant eingestuft wenn die Fluoreszenz-Intensität des Cy3 Referenzkanals 1,4fach über dem Hintergrund lag. Über die NCBI Genomkarten-Datenbank, mit Zugriff über den UCSC Genom Browser (NCBI Build 30), wurden die genomischen, chromosomalen Positionen für die detektierten array cDNA Klone bestimmt. Ca. 23000 cDNA Klonen, die ca. 14000 eindeutige Gene repräsentieren, konnten ihre Genom-Positionen zugeordnet werden. Die mittlere Positionsauflösung lag bei 109 kb respektive 22 kb (durchgeführt von Dr. Lars Bullinger, Universitätsklinikum Ulm, Deutschland).

4.I.2. RNA-Techniken

4.I.2.1. Bedingungen für RNase freies Arbeiten

Zum Schutz der RNA vor Degradation müssen beim Arbeiten mit RNA RNase freie Bedingungen herrschen. So wurde vor Arbeitsbeginn die Arbeitsfläche und die Pipetten mit DEPC-H₂O gereinigt, es wurde immer mit frischen Handschuhen gearbeitet und neue, nicht kontaminierte Eppendorf-Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen verwendet. Als Lösungsmittel wurde immer DEPC-H₂O verwendet.

4.I.2.2. Isolation von Gesamt-RNA aus Zellsuspensionen

Gesamt-RNA für spätere Real-Time PCR-Experimente wurde mit dem peqGOLD[®] Total RNA Kit (Peqlab) aus Zellsuspensionen isoliert. Dabei wurde nach Herstellerangaben gearbeitet.

Gesamt-RNA zur reversen Transkription und anschließender RT-PCR wurde mittels peqGOLD[®] Trifast (Peqlab) aus den Zellen extrahiert. Dazu wurden 5-10x10⁶ Zellen in 1 ml peqGOLD[®] TriFast resuspendiert und bei RT für 5 Minuten lysiert. Nach der Lyse wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, für 15 Sekunden per Hand geschüttelt und, zur Trennung der Phasen, für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 10 Minuten, 4°C) und vollständiger Phasentrennung wurde die oberste, wässrige Phase (beinhaltet die „messenger“-RNA, die Transfer-RNA und die ribosomale RNA) zur weiteren RNA-Isolation vorsichtig abgenommen. Zur Präzipitation der RNA wurde die wässrige Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt, für 10 Minuten bei RT inkubiert und dann abzentrifugiert (12000 g, 10 Minuten, 4°C). Das RNA-Pellet wurde in 75% Ethanol gewaschen, durch vortexen gut vermischt und dann erneut zentrifugiert (7500 g, 5 Minuten, 4°C). Die Ethanol-Reste wurden beim Lufttrocknen (5-10 Minuten, RT) des RNA-Pellets entfernt und die RNA in DEPC-H₂O resuspendiert (15-25 Minuten, 58°C).

4.I.2.3. Reverse Transkription der RNA

Eine Erst-Strang-Synthese wurde mit dem RevertAid[®] H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) durchgeführt. Es wurde nach Herstellerprotokoll gearbeitet.

4.I.2.4. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde mit dem Light Cycler[®] System (Roche Diagnostics, Mannheim) unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green 1 Kit (Roche Diagnostics) durchgeführt. Als Template diente cDNA (70-200 ng) synthetisiert aus der RNA aus Knochenmarkzellen, Milzzellen und Knochenmark-Makrophagen, wobei jeweils das Material von 2-3 Mäusen eines Genotypes gepoolt wurde. Die verwendeten Primer sind unter 3.V. angegeben.

Standard Real-Time-PCR-Programm:

Initiale Denaturierung:	95°C	10 Minuten	
Denaturierung:	95°C	10 Sekunden	} 40-45 Zyklen
Annealing:	60°C	5 Sekunden	
Elongation:	72°C	3 Sekunden	
Fluoreszenz-Messung: (nach jedem Zyklus)	84°C (<i>Nf1</i>) bzw. 89°C (<i>Gapdh</i>), spezifische T _m		
Abschließende Elongation:	72°C	7 Minuten	
Schmelzkurve:	65-99°C		

SYBR Green ist ein Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Bei Bindung erhöht sich die Fluoreszenz um das 100fache. So wird in jedem Zyklus nach der Elongation das Fragment denaturiert und dabei der Abfall der Fluoreszenzrate (bei der fragment-spezifischen Schmelztemperatur (T_m)) gemessen. Zur Überprüfung der Produkt-Spezifität wurde zudem eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt. Diese zeigt an, dass bei der speziellen Schmelztemperatur tatsächlich nur die freiwerdende Fluoreszenz des gewünschten Produktes und nicht z.B. der Primer-Dimere oder eines unspezifischen Produktes gemessen wird. Die „crossing points“ (CP) wurden bestimmt über den “second derivative maximum“-Algorithmus bei arithmetischer Baseline-Anpassung. Die relative *Nf1*-Menge (% *Nf1*) in Relation zur *Gapdh*-Menge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% Nf1 = 2^{((CP(Nf1, Referenz) - CP(Gapdh, Referenz)) - (CP(Nf1, Sample) - CP(Gapdh, Sample)))}$$

Die %*Nf1*-Werte der jeweiligen Referenz-Proben wurden auf 100% normalisiert.

