

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellbiologisches Material und Arbeitstechniken

3.1.1 Humane Haut

Humane Haut aus Mammareduktionen gesunder Spenderinnen unterschiedlichen Alters wurde freundlicherweise von den Krankenhäusern Waldfriede, Oskar-Ziethen, Prenzlauer Berg und Weißensee, alle Berlin, zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Humanes Blut

Buffy-coat-Konserven von gesunden Spendern ohne Lymphozytenfiltration wurden vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes Wannsee-Heckeshorn, Berlin, bezogen.

3.1.3 Zelllinien

TRAP, Wildtyp	Mit humanem CD40-Ligand transfizierte, adhären wachsende murine Fibroblasten-Zelllinie (L-Zelle) und Wildtyp, Prof. Richard A. Kroczek, Robert-Koch-Institut Berlin
J558L-Zelle	CD40L-transfizierte, in Suspension wachsende Hybridoma-Zelle, Dr. Andrezej Dzionek (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
HaCat	Spontan immortalisierte, aneuploide humane Keratinozyten-Zelllinie

3.1.4 Medien, Medienzusätze und Zellbiologische Arbeitstechniken

RPMI 1640	mit Ultraglutamin 1, Cambrex, Belgien
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Penicillin	Biochrom, Berlin
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
X-Vivo 10	Bio Whittaker, Wakersville, USA

CellGro-DC	Cell Genix, Freiburg
Trypanblau-Lösung	0,4 %, Gibco BRL, Grand Island, USA

LC, dendritische Zellen und T-Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert. Dieses Medium wurde mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und mit 10 % FCS versetzt. Komplementproteine im FCS für die Zellkultur wurden bei 56 °C und 40 min hitzeinaktiviert. Primäre Zellen und Zelllinien wurden in separaten Brutschränken unter üblichen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Für Untersuchungen der Viabilität wurden außer RPMI auch die serum-freien Medien X-Vivo 10 und CellGro-DC verwendet.

Alle Arbeiten mit biologischem Material menschlicher Herkunft wurden in einer *Laminar-Flow*-Werkbank der Sicherheitsklasse 2 und unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt. Im weiteren Verlauf wird als Waschschrift bei der Zellpräparation eine Zentrifugation mit 260 g, 5 min und bei 4 °C mit eingestellter Rotorbremse bezeichnet.

Für die Bestimmung der Viabilität wurden isolierte und aufgetaute Zellen mit Trypanblau-Lösung im Verhältnis 6:1 gefärbt. Mit dieser Methode färben sich tote Zellen mit permeabler Membran blau-schwarz an, Phagozyten bläulich und viable Zellen mit intakter Membran erscheinen im Lichtmikroskop gelblich. Die Lebend- und die Gesamtzellzahl wurden in der Zählkammer nach Neubauer ermittelt.

3.1.5 Gefahren-Signale, Superantigene und Zytokine für Stimulationen

LPS	aus <i>E. coli</i> , Serotyp 0128:B12, Sigma, Deisenhofen
Flagellin	aus <i>Salmonella typhimurium</i> , Apotech, San Diego, Kalifornien, USA
Peptidoglykan	aus <i>Staphylococcus aureus</i> , Fluka, Buchs, Schweiz
sCD40L-Trimer	rekombinant, löslich, Bender, Wien, Österreich
<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin A	Toxin Technologies, Sarasota, Florida, USA
IFN-γ	rekombinant, Pharmingen, Heidelberg
IFN-ω	rekombinant, Bender, Wien, Österreich

TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , Flt3-L, rekombinant, R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
 TGF- β 1

3.1.6 Kultur- und Stimulationbedingungen

24-Napf Gewebekultur-Platte Greiner, Frickenhausen

Isolierte und generierte Zellen wurden zu 10^6 Zellen/ml Medium in den Vertiefungen einer Gewebekultur-Platte mit Flachboden ausgebracht. Jeden zweiten Kulturtag wurde ein Drittel des Mediums durch neues Medium ersetzt. Der Zellverlust in den Näpfen war bei diesem Mediumwechsel $<1\%$. Die Anzahl der Zellen, Viabilität, Phänotyp und funktionelle Kompetenz der Zellen wurden zu Beginn und zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur gemessen.

Da bei Stimulationsexperimenten mit humanen LC nur wenige Zellen pro Préparation zur Verfügung stehen, konnte eine begrenzte Anzahl von Stimationsbedingungen durchgeführt werden. Durch eigene Kinetiken und unter der Verwendung von Literaturdaten (LANGENKAMP ET AL., 2000) wurde die optimale Stimationszeit für Proteinfreisetzung in das Kulturmedium auf 18 h festgesetzt.

3.1.7 Préparation von humanen Epidermiszellen

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco, 0,0095 M (PO ₄), ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , pH 7,4, Cambrex, Belgien
PBS-H	PBS für die Dekontamination der Haut mit 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin; 1 % FCS
Bakterienschale	145 mm, Falcon, Heidelberg
Dispase I	steriles Lyophilisat, Reinheitsgrad I, Roche, Mannheim

Trypsin	2,5 %, Biochrom, Berlin
Trypsinlösung	0,25 %; 5 ml 2,5%ige Lösung zu 45 ml PBS (5 mM Mg ²⁺) mit 10 µg/ml DNase
DNase I	Roche, Mannheim
DNase-Lösung	10 µg/ml DNase in 50 ml PBS (5 mM Mg ²⁺) mit 10 % FCS
Zellfilter	40 µm, Nylon, BD, Heidelberg
Zellzähler CASY 1	Schaerfe System, Reutlingen
AB-Serum	Humanes Serum vom Serotyp AB, Biochrom, Berlin

Humane Haut wurde von Mamma-Reduktionen aus Kliniken der plastischen Chirurgie bezogen. Direkt nach der Entnahme wurde das Material in RPMI-gefüllte Röhrchen überführt und nach dem Transport sofort weiterverarbeitet. Zwischen 20 und 100 g Haut gesunder Spender wurden routinemäßig präpariert. Nach dem Wiegen wurden in einer Petrischale die Erythrozyten von den Hautstücken mit sterilem PBS-H gewaschen. Vorhandenes Fettgewebe wurde mit einem Skalpell entfernt. Die Haut wurde auf dem Boden der Petrischale flächig ausgestreckt, mit einer Feinpinzette fixiert und mit dem Skalpell wurden 2-3 mm dünne, lange Streifen vom Rand abgeschnitten. Diese wurden in ein 50 ml Röhrchen überführt und dabei zu je 10 g Hautstreifen 5 mg Dispase I, gelöst in 5 ml PBS-H gegeben. Bis max. 30 g Hautstreifen pro Röhrchen wurden wiederholt geschüttelt und 16 h bei 6-8 °C inkubiert. Das Enzym Dispase spaltet Kontakte der Hemidesmosomen in der Basallamina der Epidermis und der dermalen Ankerfibrillen (Kollagen Typ VII) in der dermo-epidermalen Junctionszone. Der Einsatz von Dispase ist für die Abtrennung der Epidermis von der Dermis bei Präparationen von muriner Haut beschrieben (PICUT ET AL., 1987).