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden diese nach Durchlaufen des Light Cyclers mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

4.I.3. Protein-Techniken

4.I.3.1. Gesamtproteinextrakte aus Zellen

Zur Entfernung aller Medienrückstände wurden die pelletierten Zellen zweimal in PBS gespült. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 5 Minuten, 4°C) wurde das Zellpellet in RIPA-Puffer, ergänzt mit den Protease-Inhibitoren (Roche, Mannheim, Deutschland), für mindestens 30 Minuten auf Eis lysiert. Das Lysat wurde über Zentrifugation gereinigt (14000 rpm, 15 Minuten, 4°C) und durch Zugabe von 0,25fachen Volumen an 4xSDS-Ladepuffer und 5 minütigem Aufkochen bei 95°C denaturiert. Die Proteinlysate wurden entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert.

4.I.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode. Dazu wurden 1-10 µl Proteinlysate (nicht denaturiert, ohne SDS-Ladepuffer) zu 1000 µl Bradford-Lösung gegeben und gut gemischt. Nach 20minütiger Inkubation bei RT wurde die optische Dichte der Proben bei 595 nm bestimmt. Mittels einer Eichkurve, erstellt anhand von Proben mit bekannten BSA(Protein)-Konzentrationen, konnte die Proteinmenge in den Proben ermittelt werden.

4.I.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung denaturierter Proteine

Die denaturierten Proteine wurden, in Abhängigkeit von ihrer Größe, mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die SDS-Gele setzen sich aus zwei Phasen zusammen: dem Sammelgel, das die Proben sammelt und einen gleichzeitigen Start der Separierung ermöglicht, und schließlich dem Trenngel zur Auftrennung der Proteine. Das Trenngel wird zuerst gegossen, je nach Proteingröße wird der Polyacrylamid-Anteil verändert. Bei dem 26 kDa großen Protein BCL-2 wurde ein 10% Trenngel verwendet.

Die Bestandteile für das Trenngel (s.u) wurden kombiniert und gut vermischt. Das Trenngel wurde in die horizontalen SDS-PAGE Gelkammern pipettiert, mit wassergesättigtem 2-Butanol überschichtet und polymerisieren lassen (30-60 Minuten, RT). Im Anschluss wurde durch Dekantieren das 2-Butanol entfernt und das Sammelgel dem Trenngel überschichtet, sowie der Gelkamm eingesteckt und das Sammelgel 15-30 Minuten polymerisieren lassen.

Die auspolymerisierten SDS-Gele wurden in die Gelelektrophoresekammern gespannt, die Apparatur mit Elektrophorese-Laufpuffer versehen und die Proteinlysate geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 20 mA.

Trenngel (10%):		Sammelgel:	
Acrylamid (30%)/	5 ml	Acrylamid (30%)/	0,65 ml
Bisacrylamid (0,8%)		Bisacrylamid (0,8%)	
Trenngelpuffer	3,75 ml	Sammelgelpuffer:	1,25 ml
H ₂ O	6,25 ml	H ₂ O	3,05 ml
APS	60 µl	APS	36 µl
TEMED	12 µl	TEMED	6 µl

4.I.3.4. Western Blot

Nach der Auftrennung wurden die Proteine in einem Semi-Dry-Blotter auf eine hochaffine Nitrozellulosemembran gebracht. Dazu wurde das Gel und die Membran 5-10 Minuten in Transfer-Puffer vorinkubiert. Drei Lagen mit Transfer-Puffer befeuchtetes Whatman-Papier wurden auf die Blotting-Apparatur aufgelegt, dann die Nitrozellulosemembran und dann das Gel aufgeschichtet und mit drei Lagen befeuchtetes Whatman-Papier überlagert. Geblottet wurde für 40 Minuten bei einer Spannung von 0,4 Volt/cm². Die Blotting-Effizienz wurde über eine Ponceau-Färbung überprüft. Dazu wurde die Nitrozellulose für 10 Minuten in Ponceau-Lösung gefärbt, überschüssige Farbe mit H₂O heruntergewaschen und der Blot im Image Reader[®] (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) fotografiert.

Zur Blockierung der unspezifischen Bindestellen wurde die Membran anschließend (1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C) in Blockierungslösung geschüttelt. Dem folgte der Inkubationsschritt mit dem ersten Antikörper (Antikörper: BCL-2 1:500 in 3% BSA, 0,5% Tween 20, 0,1% NaN₃, in TBS-T) für 2-3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C. Der 1. Antikörper wurde abgenommen und, zur Beseitigung der Rückstände, wurde die Membran dreimal für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Danach wurde der zweite Peroxidase-gekoppelte Antikörper (1:3000 in Blockierungslösung) aufgebracht und für 1-2 Stunden bei RT geschüttelt. Nach Abnahme der Antikörper-Lösung erfolgte wiederum dreimaliges Waschen der Membran für je 5 Minuten mit TBS-T. Die Antikörper-gebundenen Proteine wurden über Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL Kits (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) detektiert und über den Image Reader[®] (Fujifilm) visualisiert.

4.II. Zellbiologische Methoden

4.II.1. Kultivierung von Zelllinien

NIH3T3 Zellen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden in einer Dichte von $0,5-1 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm Kulturschale ausplattiert und alle 2-3 Tage subkultiviert. Das Medium der NIH3T3 Zellen war DMEM angereichert mit 10% FCS, 2 mM Glutamin und 1% Pen/Strep.