Danach wurden die Hautstreifen in einer mit PBS gefüllten Petrischale verteilt. Mit zwei sterilen Feinpinzetten wurde ein Hautstreifen an einem Ende fixiert und die Epidermis in langen Streifen von der unteren Dermis abgezogen. Die Epidermisstreifen von 30 g Haut wurden in 25 ml Trypsin-Lösung in einer Petrischale 15 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Streifen in der Trypsinlösung mit einer 25 ml Pipette mehrmals auf- und abgezogen, bis die Suspension trübe war, d. h. die Zellen aus den Epidermisstreifen herausgelöst waren.

Trypsin kann die Zell-Zell-Kontakte über Desmosomen (Desmocolline und Desmogleine) und über Adhärenzkontakte (E-, P-, N-Cadherine) von epidermalen Zellen enzymatisch spalten. Die Zellsuspension wurde dann durch einen Nylon-Zellfilter in ein 50 ml Röhrchen überführt, zum Abstoppen der Trypsinierung 10 % FCS zugegeben, und 15 min bei 260 g ohne Bremsfunktion zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt, und die Petrischalen wurden mit DNase-Lösung noch einmal gewaschen. Die DNase-Lösung wurde eingesetzt, um Aggregatbildung durch freie Nukleinsäuren aus zerstörten Zellen zu verhindern. Diese Suspension wurde über den Zellfilter auf das Zellpellet gegeben und dieses mit einer 10 ml Pipette extensiv bis zur Einzelzellsuspension resuspendiert. Danach wurden die Röhrchen mit leicht aufgeschraubtem Deckel für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und danach 5 min bei 260 g mit eingeschalteter Bremse zentrifugiert. Die Pellets wurden zuletzt mit PBS mit 10 % FCS resuspendiert, vereinigt und zweimal gewaschen. Nach Zellzahlbestimmung und Trypanblau-Färbung wurden die Zellen direkt in den Experimenten eingesetzt oder für wenige Tage in AB-Serum mit 10 % DMSO bei -80 °C weggefroren.

3.1.8 Magnetische Sortierung von LC mit Anti-CD1a Mikrobeads

Anti-CD1a Mikrobeads	direkt gekoppelter Maus mAk, Klon HI149, IgG1; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Isolierungspuffer	PBS mit 2 mM EDTA und 0,5 % BSA
MACS Positiv-Selektionssäulen	<i>large cell separation columns</i> , Miltenyi Biotec
Separationsfilter	Miltenyi Biotec
MiniMACS	Magnetischer Zell-Separator, Miltenyi Biotec
Kanüle	23G, BD, Heidelberg

Für die Isolierung von LC wurden Anti-CD1a Mikrobeads und die MACS-Technik eingesetzt. Dafür wurde die Suspension epidermaler Zellen in 4 °C kaltem, entgastem Isolierungspuffer aufgenommen und mit Anti-CD1a Mikrobeads für 15 min bei 6-8 °C auf einem automatischen Schütteltisch inkubiert. Die Konzentration der CD1a Mikrobeads wird vom Hersteller nicht angegeben.

Deshalb wurde in Titrationsexperimenten die Konzentration der CD1a Mikrobeads bestimmt, bei der eine große Zellausbeute und ein hoher Reinheitsgrad erzielt werden konnten. Nach zwei Waschschriften mit Isolierungspuffer wurden die Zellen in einem Volumen von 10^8 Zellen /ml aufgenommen. Da die Kapazität der *large cell* Säule 10^8 Zellen beträgt, mussten bei einer Haut-Präparation mehrere Säulen beladen werden. Diese wurden in den Einsätzen des MiniMACS-Magneten positioniert und oben die Separationsfilter, unten die Kanülen aufgesetzt. Die Säulen wurden dann 3x mit 500 µl Isolierungspuffer vorgespült und anschließend über die Filter mit je 1 ml Zellsuspension beladen. Die aus der Kanüle tretende Zellsuspension wurde als CD1a-negative Fraktion in Röhrcchen aufgefangen. Nach Absinken des Meniskus der Flüssigkeit in den Säulen auf die Höhe des Fließ-Stopps wurde je Säule mit 3x 1 ml Isolierungspuffer gespült. Die Säulen wurden aus den Einsätzen des Magneten genommen und mit 1 ml Isolierungspuffer mit einem Stempel durch Druck steril eluiert. Die positiv isolierten Zellen wurden in einem Röhrcchen gesammelt, gezählt, im FACS auf Anfärbbarkeit mit PI, Expression von CD1a (Färbung mit F(ab')₂-Fragment) und HLA-DR überprüft und direkt in den Versuchen eingesetzt.

3.1.9 Weitere Sortierungsverfahren für LC

Anti-human CD1c mAk

Klon AD5-8E7, IgG2a; Miltenyi Biotec

Anti-Biotin-Mikrobeads

Klon Bio3-18E7, IgG1; Miltenyi Biotec

Für direkte Vergleiche wurde in einigen Experimenten das Hautmaterial eines Spenders in drei unterschiedlichen Präparationen weiterverarbeitet. Die erste LC-Fraktion wurde wie oben beschrieben aus der epidermalen Zellsuspension isoliert. Eine weitere LC-Fraktion wurde ebenfalls mittels MACS, aber unter Verwendung eines biotinylierten Maus Anti-CD1c mAk separiert. Da dieser Ak nicht direkt gekoppelt erhältlich ist, wurde das Anti-CD1c-Biotin Konjugat in einem zweiten Schritt mit Anti-Biotin-gekoppelten Mikrobeads für 15 min bei 6-8 °C inkubiert und mit den Zellen wie oben bei der CD1a-Isolierung verfahren. Die epidermalen Streifen des dritten Hautteils wurden in Gewebekultur-Schalen bei 37 °C in RPMI 1640 mit 10 % FCS inkubiert.

Die aus den Streifen spontan emigrierten Zellen wurden als nicht-adhärenente Fraktion nach 24 h mit dem Medium von den Schalen abgenommen und so die migrierten LC gewonnen, wie beschrieben (LARSEN ET AL., 1990).

3.1.10 Isolierung von PBMC aus *buffy coat* über Dichtegradientenzentrifugation

<i>Buffy coat</i>	60 ml, mit Anti-Gerinnungsmittel Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA), Blutspendedienst
Histopaque-1077	Dichtegradient aus 5,7 g/dl Ficoll (Typ 400, Sucrose Polymer) und 9,0 g/dl Natriumdiatrizoat, Sigma, Deisenhofen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , Gibco BRL, Grand Island, Nebraska, USA

Beim Blutspendedienst werden aus CPDA-stabilisiertem Vollblut nach Zentrifugation aufgrund von Dichteunterschieden oben Plasma und ein Erythrozytenkonzentrat am Boden abgetrennt und beide Fraktionen zurückbehalten. Die leukozyten- und thrombozytenreiche Zwischenschicht einer Blutspende wird als *buffy coat* in einen separaten Satellitenbeutel überführt und für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

Die Dichte des Gradienten entspricht mit 1,077 g/ml der von mononukleären Leukozyten des peripheren Bluts, so dass Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte (BØYUM, 1964) durch das Natriumdiatrizoat getrennt werden können. Außerdem verbinden sich Granulozyten und Erythrozyten während der isopyknischen Zentrifugation mit der hochpolymeren Methylzellulose des Ficolls und sedimentieren als schwere Aggregate am Röhrchenboden. Nach Zentrifugation kann die PBMC-Zellpopulation in der Interphase zwischen dem darüber geschichteten Plasma und dem Erythrozyten-Pellet darunter gewonnen werden.