Die Zellen der Retrovirus-Verpackungszelllinie Phoenix-gp (von Dr. Carol Stocking, HPI für Experimentelle Virologie und Immunologie, Universität Hamburg, Deutschland) wurden in Phoenix-Medium kultiviert und alle 2-3 Tage in einer Dichte von $0,5-1 \times 10^5$ Zellen pro 1 ml Zellmedium subkultiviert.

NIH3T3 und Phoenix Zellen wachsen adhärent. Daher wurden über die Zugabe von Trypsin-EDTA (PAA Laboratories, Pasching, Deutschland) die Zellkontakte gelöst und Einzelzell-Suspensionen hergestellt (3-5 Minuten, 37°C (Inkubator)). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium gestoppt, die Zellen abzentrifugiert und gewaschen und dann in oben genannter Zahl ausplattiert.

4.II.2. Isolation primärer Zellen

Nach dem Töten der Mäuse über CO_2 -Begasung wurden Ober- und Unterschenkelknochen, und die Organe (Milz, Lymphknoten) entnommen und, bis zur Weiterverarbeitung, in PBS auf Eis gelagert.

Zur Isolation von Knochenmarkzellen wurden die Knochen mittels eines Baumwollgewebetuches von Muskelresten befreit. Die Knochen wurden durch Abschneiden der beiden Knochenenden geöffnet und das Knochenmark mit einer PBS-gefüllten Spritze (1 ml Spritze, 24G Nadel) herausgespült. Das Spülen wurde, zum Herauslösen sämtlicher Knochenmarkzellen, mehrfach wiederholt. Um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten, wurde die Zell-Lösung 5-10x mit einer 1 ml Spritze mit 26G Nadel aufgezogen. Nach dem Zentrifugieren (450 g, 5 Minuten, 4°C) konnten die Knochenmarkzellen in Kultur genommen werden oder wurden unmittelbar für anschließende Versuche eingesetzt.

Zur Herstellung einer Einzelzell-Suspension aus den Organen Milz und Lymphknoten wurden die Organe (Milz: ca. 1/10 des Organs, Lymphknoten: komplett) mit Hilfe des stumpfen Endes eines 5 ml Spritzen-Kolbens durch ein rostfreies Eisensieb in kaltes PBS gedrückt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde eine Einzelzell-Suspension hergestellt, die nach Zentrifugation (450 g, 5 Minuten, 4°C) kultiviert oder direkt für weitere Versuche verwendet wurde.

Oftmals wurde zudem eine Lyse der Erythrozyten vorgenommen. Dazu wurden die Zellen pelletiert, dann in BD PharmLyse[®] Lyse Puffer (Becton Dickinson GmbH) bei einer Konzentration von ca. $1-5 \times 10^6$ Zellen pro 1 ml Lyse-Puffer resuspendiert und 5-10 Minuten bei RT inkubiert. Reste des Lyse Puffers wurde durch mehrfaches Waschen mit PBS aus der Zellsuspension entfernt.

4.II.3. Gewinnung peripherer Blutzellen

Zunächst wurden die Mäuse, zur Erhöhung des Blutdruckes und Weitung der Venen, unter einer Infrarotlampe erwärmt. Zur Blutabnahme wurden die Tiere in einer Halte-Apparatur arretiert und die Schwanzvene mit einem Skalpell angeritzt. Das periphere Blut wurde in EDTA-beschichteten Röhrchen aufgefangen und für Experimente eingesetzt.

4.II.4. Kultivierung von Knochenmark-Makrophagen

Aus den isolierten Knochenmarkzellen konnten Knochenmark-Makrophagen kultiviert werden. Dazu wurden die Knochenmarkzellen in Makrophagen-Medium, angereicht mit 20% L-Medium, in Zellkulturschalen ausplattiert. Nach 3-4 Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, nicht-adhärenente Zellen wurden abzentrifugiert (450 g, 5 Minuten, 4°C) und mit neuem Medium zurück auf die Platten gegeben. Nach 7-10 Tagen wurde erneut das Medium gewechselt, diesmal wurden die nicht-adhärenenten, somit nicht-monozytären Zellen verworfen. Auf den Platten befanden sich nun fast ausschließlich adhärenente Knochenmark-Makrophagen.

4.II.5. Kultivierung myeloischer Zellen in Suspensionen (für Proliferationsmessungen)

Knochenmark- und Milz-Einzelzell-Suspensionen ohne Erythrozyten wurden hergestellt (s. 4.II.2). Die Zellen wurden in IMDM-Medium (+10% FCS, +1% Pen/Strep), angereichert mit verschiedenen Zytokinen (Kombinationen s.u.), mit einer Starterkonzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde, unter Hinzunahme der nicht-adhärenenten Zellen, das Medium gewechselt.

Zytokin-Kombinationen:

- 1) mGM-CSF (Endkonzentration 5 U/ml)
- 2) mGM-CSF (Endkonzentration 5 U/ml) + rSCF (Endkonzentration 20 ng/ml)
- 3) mIL-3 (Endkonzentration 5 U/ml) + rSCF (Endkonzentration 20 ng/ml)
- 4) mGM-CSF (Endkonzentration 5 U/ml) + rSCF (Endkonzentration 50 ng/ml)

4.II.6. Kultivierung myeloischer Zellen in Methylcellulose (CFU-Assays)

Zunächst wurden Knochenmark- und Milz-Einzelzell-Suspensionen hergestellt, dabei wurden jeweils die Zellen von zwei Mäusen mit gleichem Genotyp gepoolt.