Die *buffy coat*-Spende wurde in 50 ml Röhrchen überführt und direkt bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette vorsichtig von dem roten Pellet am Boden getrennt.

Durch diese dem Gradienten vorausgehende Zentrifugation können große Teile der Erythrozyten bereits abgetrennt werden. Danach wurden die Zellen 1:2 (v:v) mit PBS vermischt, jeweils 25 ml der Zellsuspension vorsichtig auf 15 ml Gradient im 50 ml Röhrchen aufgeschichtet und zentrifugiert (800 g, 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse). Die leukozytenhaltige Intermediärschicht kann als weißliche Interphase mit der 10 ml Pipette aus der Dichtegradientenschicht vorsichtig abpipettiert werden. Diese Population der peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC) wurde in PBS (4 °C) überführt, zentrifugiert (400 g, 10 min, mit Bremse) und anschließend mehrfach bei 260 g thrombozytenfrei gewaschen. Die Pellets wurden zuletzt vereinigt, in PBS mit 10 % FCS resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, und es wurden nur Präparationen mit normaler Anzahl an PBMC weiterverarbeitet.

3.1.11 Kryopreservation und Auftauen von Zellen

Gefrierschrank	-80 °C, Heraeus-Kendro, Langenselbold
N ₂ -Tank	Messer Griesheim, Berlin
DMSO	Dimethylsulfoxid, Merk, Darmstadt
Kryoröhrchen	Cryotube, 1,8 ml, Nunc, Roskilde, Dänemark
Einfrrierbox	Mit 250 ml Isopropanol, Nalgene, Neerijse, Belgien

Der Einsatz des Gefrierschutzmittels DMSO, das die Bildung von Eiskristallen verhindert, erlaubt eine Kryopreservation von Zellen. Die Verluste nach dem Auftauen halten sich auch bei primären Zellen in Grenzen, wenn in Serum ohne Medienzusatz mit 10 % DMSO und mit einer definierten Zeitkinetik von 1 °C/min eingefroren wird. Da DMSO ab 4 % (v/v) auch zelltoxisch wirkt, müssen Zellen nach dem Auftauen wiederholt gewaschen werden. Für dendritische Zellen und T-Zellen hat sich gezeigt, dass bessere Viabilitäten der Zellen erreicht werden können, wenn die Zellen als Ausgangspopulation der epidermalen Gesamzellen oder als PBMC vor der Isolierung eingefroren werden.

Die Zellen wurden nach der Präparation zweimal gewaschen, gezählt und in kaltem DMSO-Serum in einer Zellzahl von 5×10^7 /ml aufgenommen.

Von dieser Zellsuspension wurde je 1 ml auf Kryoröhrchen im Eisbad aufgeteilt. Die Kryoröhrchen wurden in eine Kühlbox eingesetzt, die durch ihre Befüllung mit Isopropanol eine konstante Einfrierkinetik gewährleistet. Die Kühlbox wurde für einen Tag bei -80 °C im Gefrierschrank, danach wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank bei -196 °C zur längeren Lagerung überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Röhrchen so lange bei 37 °C im Wasserbad geschwenkt, bis der Inhalt leicht angetaut war. Danach wurden die Röhrchen desinfiziert und unter der Werkbank durch tropfenweise Zugabe von Serum vollständig aufgetaut. Bei empfindlichen Zellen wie T-Zellen und dendritischen Zellen muss extensives Resuspendieren nach dem Auftauen vermieden werden. Die Zellen wurden in ein Röhrchen mit 10 ml Medium überführt, zweimal gewaschen, gezählt und die Viabilität mit Trypanblau oder mit PI im FACS bestimmt.

3.1.12 Isolierung von Monozyten aus PBMC durch Adhärenz

Gewebekultur-Schalen	6 cm Durchmesser, Greiner, Frickenhausen
Spülmedium	RPMI ohne FCS

Monozyten aus dem Blut als Ausgangspopulation für die Generierung dendritischer Zellen können über ihre Eigenschaft, auf unphysiologischen Oberflächen festzuhaften, gewonnen werden. Dafür wurde die Anzahl der Monozyten in den PBMC durch Auszählung dunkler, größerer Zellen nach 10 min in der Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

In Gewebekultur-Schalen wurden 5×10^6 adhärenente Zellen in Medium mit 10 % FCS ausgesetzt. Für die aktive Adhärenz auf der Plastikoberfläche (LENZNER UND PETERS, 1992) wurden die Monozyten unter wiederholter Bewegung der Schalen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Wenn sich Zellen auf der Oberfläche angeheftet hatten (mikroskopische Kontrolle), wurde die Gewebekultur-Schale in schräger Position aufgestellt.

Um ein Trockenfallen der adhärennten Zellen zu vermeiden, wurde die Schale durch mittelstarken Pipettenstrahl mit 50 ml/Schale warmen Mediums gespült und gleichzeitig der Überstand mit einer zweiten Pipette abgesaugt. Zeigten sich in der optischen Kontrolle keine kontaminierenden T- und B-Zellen mehr, wurde je 5 ml Medium mit 10 % FCS zu den Zellen gegeben und diese im Brutschrank inkubiert.

3.1.13 Isolierung von Monozyten durch Depletion anderer PBMC-Populationen

Monocyte Isolation Kit II	Biotin-konjugierte Anti-human CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, Glycophorin A und Anti-Biotin Mikrobeads, Klon Bio3-18E7, IgG1
LS Säule	Selektionssäule
MidiMACS	Magnetischer Zell-Separator
Kanüle	23G; alle Miltenyi Biotec

Monozyten exprimieren charakteristischerweise das Oberflächenmolekül CD14. Da dieses Antigen als Rezeptor für LPS fungiert, würde eine Bindung des Isolierungs-mAk Anti-CD14 über CD14-Kreuzbindung bereits ein Aktivierungssignal für die Zelle darstellen. Um die Aktivierung von dendritischen Zellen zu untersuchen, die aus adhärennten Monozyten differenziert wurden, sollte mit Monozyten im Zustand von *untouched cells* gearbeitet werden. Deshalb wurden Monozyten mittels Antikörper-Depletion anderer PBMC-Populationen negativ isoliert. PBMC wurden wie oben beschrieben (3.1.10) gewonnen und die Zellen wie folgt inkubiert. Mit 100 µl humanem IgG/10⁸ Zellen wurden die Fc-Rezeptoren blockiert. Im gleichen Schritt wurden mit 100 µl Biotin-Antikörper-Cocktail/10⁸ Zellen für 10 min bei 4-8 °C die kontaminierenden Blutzellen markiert. Nach sekundärer Bindung mit Anti-Biotin Mikrobeads wurden die PBMC auf LS-Säulen geladen. Die Passagefraktion wurde als Monozyten zurückgewonnen, während die anderen Zellpopulationen in der Säule verblieben. Vor dem Einfrieren oder Einsatz in der Zellkultur wurden die Zellen im FACS über CD14 und PI auf Reinheit und Viabilität getestet.

3.1.14 Isolierung von CD4⁺T Zellen durch Depletion anderer PBMC-Populationen

CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Hapten-konjugierte Anti-human CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36, CD56 und Anti-Hapten Mikrobeads
LS Säule	Selektionssäule
MidiMACS	Magnetischer Zell-Separator
Kanüle	23G; alle Miltenyi Biotec
Phythämagglutinin-L	aus <i>Phaseolus vulgaris</i> , Boehringer Mannheim

Untouched T-Helferzellen wurden von Blut-DCs, B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, CD8⁺T-Zellen, erythroiden und basophilen Zellen und Thrombozyten durch Depletion mit spezifischen Antikörpern getrennt. Im Unterschied zu der oben beschriebenen Monozyten-Depletion (3.1.13) wurde hier mit 200 µl Hapten-Antikörper-Cocktail/10⁸ Zellen im ersten Inkubationsschritt markiert. Mit Anti-Hapten Mikrobeads wurden die PBMC sekundär markiert und T-Helferzellen, wie bei der Monozytenisolierung beschrieben, in der Negativfraktion angereichert. Viabilität (PI) und Spezifität der Isolierung (CD4) wurden im FACS, die Fähigkeit der T-Zell-Population, nach Stimulation mit dem polyklonalen Mitogen Phythämagglutinin (5 µg/ml) zu proliferieren, optisch in der Zellkultur getestet.

3.1.15 Generierung von dendritischen Zellen und LC aus Monozyten

Gewebekultur-Schalen	Cellstar, 6 cm Durchmesser, Greiner, Frickenhausen
GM-CSF	rekombinant, R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-4	rekombinant, R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
TGF-β	rekombinant, R&D, Wiesbaden-Nordenstadt

Monozyten haben außer der Kompetenz, in Zellkultur durch den Einsatz von Humanserum oder M-CSF zu Makrophagen zu differenzieren, auch die Fähigkeit, dendritische Zellen zu generieren. Dabei spielen die beiden Zytokine GM-CSF und IL-4 (oder IL-13) eine entscheidende Rolle (SALLUSTO UND LANZAVECCHIA, 1994; ROMANI ET AL., 1994).

Bei dieser Konversion verlieren die Zellen in der Zellkultur charakteristischerweise das CD14-Antigen und verstärken die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen. Nach sechs Tagen Kultur sind Zellen eines unreifen DC-Phänotyps differenziert. Dieser Zelle wird die terminal differenzierte dendritische Zelle gegenübergestellt. Dieser Phänotyp reifer dendritischer Zellen kann *in vitro* durch Inkubation der unreifen MoDC mit dem Medium von Monozytenkulturen generiert werden. Dieser Monozytenüberstand enthält die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IFN- α (REDDY ET AL., 1997). Nach einem etablierten Protokoll können unreife dendritische Zellen nach zwei Tagen Kultur mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ zu reifen MoDC differenzieren (JONULEIT ET AL., 1997).

Für die Differenzierung von MoDC wurde den adhärennten Monozyten (3.1.12) in der Gewebekultur-Schale 100 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 ergänzt. An Tag 2 und 4 wurden 2 ml Medium von Schalen abgesaugt und 3 ml frisches Medium mit 100 ng/ml GM-CSF zugegeben. An Tag 6 wurden die nicht-adhärennten Zellen mit dem Mediumüberstand abgenommen, gewaschen und in den Experimenten eingesetzt. LC-ähnliche Zellen können *in vitro* wie unreife dendritische Zellen aus Monozyten (MoLC) generiert werden. Außer GM-CSF und IL-4 wird TGF- β 1 zugesetzt (GEISSMANN ET AL., 1998). Unter dem Einfluss dieses Zytokins kann eine Zellpopulation differenziert werden, die BG und Langerin exprimiert. Bei der Generierung von MoLC wurden zusätzlich 10 ng/ml TGF- β 1 in das Kulturmedium gegeben. Für direkte Vergleiche mit LC aus der Epidermis wurden in einigen Experimenten CD1c⁺MoLC aus der Gesamtpopulation der MoLC an Tag 6 über MACS wie oben beschrieben isoliert. Zur Kontrolle der Zelldifferenzierung wurde nach der Zytokinkultur die Expression des Monozytenantigens CD14, des von dendritischen Zellen hochregulierten Moleküls HLA-DR und des LC-spezifischen Langerin-Antigens im FACS gemessen.

3.1.16 Kokultur mit CD40L⁺Zellen und Ernten der Zellen

CD40L⁺Zellen wurden in 24-Napf Gewebekultur-Platten ausgesät und für 4 h vorkultiviert. Durch zwei Waschschrte mit PBS wurden tote und nicht-adhärennte Fibroblasten von den Platten entfernt.

LC oder MoLC wurden in einer Konzentration $10^6/\text{ml}$ und in einem Verhältnis von 2:1 zu den Fibroblasten zugegeben und für 4 h für RNA-Analysen oder für 18 h für Protein-Analysen in RPMI/10 % FCS kokultiviert. LC and MoLC wurden durch sanftes Pipettieren von den Gewebekultur-Platten zurückgewonnen. Dabei zeigte eine optische Kontrolle im Lichtmikroskop keine durch die Präparation bedingten Zellverluste in der gerade konfluenten Schicht von CD40L^+ Zellen.

3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, mit Hilfe von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern mehrere Oberflächenmoleküle auf einer Zelle parallel zu detektieren. Darüber hinaus können Absolut-Zellzahlbestimmungen, DNA- und Zellzyklusanalysen, Lymphozytentypisierungen, fluoreszenzabhängige Proliferationstests durchgeführt, Ionenflux und die Phosphorylierung von Molekülen der Signaltransduktion quantifiziert werden.