Die Erythrozyten wurden, wie unter 4.II.2 beschrieben, entfernt. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, und, zur Befreiung von Lyse-Puffer-Rückständen, zweimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun in IMDM (ohne Zusätze) gründlich resuspendiert und die exakte Zellzahl durch mehrfaches Zählen im automatischen Zellzählgerät CASY (Scharfe System, Reutlingen, Deutschland) bestimmt.

Die Zellen dieser primären Kultur wurden in einer Konzentration von $3,3 \times 10^4$ Zellen pro Methylcellulose(MC)-Platte in Replika ausplattiert. Zur Stimulation der myeloischen Zellen wurden verschiedene Zytokine zugegeben (s.u.). Die Zellen auf den Methylcellulose-Platten wurden im Zell-Inkubator (Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C , 7% CO_2 unter humider Atmosphäre gehalten.

Am Tag 7 wurden die Kolonien (mit einer Mindestgröße von 50 Einzelzellen) unter einem inversen Lichtmikroskop gezählt.

Der primären Kultur erfolgte das Ansetzen der sekundären Kultur aus Zellen von den Methylcellulose-Platten. Dazu wurden die MC-Platten zweimal gründlich mit 37°C warmen PBS gespült, die gesammelten Zellen abzentrifugiert (450 g, 5 Minuten, 15°C) und zur Entfernung aller MC-Reste erneut zweimal mit 37°C -warmen PBS gewaschen. Das Zell-Pellet wurde dann in IMDM (ohne Zusätze) resuspendiert und, wie bei der ersten Kultur, die genaue Zellzahl mittels des Zellzählgerätes bestimmt.

Auch die Zellen dieser sekundären Kultur wurden in einer Konzentration von $3,3 \times 10^4$ Zellen pro MC-Platte unter Zytokin-Stimulation in Replika ausplattiert. Die Kolonienzahl wurde am Tag 10 bzw. 15-18 nach der Plattierung bestimmt.

Nach Beendigung der sekundären Kultur wurden die Zellen erneut von den MC-Platten gewaschen. Diese Zellen der sekundären Kultur bzw. auch Zellen der primären Kultur, die nicht zur Replattierung verwendet wurden, konnten zur Herstellung von Zytospins bzw. zur durchflusszytometrischen Analyse eingesetzt werden.

Zytokin-Kombinationen:

- 1) mGM-CSF (Endkonzentration 5 U/ml)
- 2) mGM-CSF (Endkonzentration 5 U/ml) + rSCF (Endkonzentration 20 ng/ml)
- 3) mIL-3 (Endkonzentration 5 U/ml) + rSCF (Endkonzentration 20 ng/ml)

4.II.7. Herstellung Retrovirus beinhaltender Überstände

Die Phoenix-gp Zellen basieren auf der menschlichen, embryonalen Nieren-Zelllinie 293T. Sie zeichnen sich durch eine stabile Integration retroviraler Helferplasmide aus, welche die gag-pol Proteine exprimieren (gag: kodiert Kapsidproteine, pol: kodiert die reverse Transkriptase). Zudem zeichnen sie sich durch eine hohe Transfektionseffizienz unter Verwendung der Calcium-Phosphat Methode aus. Zur Verhinderung der Bildung Replikations-kompetenter Retroviren, werden die gag-pol Proteine beide über einen nicht-Moloney basierenden Promoter aber auf verschiedenen Plasmiden exprimiert.

Die Hüllenproteine werden von einem transient in die Phoenix-gp Zellen transfizierten Helferplasmid kodiert. Die Art des Hülleplasmides bestimmt den Tropismus des Retrovirus: ecotropisch oder amphotropisch. Hier wurden nur ecotropische Retroviren hergestellt (unter Verwendung des K73 Hüllenplasmid).

Zur Herstellung der Retroviren wurden einen Tag vor der Transfektion pro Ansatz 5×10^6 Phoenix-gp Zellen in 10 ml Phoenix-Medium auf eine 10 cm Zellkultur-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden das Hüllenplasmid (K73), das gag-pol kodierende Plasmid (M57) und das *BCL-2Mieg3* retrovirale Plasmid mittels der Calcium-Phosphat Methode in die Zellen eingebracht. (Das zusätzliche Einbringen des M57-Plasmides sollte die Effizienz weiter erhöhen.) Pro 10 cm Zellkultur-Platte wurden 10 µg M57, 2 µg K73, 5 µg *Bcl-2Mieg3* in 450 µl H₂O vermischt und 50 µl 2,5M CaCl₂ tropfenweise zugegeben. Die DNA-Lösung wurde, unter kontinuierlichem Vortexen, in kleinen Mengen zu 500 µl HEBS-Puffer hinzugegeben. Zur Komplexbildung wurde diese Lösung 30 Minuten bei RT inkubiert. Direkt vor der Transfektion wurde das Medium auf den Phoenix-gp Zellen gegen Medium mit Chloroquin-Zusatz ausgetauscht (Endkonzentration: 25 µM Chloroquin). Chloroquin erhöht die Transfektions-Effizienz durch Inhibition der lysosomalen DNAsen. Die DNA-Lösung wurde tropfenweise auf die Phoenix-gp Zellen gegeben und durch Schwenken gleichmäßig auf den Platten verteilt. Nach 6-12 Stunden im Inkubator wurde das Chloroquin-DNA-haltige Medium gegen Phoenix-Medium ausgetauscht und so die Transfektion gestoppt. In den folgenden 72 Stunden wurde der Retrovirus von den transfizierten Phoenix-gp Zellen hergestellt und in das Medium abgegeben. Daher wurde 30, 48, 56 und 72 Stunden nach der Transfektion jeweils der Retrovirus enthaltende Zell-Überstand abgenommen, filtriert (0,45 µm) und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

4.II.8. Bestimmung der Titer der retroviralen Überstände

Zur Überprüfung des retroviralen Titers wurden NIH3T3 Zellen mit dem Retroviren-beinhaltenden Überstand der transfizierten Phoenix-gp Zellen infiziert.

Am Vortag der Infektion wurden 5×10^4 NIH3T3 Zellen pro „Well“ („Well“: Schale, Vertiefung) einer 6er Multiwell-Platte (Durchmesser pro „Well“: 35mm) in 2ml NIH3T3-Medium ausplattiert. Am folgenden Tag wurde retroviraler Überstand in einer Verdünnung von 1:10 und 1:100 in frischem NIH3T3-Medium auf die Zellen gegeben. Zudem wurde, zur Verbesserung der Transduktionseffizienz, das kationische Polymer Polybren (Endkonzentration: 8 µg/ml) dem Medium beigesetzt. Nach 24 Stunden im Inkubator wurde das Medium ausgewechselt und die Zellen weitere 48 Stunden inkubiert. In dieser letzten Zeitperiode integrierte der Retrovirus stabil in das Genom der NIH3T3 Zellen und exprimierte *BCL-2* und den, auf dem Mieg3-Plasmid zusätzlich kodierten über eine interne ribosomale Eintrittsstelle verknüpften, Reporter *EGFP*.

Über durchflusszytometrische Bestimmung der prozentualen Anzahl an *EGFP*⁺ NIH3T3 Zellen wurde der retrovirale Titer bestimmt.

4.II.9 Anreicherung von Knochenmark-Progenitorzellen mittels 5-Fluoruracil und Vorstimulation zur retroviralen Transduktion

5-Fluoruracil ist ein Uracil-Analogon und dient als Zytostatikum. Bei Zellteilungen wird es statt Cytidin und Thymidin in die DNA eingebaut, die entstehende DNA ist nicht funktionsfähig, die Zellen sterben ab.

Hier wurde 5-Fluoruracil, zur Anreicherung von Knochenmark-Vorläuferzellen, den männlichen *Icsbp* C57/B16 Mäusen intra-peritoneal gespritzt (*Icsbp*^{+/+} C57/B16: 0,15 mg/g Körpergewicht, *Icsbp*^{-/-} C57/B16: 0,075 mg/g Körpergewicht; angesetzt in HANK's balanced salt solution). Dadurch sterben die sich schnell teilenden Zellen ab und unreifere Vorläufer-Zellen werden vermehrt gebildet und reichern sich an.

72 Stunden nach Injektion wurden die Mäuse getötet und jeweils Femur und Tibia entnommen. Wie in 4.II.2. beschrieben wurde eine Knochenmark-Einzelzell-Suspension hergestellt und die Erythrozyten lysiert (BD PharmLyse[®] Lyse Puffer, $1-5 \times 10^6$ Zellen pro 1ml Lyse-Puffer, 5-10 Minuten RT). Zur Klärung der lysierten Zell-Suspension wurde diese gefiltert (MACS[®] Pre Separation Filter, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von $2-5 \times 10^6$ Zellen/ml in 1x Zytokinmedium (IMDM, 10% FCS, 1% Pen/Strep, Zytokine: 50

ng/ml rSCF, 100 ng/ml hTPO, 100 ng/ml hFlt3-L, 100 ng/ml hG-CSF) für 48 Stunden im Inkubator vorstimuliert.

Mit der gewählten Zytokin-Kombination wurde die Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen angeregt und so die retrovirale Transduktion, mit Integration des viralen Genoms in die sich teilenden Progenitoren, ermöglicht.

4.II.10. Retrovirale Transduktion von Knochenmarkzellen

Zur retroviralen Transduktion wurden zunächst Retronektin[®]-gecoatete 6er Multiwell-Platten vorbereitet. Dazu wurden, einen Tag vor der Transduktion, nicht zellkultur-behandelte Falcon 6er Multiwell-Platten pro „Well“ mit 40 µg Retronektin[®] in 2 ml PBS beschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am folgenden Tag wurde die Retronektin[®]-PBS-Lösung aus den „Wells“ entfernt und die vorstimulierten Zellen (aus 4.II.9) in den 6er „Wells“ an das Retronektin[®] adhären lassen. Dazu wurden die Zellen in einer Dichte von $7,5-15 \times 10^6$ pro „Well“ ausplattiert und 30-60 Minuten in den Inkubator gegeben. Während dieser Inkubationszeit binden die VLA-4 und VLA-5 exprimierenden, unreifen Progenitorzellen an die Retronektin-Domänen, CS1 („connecting site 1“) und an die zentrale Bindedomäne (Moritz et al., 1994).