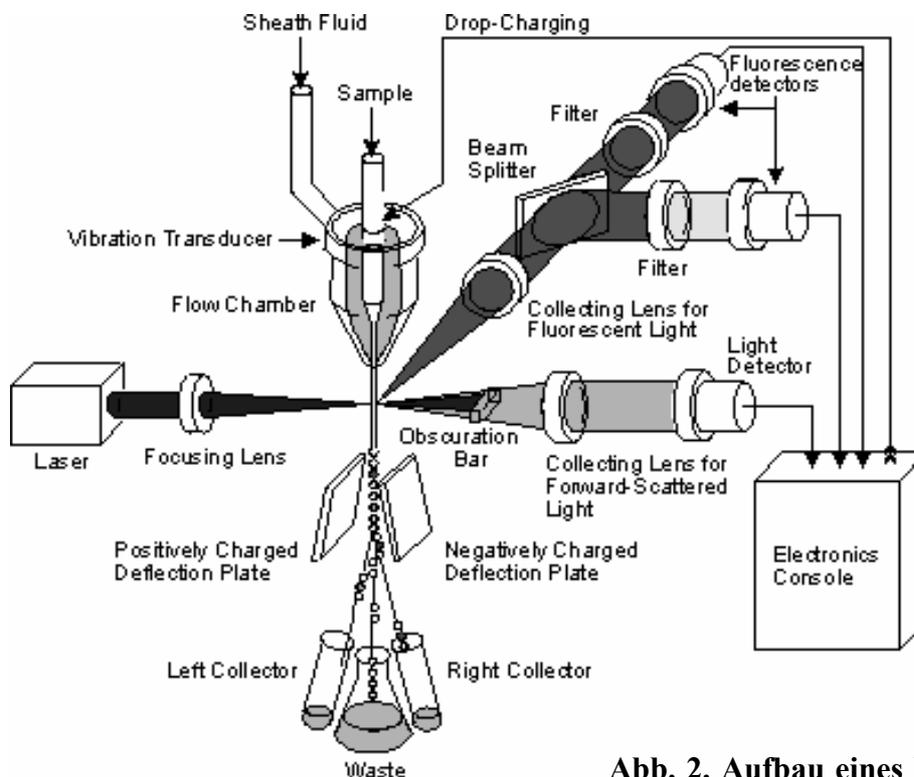


Abb. 2. Aufbau eines Durchflusszytometers.
Aus: *Biomedical Photonics Handbook*, Ed. Vo-Dinh, T. (2003), CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Durchflusszytometer, die neben der Analyse auch noch über die Fähigkeit verfügen, die gemessenen Zellen anhand verschiedener Parameter aus der Gesamtpopulation auszusortieren, werden als FACS (*fluorescence-activated-cell-sorter*) bezeichnet. Heute wird der Begriff FACS auch synonym mit dem Begriff Durchflusszytometer ohne Sortierfunktion verwendet.

Das Prinzip der durchflusszytometrischen Analyse soll hier nur kurz skizziert werden. Über eine Pumpe wird Luftdruck auf den Behälter mit Trägerflüssigkeit (*sheath fluid*) ausgeübt. So entsteht ein konstanter Flüssigkeitsstrom durch die Messküvette (*flow chamber*) hindurch. Die Probenröhrchen enthalten die i. d. R. fluoreszenz-gefärbte Zellen in Pufferlösung. Diese werden durch den Druckaufbau zusammen mit der Trägerflüssigkeit in die Messküvette transportiert. Dort entsteht durch hydrodynamische Fokussierung ein laminarer Probenstrom, in dem die Zellen vereinzelt werden und mit einer Genauigkeit von weniger als 1 μm über eine Düse (*flow-in-air*) am Messpunkt vorbeigeleitet werden. Dort trifft der Flüssigkeitsstrahl auf das monochromatische, von einer Linse (*focusing lens*) gebündelte Licht eines luft- oder wassergekühlten Lasers (488 nm Argonionenlaser beim FACS Calibur). Das Licht des Lasers wird beim Auftreffen des Strahls auf Zellen und Partikel im laminaren Probenstrom abgelenkt. Das Licht, das in 180° nach vorn aus den Zellen tritt, passiert einen Bandpassfilter (488/10) und wird direkt von einer Photodiode detektiert. Dieses Vorwärtsstreuung (*forward scatter*, FSC) gibt die Größe der gemessenen Zellen an. Mit zunehmender Anzahl und Größe der Organellen in den Zellen wird ein Teil des Laserlichts verstärkt im 90° -Winkel seitlich abgelenkt und über einen weiteren Bandpassfilter (488/10) zum SSC-Detektor geleitet. Dieses Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC) gilt als Maß für die Granularität einer Zelle.

Neben Zellgröße und Granularität lassen sich im Durchflusszytometer weitere Parameter von Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Wellenlänge quantifizieren. Dafür werden die zu untersuchenden Zellen vor der Messung entweder selbst mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt oder mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Das anregende Laserlicht wird von dem Farbstoff absorbiert und bei einer höheren Wellenlänge emittiert. Fluorochrome, die für FACS-Färbungen geeignet sind, haben Absorptions- und Emissionsspektrum mit ausreichend entfernten Maxima.

Unter Einsatz weiterer Laserquellen mit anderen Wellenlängen und Fluorochromen, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren, ist es heute möglich, von einer einzelnen Zelle neben Größe und Granularität bis zu 17 exprimierte Moleküle (19-Parameter-Analyse) über Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper darzustellen.

Mehrere nacheinander geschaltete Spiegel (*beam splitter*) trennen die emittierte Strahlung nach ihren Wellenlängen auf weitere Photomultiplier-Sensoren (*photomultiplier tubes*, PMT) auf. Diesen Detektoren sind Bandpassfilter, die nur Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlassen, oder Longpassfilter, die kurzwelliges Licht herausfiltern, vorgeschaltet. In den PMT-Sensoren regen FSC/SSC- und Fluoreszenz-Signale (Photonen) eine Elektronenkaskade an. Die Empfindlichkeit der PMT-Detektoren kann über die Verstärkung der Spannung (V) an den Detektoren geregelt werden. Spektrale Überlappungen der Fluoreszenzkanäle werden elektronisch kompensiert, die Stärke des analogen Pulses wird in ein digitales Signal konvertiert und an einen Computer zur Analyse weitergeleitet. Bei Durchflusszytometern mit Sortiereinrichtung wird die Trägerflüssigkeit durch Vibration in Aerosolform überführt und elektrisch positiv oder negativ geladen. Ablenkplatten dirigieren die Zellen mit gewünschten Fluoreszenz-Eigenschaften aus dem Flüssigkeitsstrom in einem elektrostatischen Feld ladungsabhängig in verschiedene Auffang-Röhrchen.

3.2.1 Färbung der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern

Waschpuffer (WP)	PBS mit 0,1 % NaN ₃ und 2 % FCS, filtriert, pH 7,4
Blockpuffer/Färbepuffer	WP mit 10 % Humanserum
PFA	Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt
Fixierungspuffer	PBS mit 2 % Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid Sigma, Deisenhofen; 1 mg/ml Stocklösung in dest. H ₂ O
Annexin V	50 mM TRIS, 100 mM NaCl, 1 % BSA, 0,02 % NaN ₃ , FITC-konjugiert, Boehringer, Ingelheim
Annexin-Bindungspuffer	10 mM HEPES/NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂ , pH 7,4
Mikrotiterplatte	96-Napf-Platte mit Rundboden für die Ak-Inkubation, BD Falcon, Heidelberg

FACS-Röhrchen
Heidelberg

12 x 75 mm Probenröhrchen, BD Pharmingen,

Antikörperinkubation

Die zu untersuchenden LC waren bereits bei der Isolierung mit einem IgG Antikörper (Anti-CD1a oder Anti-CD1c) markiert. Aus diesem Grund konnten keine indirekten FACS-Färbungen mit Anti-IgG durchgeführt werden, sondern es wurde durchweg mit direkt konjugierten Antikörpern für die Durchflusszytometrie markiert. Da unreife dendritische Zellen hochgradig phagozytisch aktiv sind und FcγRII/III exprimieren, wurden die Zellen vor der Antikörperzugabe mit Serumproteinen zur Blockade der Fc-Rezeptoren inkubiert. Natriumazid im Waschpuffer inhibiert die Endozytose sowie Quervernetzung von Zelloberflächenproteinen (*patching*), deren Akkumulation an einem Pol der Zelle (*capping*) und den Abwurf der Komplexe. Die optimale Konzentration der Antikörper wurde in Titrationen für die Bindung der Antigene im Sättigungsbereich ausgetestet und lag überwiegend bei 10 µg/ml.