In Folge wurde das Medium mit den nicht-adhären, reiferen Zellen vorsichtig aus den „Wells“ herauspipettiert und die erste Virus-Beladung vorgenommen. Es wurden 2,0 ml des retroviralen Überstandes in jedes 6er „Well“ gegeben und 30 Minuten im Inkubator adhären lassen. In dieser Zeit binden die Retroviren an die Heparin Bindedomäne II des Retronektins[®] (Hanenberg et al., 1996), durch die Colokalisation der Zellen und der Viruspartikel wird eine hohe Transfektionseffizienz erreicht. Nach der ersten Virus-Beladung wurden die retroviralen Überstände von den „Wells“ abgenommen und mit frischem Virus-Überstand (2,0 ml pro 6er „Well“) erneut beladen. Zudem wurden 2,0 ml 2x Zytokinmedium (IMDM, 10% FCS, 1% Pen/Strep, Zytokine: 100 ng/ml rSCF, 200 ng/ml hTPO, 200 ng/ml hFlt3-L, 200 ng/ml hG-CSF) auf jedes 6er „Well“ gegeben und diese zweite Virus-Beladung für 6 Stunden im Inkubator durchgeführt. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen, frisches 1x Zytokinmedium auf die Wells gegeben und über Nacht im Inkubator stehen lassen. Am folgenden Tag wurde die zweifache Virus-Beladung wie beschrieben wiederholt. Nach weiteren 24 Stunden konnten diese retroviral transduzierten Zellen in das Knochenmark von letal bestrahlten Rezipienten-Mäusen transplantiert werden.

4.II.11. Transplantation der retroviral transduzierten Zellen

Die retroviral transduzierten, hämatopoetischen Vorläuferzellen haben das retrovirale Genmaterial stabil in ihr Genom integriert. Bei Verwendung des *BCL-2Mieg3* Plasmides werden somit *BCL-2* und das Reportergen *EGFP* in diesen Zellen überexprimiert.

Diese so veränderten Zellen aus den männlichen Donormäusen (s. 4.II.9.) wurden letal bestrahlt (bestrahlt mit 9 Gray) weiblichen *Icsbp* C57/B16 Rezipientenmäusen transplantiert.

Zur Unterscheidung des Ursprungs der nachgebildeten hämatopoetischen Zellen wurden geschlechtlich unterschiedliche Donor- bzw. Rezipientenmäuse verwendet.

Unmittelbar vor der Transplantation wurden die Zellen mittels Zelldissoziations-Puffer (PAA Laboratories, Pasching, Deutschland) vom Retronektin[®] gelöst (15 Minuten, RT; zweimaliges Nachspülen mit PBS), nach Zentrifugation (450 g, 5 Minuten 4°C) in IMDM (ohne Zusätze) resuspendiert und über Trypanblau-Färbung (10 µl Zellen + 10 µl Trypanblau, 5 Minuten RT, Verwendung einer Neubauer-Zählkammer) die Anzahl vitaler Zellen bestimmt.

Pro bestrahlter Maus wurden 1×10^6 retroviral transduzierte Zellen und 1×10^5 frisch präparierte (s. 4.II.1.2) Erythrozyten-freie Knochenmarkzellen (von weiblichen *Icsbp* C57/B16 Mäusen) in einem Gesamtvolumen von 300 µl in IMDM in die Schwanzvene injiziert.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung der EGFP Expression wurden pro Ansatz mindestens 25×10^3 Zellen in 1x Zytokinmedium für weitere 48 Stunden kultiviert. Zur Bestimmung der Zell-Morphologie der transplantierten Zellen wurde pro Ansatz ein Zytospin angefertigt.

4.II.12. Sortierung Linien-Marker negativer hämatopoetischer Vorläuferzellen mittels MACS

Knochenmark-Einzelzell-Suspensionen wurden hergestellt wie unter 4.II.2. beschrieben.

Im ersten Schritt der MACS Zellsortierung wurden die Zellen mit den biotinylierten Antikörpern gegen die Oberflächenmarker CD3e, CD11b (Mac-1), B220 (CD45R), GR-1 (Ly-6G) und TER-119 (BD Mouse Lineage Panel, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) für 20 Minuten bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Dabei wurden 2 µl je Antikörper pro 1×10^6 Zellen eingesetzt. Anschließend wurden die nicht gebundenen biotinylierten Antikörper durch zweifaches Waschen der Zellen in IMDM (5% FCS, 1% Pen/Strep) entfernt.

Im zweiten Bindeschritt wurden die Zellen mit Streptavidin-gebundenen magnetischen Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland) inkubiert. Dazu wurden pro

1×10^7 Zellen $20 \mu\text{l}$ Streptavidin-gebundener magnetischer Microbeads mit $80 \mu\text{l}$ kaltem PBS vermischt, zu den Zellen gegeben und 20 Minuten bei 4°C leicht geschüttelt. Nicht gebundene Microbeads wurden durch zweifaches Waschen der Zellen in IMDM (5% FCS, 1% Pen/Strep) entfernt. Das Zell-Pellet wurde in einer Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml in kaltem IMDM (5% FCS, 1% Pen/Strep) resuspendiert.