In einem Eisbad wurden pro Ansatz 10^5 Zellen in 50 µl Färbepuffer in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte für 10 min blockiert. Je Ansatz wurden 5-10 µl der spezifischen Antikörper (**Tab. I**) in die Ansätze gegeben. Der Isolierungsantikörper wurde routinemäßig mit einem F(ab')₂-Fragment, das an RPE-Cy5 (**Tab. II**) gekoppelt war, detektiert. HLA-DR oder Langerin wurden als RPE-Konjugate eingesetzt. Alle anderen zu untersuchenden Oberflächenmoleküle wurden mit mAk, die an FITC gekoppelt waren, untersucht. Für jede Stimulations-/Differenzierungssituation der Zellen wurden Isotypen-Kontrollen durchgeführt. Die Inkubation der Dreifachfärbungen (FITC/RPE/Cy5) erfolgte in einem Schritt für 30 min, abgedeckt bei 4-12 °C auf Eis. Danach wurden die Zellen in den Mikrotiterplatten 2x mit WP bei 260 g gewaschen und sofort und in 500 µl WP gemessen oder in 500 µl Fixierungspuffer bei 8 °C für bis zu 36 h konserviert. Zur Überprüfung der Viabilität wurden die Zellen direkt vor der Messung mit PI in einer Endkonzentration von 200 ng/ml gefärbt. PI passiert die Zellmembran toter Zellen und interkaliert in die DNA.

Für die Detektion von Apoptose bei isolierten LC wurden die Zellen mit Annexin V (1:20) für 10 min in einem Ca^{2+} -haltigen Puffer bei RT inkubiert und vor der Messung mit 200 ng/ml PI gefärbt. Annexin V erkennt Phosphatidylserin (PS) auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen. Die PS-Umlagerung geschieht infolge der Aufhebung des Gradienten der Zytoplasmamembran, einem frühen Ereignis in der Apoptose-Kaskade. Da aber auch bei nekrotischen Zellen Phosphatidylserin auf der Innenseite der desintegrierten Zellmembran mit Annexin V gefärbt werden kann, gelten nur PI⁺ und gleichzeitig Annexin V⁺Zellen als apoptotisch. Beim Einsatz biotinylierter Antikörper wurden die Zellen nach der Antikörperinkubation 2x gewaschen und in 50 µl mit 0,5 µg/ml Streptavidin-APC für 30 min inkubiert.

Tabelle I: Monoklonale Antikörper, Isotypen-Kontrollen, sekundäre Fragmente und Streptavidin-Konjugate für die Durchflusszytometrie.

Spezifität	Klon	Isotyp	Bezug
CD1a	HI149	mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD1c	AD5-8E7	mIgG2a	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD4	DD42	mIgG1	Dianova, Hamburg
CD11c	3.9	mIgG1	Dianova, Hamburg
CD14	M5E2	mIgG2a	BD Pharmingen, Heidelberg
CD40	B-B20	mIgG1	Dianova, Hamburg
CD40L	TRAP1	mIgG1	Dr. Kroczeck, Berlin
CD44	F10-44-2	mIgG2a	Dianova, Hamburg
CD49b	AK7	mIgG1	Dianova, Hamburg
CD49c	MIKd2	mIgG1	Dianova, Hamburg
CD49d	BU49	mIgG1	Dianova, Hamburg
CDw49f	4F10	mIgG2b	Dianova, Hamburg
CD50	Cal 3.10	mIgG1	Coulter, Krefeld
CD54	84H10	mIgG1	Coulter, Krefeld
CD80	L307.4	mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD83	HB15e	mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD86	FUN-1	mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD95	DX2	mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD95L	NOK-1	mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CD120a	16803.161	mIgG1	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
CD120b	22235.311	mIgG2a	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
CD207	DCGM4	mIgG1	Coulter, Krefeld
HLA-DR	B8.12.2	mIgG2b	Coulter, Krefeld
CCR5	45531.111	mIgG2b	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
CCR7	2H4	mIgM	BD Pharmingen, Heidelberg
CXCR4	44717.111	mIgG2b	R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
FcεRIα	29C6	mIgG1	Dr. Hakimi, Nutley, N .J., USA

Cntrl	MOPC-21	mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
Cntrl	CBL601	mIgG2a	Dianova, Hamburg
Cntrl	MOPC-195	mIgG2b	Coulter, Krefeld
Cntrl	G155-228	mIgM	BD Pharmingen, Heidelberg
mIgG	C0090	rF(ab') ₂	Dako, Hamburg
SAv-APC			BD Pharmingen, Heidelberg

3.2.2 Messung der Zellen und Analyse

FACS Flow	Trägerflüssigkeit, BD Pharmingen, Heidelberg
CaliBRITE Beads	Fluorochrom-gekoppelte Partikel zur Auto-kompensation, BD Pharmingen, Heidelberg
FACS-Calibur	Durchflusszytometer, BD Pharmingen, Heidelberg
CellQuest	Analyse-Software, BD Pharmingen, Heidelberg

Die Messung der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer FACS-Calibur durchgeführt. Dieses FACS kann FITC, RPE und RPE-Cy5-Fluorochrome mit einem 488 nm Argonionenlaser, APC-Farbstoffe bei 635 nm mit einem zusätzlichen Dioden-Laser anregen. Die Signale der Lichtstreuung nach vorn und zur Seite wurden mit linearer Verstärkung, die Signale der Fluoreszenzen mit logarithmischer Verstärkung detektiert. Zelltrümmer (Debris) wurden über die Einstellung des *threshold*-Level nicht mitanalysiert. Vor den Messungen der Proben wurde die Verstärkung der Detektoren-Empfindlichkeit über die Isotypen-Kontrollen individuell für jede Zellpopulation so eingestellt, dass Isotyp-gefärbte Zellen im Histogramm links in der ersten Dekade lagen. Es wurden die Fluoreszenzsignale von 10.000 Zellen aufgenommen oder bei Mischpopulationen die Signale von 5.000 Zellen, die über eine Region positiv für CD1a waren. PI-positive Zellen wurden über die Definition eines negativen Gates eines Analysefensters in FL-2 gegen FL-3 von der Messung ausgeschlossen. Bei Mehrfach-Färbungen wurde vorher mit Einzelfärbungen die Fluoreszenzüberlappung elektronisch kompensiert.

Die bei Zellen aus der Kultur auftretende Autofluoreszenz wurde durch eine Region in der zweidimensionalen *dot blot*-Analyse von den positiven Signalen subtrahiert. Es wurden der Messwert „% positive Zellen“, als solche Zellen, die höhere Kanalwerte als die Isotypen-Kontrolle hatten, und die Differenz der mittleren Fluoreszenzintensitäten (Δ MFI) von Probe zu Isotypen-Kontrolle ausgewertet. Messergebnisse wurden wie in Publikationen üblich grafisch als *overlay*-Histogramm der Probe über die Isotypen-Kontrolle dargestellt.

Tabelle II: Fluorochrome der Antikörper. Wellenlängen der Anregung, Absorption und Emission von den Antikörper-konjugierten Fluorochromen. Reaktive Fluoreszenzfarbstoffe: Fluoreszein-Isothiocyanat, FITC, Rotalgen-Phycoerythrin, RPE, Cyanin-5.18, Cy5 als Tandemkonjugat mit RPE, Allophycocyanin, APC. Farbstoff für Nukleinsäuren: Propidiumjodid, PI. Die Emissionen wurden in den angeführten Fluoreszenzkanälen FL1-FL4 detektiert.

Fluorochrom	Excitation	Absorption	Emission	Detektion
FITC	488 nm	495 nm	519 nm	FL-1
RPE	488 nm	480 nm, 565 nm	578 nm	FL-2
RPE-Cy5	488 nm	480 nm, 565 nm	667 nm	FL-4
PI	488 nm	536 nm	617 nm	FL-2/FL-3
APC	635 nm	650 nm	660 nm	FL-4

3.3 Zytokinmessung im Sandwich-ELISA

Die Technik des *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) basiert auf der Adsorption des zu bestimmenden Proteins auf einer festen Phase. Das Protein wird beim Sandwich-ELISA über einen mittels hydrophober Wechselwirkungen auf die feste Phase (hier: Polystyrol der Mikrotiterplatte) gebundenen Fänger-Antikörper immobilisiert. Freies, ungebundenes Antigen wird durch Waschschriffe entfernt. Unspezifische Adsorption der Sekundär-Antikörper wird durch Abblocken freier Proteinbindungsstellen verhindert. Ein zweiter Antikörper detektiert den Antigen-Antikörper-Komplex und ist in dem verwendeten System an Biotinmoleküle gekoppelt.

Das zugesetzte Streptavidin hat eine hohe Affinität zum Biotin und besitzt vier Biotin-Bindungsstellen. Streptavidin wird in einem Komplex mit dem Enzym Peroxidase zugegeben. Nach Zusatz des Substrats H_2O_2 /TMB erfolgt eine im ELISA-Reader colorimetrisch detektierbare Farbreaktion. Dieses Assay-System zeigt eine hohe Sensitivität und ist für quantitative Proteinanalysen aus Zellkultur-Überstand geeignet.

Mikrotiterplatte	96-Napf mit Maxisorp-Oberfläche, Flachboden, Nunc, Roskilde, Dänemark
Folie	Verdunstungsschutz, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Blockpuffer	PBS, 1 % BSA, 5 % Sucrose, 0,05 % NaN_3
Waschpuffer	PBS, 0,05 % Tween 20
Reagenzverdünnung (IL-10, IL-12)	PBS, 1 % BSA
Reagenzverdünnung (TGF- β 1)	PBS, 1,4 % entfettetes BSA, 0,05 % Tween 20
Streptavidin-HRP	Meerrettichperoxidase, 1:200 in Reagenzverdünnung
Substrat-Lösung	1:1 Farbreagenz A (H_2O_2) und Farbreagenz B (Tetramethylbenzidin, TMB), R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Stopp-Lösung	2 N H_2SO_4
Fänger-Antikörper	Anti-IL-10 aus der Maus (840195), 4 μ g/ml in PBS; Anti-IL-12 aus der Maus (840177), 4 μ g/ml in PBS; Anti-TGF- β 1 aus der Maus (840116), 2 μ g/ml in PBS; alle ohne Carrier-Protein
Detektions-Antikörper	Anti-IL-10 Biotin aus der Ziege (840196), 400 ng/ml in Reagenzverdünnung mit 2 % Ziegenserum Anti-IL-12 Biotin aus der Ziege (840178), 175 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-TGF- β 1 Biotin aus dem Huhn (840117), 300 ng/ml in Reagenzverdünnung
Standard-Protein	rekombinantes humanes IL-10 (840197), 100 ng/ml; rekombinantes humanes IL-12 (840179), 70 ng/ml; rekombinantes humanes TGF- β 1 (840197), 100 ng/ml; alle Standards in Reagenzverdünnung

Multikanalpipette	200 µl, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
ELISA Reader	Emax, Molecular Devices, MWG Biotech, Ebersberg
Softmax	Software Version SPF2.6, MWG Biotech, Ebersberg

Die Mikrotiterplatte wurde gefüllt mit 100 µl/Vertiefung des Fänger-Antikörpers abgedeckt über Nacht bei RT inkubiert. Mit der Multikanalpipette wurde die Mikrotiterplatte 3x gewaschen und gegen Papiertücher ausgeschlagen. Die Platte wurde mit je 300 µl Blockpuffer bei RT für 1 h inkubiert. Nach drei Waschsritten wurden in Doppelansätzen 100 µl Standard und Proben aufgetragen (Standard: 2-fach Verdünnungsreihe von 2000 pg - 31 pg/ml, 4000 pg - 63 pg/ml bei IL-10). Die Proben wurden 1:10 vorverdünnt und der Faktor bei der Analyse berücksichtigt. Die Inkubation der Standards und Proben erfolgte abgedeckt für 2 h bei RT, drei Waschsritte folgten. Danach wurden 100 µl Detektions-Antikörper in die Vertiefungen pipettiert. Die Inkubation erfolgte abgedeckt für 2 h bei RT, drei Waschsritte folgten. Von der Enzymverdünnung wurden 100 µl in die Näpfe pipettiert und für 20 min bei RT abgedunkelt inkubiert. Nach drei Waschsritten wurden 100 µl Substratlösung für 20 min zugegeben (bei RT, abgedunkelt). Im letzten Schritt wurde die Farbreaktion mit 50µl/Napf H₂SO₄ gestoppt. Die Platte wurde direkt danach im ELISA-Reader bei 450 nm und 570 nm Referenzwellenlänge gemessen. Die Konzentrationswerte der Proben in pg/ml wurden aus der Standardkurve berechnet und die Mittelwerte gebildet. Der Korrelationskoeffizient der Standards war durchweg $\geq 0,98$.

Da TGF-β1 in den Proben als latentes Protein vorkommt, musste es für diesen ELISA erst in die immunreaktive Form überführt werden. Dafür wurden 500 µl Probe mit 100 µl 1 N HCl für 10 min bei RT inkubiert. Mit 100 µl 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES wurde anschließend neutralisiert (Verdünnungsfaktor der Proben: 1,4).

IFN-γ aus den Überständen der MLR (3.4) wurde mittels eines Quantikine ELISA Kits (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) nach den Gebrauchsempfehlungen des Herstellers detektiert.