Zur magnetischen Aufreinigung der Zellen wurden LS Säulen (Miltenyi Biotec) in die MACS-Magnet-Halterung (Miltenyi Biotec) eingebracht und diese mit 3 ml IMDM (5% FCS, 1% Pen/Strep) gespült. Der Durchfluss wurde verworfen.

Die mit den magnetischen Microbeads versehenen Zellen wurden durch einen MACS[®] Pre Separation Filter auf die LS Säulen geladen. Alle Zellen mit Oberflächenmarkern gegen die biotinylierten Antikörper und gebundenen magnetischen Microbeads blieben im Magnetfeld an den LS-Säulen hängen (Linien-Marker positive/ Lin^+ Zellen). Zellen ohne entsprechende Zelloberflächenmarker (Linien-Marker negative/ Lin^- Zellen) wurden als Durchfluss aufgefangen. Die LS-Säulen wurden dreimal mit 3 ml IMDM (5% FCS, 1% Pen/Strep) gewaschen, die Durchfluss-Fractionen mit den Linien-Marker negativen Zellen wurden pepoolt.

Zur Kontrolle der MACS-Sortierung wurden auch die Linien-Marker positiven Zellen von den Säulen isoliert. Dazu wurden die LS Säulen aus der Magnet-Halterung gelöst, auf ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gebracht und dreimal mit 3 ml IMDM (5% FCS, 1% Pen/Strep), unter Einsatz des Säulen-Stempels, gewaschen.

4.II.13. Durchflusszytometrische Analyse der Zellen (FACS)

4.II.13.1. Analyse anhand von Zellmarkern

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden (nach der Erythrozyten-Lyse) $1-5 \times 10^5$ Zellen in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer mit $0,2-0,5 \mu\text{l}$ Antikörper resuspendiert und für 20-30 Minuten bei RT, oder 2-3 Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Durch zweifaches Waschen der Zellen in kaltem PBS wurde überschüssiger, nicht gebundener Antikörper entfernt.

Bei Verwendung eines Fluorchrom-gebundenen Antikörpers wurde das Zellpellet in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen analysiert.

Bei Verwendung eines Biotin-gebundenen Antikörpers folgte der ersten Inkubation die Färbung der Zellen mit Fluorchrom-gekoppeltem Streptavidin. Die Zellen wurden in $100 \mu\text{l}$ FACS-Puffer mit $0,2-0,5 \mu\text{l}$ Streptavidin für 20-30 Minuten bei RT, oder 2-3 Stunden bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zweifachem Waschen der Zellen und Resuspension erfolgte die durchflusszytometrische Analyse.

4.II.13.2. Bestimmung der Zellzyklusphasen und der Apoptoserate– Propidiumiodid-Färbung

Der DNA-Gehalt in den Zellen ist abhängig von der Phase des Zellzyklus: Zellen in der Ruhephase (G_0/G_1 -Phase) besitzen den doppelten Chromosomensatz. In der S-Phase wird die DNA repliziert, der Chromosomensatz ist in der Verdoppelung. In der G_2/M -Phase ist die Verdoppelung abgeschlossen, ein tetraploider Chromosomensatz liegt in den Zellen vor. Apoptotische Zellen (in der Sub G_0 -Phase) zeichnen sich durch fragmentierte DNA aus. Zur Bestimmung der Zellzyklusphasen wurden die Zellen (aus 4.II.5.) -nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer- mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI), welcher die gelockerte Zellmembran nicht-intakter Zellen und unter Zugabe von Detergenz auch die Zellmembran intakter Zellen durchdringt und in die DNA interkaliert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Dazu wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen in PI-Färbepuffer (enthält das Detergenz Nonidet P-40) resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden direkt im PI-Färbepuffer analysiert.

4.II.14. Bestimmung der Proliferationsrate über H^3 -Thymidin-Inkorporation

Zellen aus 4.II.5. wurden für 10 Tage wie angegeben (mit 5 U/ml mGM-CSF und 20 ng/ml rSCF) kultiviert. Am 10. Tag wurden die Zellen (adhärente und nicht-adhärente) in einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/200 μl in je ein „Well“ einer 96er Multiwell-Platte (U-Boden) ausplattiert. Um die Zellen bzgl. der Zellzyklusphasen zu synchronisieren, wurden sie 24 Stunden in Reduktions-Medium (IMDM, 1% FCS, 1% Pen/Strep) „hungern“ lassen. Anschließend wurden die Zellen unterschiedlich lange (Dauer: 6, 24 oder 48 Stunden) mit unterschiedlichen Zytokin-Kombinationen (s.u.) stimuliert. Die letzten 6 oder 24 Stunden der Stimulation wurde H^3 -Thymidin (1 $\mu\text{Ci}/96$ er „Well“) zugegeben. H^3 -Thymidin wird als radioaktiv markiertes Nukleotid in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Die Intensität der H^3 -Thymidin-Inkorporation gibt demnach Auskunft über die Anzahl an proliferierenden Zellen und/oder die Proliferationsraten.

Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Wallac Saug- und Spülgerät (Wallac/PerkinElmer Mailand, Italien) auf die Wallac Filtermatten Typ A gebracht (Wallac/PerkinElmer Mailand, Italien), dabei mehrfach gespült, um den vollständigen Transfer aller Zellen auf die Matten zu gewährleisten. Zur Konservierung wurde nach dem Trocknen der Filtermatten in der Mikrowelle eine Wachsschicht auf die Matten geschmolzen. Nach Erhärtung des Wachses

wurde dann die Inkorporation des H^3 -Thymidin im Szintillations- und Lumineszenz Counter (Wallac/PerkinElmer Mailand, Italien) gemessen und ausgewertet.

Zytokin-Kombinationen:

- 1) mGM-CSF (Endkonzentration 5 U/ml)
- 2) mGM-CSF (Endkonzentration 5 U/ml) + rSCF (Endkonzentration 20 ng/ml)
- 3) mIL-3 (Endkonzentration 5 U/ml) + r SCF (Endkonzentration 20 ng/ml)

4.II.15. Spektrale Karyotypisierung (SKY)

Chromosomen-Präparation:

Zur Präparation der Metaphasen-Chromosomen wurden die Zellen 6 Stunden mit Colcemid (0,035 $\mu\text{g/ml}$) behandelt, 20 Minuten bei 37°C in 75 μM KCl inkubiert und anschließend in frisch-angesetzter Methanol:Essigsäure (3:1)-Lösung fixiert. Die Zellsuspension wurde dann auf Glasträger aufgetropft und in eine Klima-Kammer (Polymer, Kassel, Deutschland) mit 22°C und 48% Luftfeuchtigkeit gegeben.

Spektrale Karyotypisierung:

Spektrale Karyotypisierung wurde durchgeführt wie beschrieben (Frank et al., 2004) sowie nach Anleitung des Herstellers (ASI Applied Spectral Imaging Ltd., Migdal HaEmek, Israel). Spektrale Bilder wurden mittels eines Epifluoreszenz-Mikroskops ausgestattet mit einem Interferometer und einem kunden-spezifischen optischen Filter erstellt und mit der SkyView[®] Software (ASI Applied Spectral Imaging Ltd., Migdal HaEmek, Israel) analysiert. (durchgeführt von Dr. Cornelia Rudolph, Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung Zell- und Molekularpathologie, Hannover, Deutschland)

4.III. Maus-Analyse

4.III.1. Bestimmung der Organgewichte

Die Mäuse wurden mittels CO_2 -Inhalation getötet. Das Körpergewicht wurde mit einer Präzisionswaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) ermittelt.

Eine Sektion der Mäuse wurde durchgeführt und dabei die Organe (Milz und Leber) entnommen. Fettreste wurden mit einer Pinzette vorsichtig entfernt und das Gewicht der Organe mit der Präzisionswaage bestimmt.

4.III.2. Analyse des peripheren Blutes

Peripheres Blut wurde, wie in 4.II.3. beschrieben, entnommen und mit einem automatischen Blutzählgerät (SCIL GmbH, Viernheim, Deutschland) auf den Gesamtgehalt an Leukozyten, analysiert.

4.IV. Histopathologie

Nach der Tötung der Mäuse über CO₂ -Begasung wurde eine Sektion vorgenommen und die Organe (Milz, Lymphknoten, Leber) entnommen. Zur Fixierung der Gewebe-Strukturen wurden die Organe in 4% Paraformaldehyl-Lösung (in PBS) eingelegt.

Es wurden Feingewebeschnitte angefertigt und diese Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wurden die gefärbten Gewebeschnitte histopathologisch analysiert (durchgeführt von Prof. Dr. Achim D. Gruber, Institut für Tierpathologie, FU Berlin, Deutschland).

4.V. Mikroskopie

Die Auswertungen der gefärbten Zellen erfolgten unter einem Stereomikroskop (LEICA, Solms, Deutschland).

4.V.1. Herstellung von Blutausstrichen

Den Mäusen wurde peripheres Blut entnommen, wie unter 4.II.3. beschrieben. 3-5 µl peripheres Blut wurden auf einen Objektträger pipettiert. Der Tropfen wurde vorsichtig mit einem zweiten Objektträger über die Fläche des ersten Objektträgers verstrichen.

4.V.2. Herstellung von Zytospins

Einzelzell-Suspensionen wurden hergestellt (s. 4.II.2.). Je $0,5-1 \times 10^5$ Zellen (in 200 µl PBS) wurden in die Zytospin-Vorrichtungen (bestehend aus einem Objektträger, einer Filtermatte, der Sammelvorrichtung und der Einspannungsvorrichtung) pipettiert und die Zellen über Zentrifugation (560 g, 5 Minuten, RT) auf die Objektträger gebracht.

4.V.3. May-Grünwald-Giemsa Färbung

Vor der Färbung wurden die Zellen auf den Objektträgern 30-60 Minuten luftgetrocknet.

Zur Fixierung der Zellen wurden die Objektträger 10 Minuten in Methanol gegeben.

Die erste Färbung erfolgte in May-Grünwald Färbelösung. Dazu wurden die Objektträger nach der Fixierung 4 Minuten in unverdünnte May-Grünwald Färbelösung (Sigma-Aldrich) gestellt. Anschließend wurden sie 20 Minuten in frisch angesetzter Giemsa-Färbelösung (1:20 mit H₂O verdünnt; Sigma-Aldrich) gefärbt. Farbreste wurden durch zweiminütiges Waschen in Millipore-H₂O entfernt.