3.4 Lymphozyten-Proliferation in der allogenen MLR

Die MLR (*mixed leukocyte reaction*) ist eine quantitative Nachweismethode für die Proliferation einer Lymphozytenpopulation. Dabei werden APCs und T-Zellen, die von verschiedenen Spendern stammen und sich deshalb in den Molekülen der MHC-Klasse I/II unterscheiden, zusammen inkubiert. In Abhängigkeit von der Art und Stärke des Antigens, des fremden MHC, der kostimulatorischen Moleküle und von freigesetzten Zytokinen polarisieren sich aus dem Pool naiver CD4⁺T-Zellen T_H1- und T_H2-Zellen. Diese stimulieren sich über die Expression von IL-2 und IL-2-Rezeptor in autokriner Weise und proliferieren. In diesem funktionellen Test wird die Neusynthese von DNA über den Einbau von tritiiertem Thymidin, eines β -Strahlers gemessen. Das Ausmaß der Lymphozytenteilung ist ein Parameter für den Differenzierungsgrad und das antigenpräsentierende Potenzial der kokultivierten dendritischen Zellen.

96-Napf Rundbodenplatten	Greiner, Frickenhausen
[³ H] Thymidin	radioaktive Markierungssubstanz, 250 μ Ci/ml Stammlösung in PBS, Amersham, Freiburg
Messröhrchen	6 ml Mini POLY-Q, Beckman Coulter, Unterschleißheim-Lohhof
Ready Protein ⁺	Cocktail für biologische Proben, Beckman Coulter, Unterschleißheim-Lohhof
Glasfaserfilter	Whatman, Maidstone, UK
Cell Harvester	für Mikrotiterplatten, Inotech Dunn, Ansbach
β -Counter LS 6500	Szintillationszähler, Beckman Coulter, Unterschleißheim-Lohhof

Kokultur von dendritischen Zellen mit CD4⁺T-Zellen

Für die Isolation von CD4⁺T-Zellen wurden Leukozyten aus *buffy coat* über Ficoll-Dichtegradient wie beschrieben (3.1.10) angereichert. CD4⁺T-Zellen wurden frisch über Depletion gewonnen.

Alternativ wurden kryokonservierte T-Zellen in warmem Serum aufgetaut, gezählt und die Viabilität mit PI überprüft.

LC, MoLC und MoDC wurden mit den Stimuli 500 ng/ml LPS, 500 ng/ml SEA, 10 ng/ml IFN- γ oder CD40L⁺Zellen (**3.1.16**) für 24 h präaktiviert. Danach wurde der Mediumüberstand unverdünnt aus den Näpfen abgenommen, zellfrei gewaschen und für die Analyse im ELISA bei -80 °C weggefroren. Die Pellets aus diesem Waschschrift wurden mit den in den Näpfen verbliebenen Zellen vereint, vollständig aus den Näpfen zurückgewonnen und gezählt. Da Kulturen generierter dendritischer Zellen noch wenige, kontaminierende autologe Lymphozyten enthalten können, wurden die Zellen mit 30 Gy und 100 KV Röntgen, 10 mA bestrahlt.

In 96-Napf Rundbodenplatten wurden abgestufte Zellzahlen LC, MoLC oder MoDC in zweifacher serieller Verdünnung als Stimulatoren in 100 μ l RPMI/10 % FCS vorgelegt. In weiteren 100 μ l RPMI/10 % FCS wurden 5×10^4 allogene CD4⁺T-Zellen zu den Stimulatoren gegeben. Als Kontrollen dienten Ansätze, die nur Stimulatoren oder nur CD4⁺T-Zellen enthielten. Die Kokulturen wurden als Triplikate angesetzt und für fünf Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Radioaktive Markierung (Pulsen) mit [³H] Thymidin

Für ELISA-Messungen von Zytokinen in den Kokulturen wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert und 200 μ l Kulturüberstand abgenommen. Dieser wurde bei -80 °C eingefroren und das entfernte Volumen Medium/10 % FCS wieder ergänzt. Die radioaktive Markierung erfolgte mit 1 μ Ci [³H] Thymidin/Ansatz. Die Zellen wurden für weitere 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Cell Harvester wurde der Inhalt der Mikrotiterplatten durch eine Saugpumpe auf einen Glasfaserfilter überführt und die Näpfe 5x mit PBS gewaschen. Danach wurden die ausgestanzten Filterkreise mit einer Pinzette abgelöst und in Messröhrchen überführt. Die Glasfaserfilter wurden bei 50 °C für 1 h getrocknet, dann auf RT abgekühlt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte im Ready Protein⁺ Cocktail. Im β -Counter wurde die DNA-assoziierte Radioaktivität gemessen. In der Auswertung wurde der Mittelwert cpm (*counts per minute*) der Triplikate gebildet.

3.5 Morphologische Analyse in der Transmissions-Elektronenmikroskopie

Cacodylatpuffer	0,2 M Natrium-Cacodylat, pH 7,2
PFA-Lösung	H ₂ O mit 7,5 % Paraformaldehyd
Lösung nach Karnovsky	12 ml Glutaraldehyd (25 %), 40 ml PFA-Lösung, 18 ml H ₂ O, 30 ml Natrium-Cacodylat-Puffer, 50 mg CaCl ₂ (x 2 H ₂ O)
Lösung zur Proteinfixierung	10 ml Glutaraldehyd (25 %), 50 ml Natrium-Cacodylat-Puffer, 40 ml H ₂ O
Lösung zur Lipidfixierung	5 ml 2 % Osmiumtetroxid, Merck, Darmstadt; 5 ml Natrium-Cacodylat-Puffer
Ethanol	30 %, 50 %, 70 %, 90 % und absolut Ethanol (unvergällt) zur Entwässerung
Einbettungsmedium	Araldit, Poersch, Frankfurt
Kontrastierung	1 % Wolframatophosphorsäure, Merck, Darmstadt 0,5 % Uranylacetat, Merck, Darmstadt, gelöst in 70 % Ethanol 1 % Uranylacetat Bleicitrat nach Reynolds (LKB)
Formvar-Film	0,75 % Formvar in Chloroform
Toluidinblau	1 %, mit 1 % Borax in wässriger Lösung
EM 906	Elektronenmikroskop, Zeiss, Oberkochen
Ultramikrotom	MT-5000, Heraeus-Sorvall, Langenselbold
Diamantmesser	MP 2516, Diatome, Hatfield, Pennsylvania, USA
Veco-Träger	Kupfer-Trägernetzchen, Science Services, München
Filmmaterial	Scienta Planfilm 23D56, Agfa, Köln

Isolierte LC und LC in der Kokultur mit CD40⁺Fibroblasten wurden in der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) analysiert. Die Präparation und Auswertung erfolgte mit Hilfe der freundlichen Unterstützung von Dr. Andreas Grützkau und Frau Martina Ringling.

Vor- und Nachfixierung

Zuerst wurden die Zellen in Karnovsky-Lösung für 30 min bei 4 °C fixiert. Die Aldehydfixierten Proben wurden dreimal für 10 min mit 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) gewaschen. Anschließend erfolgte die Lipidfixierung in gepufferter 1 % Osmiumsäurelösung bei 4 °C für 60 min. Die fixierte Zellschicht wird durch das Osmiumtetroxid gleichzeitig kontrastiert. Die Proben wurden dreimal in Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend entwässert.

Entwässerung

In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate dehydratisiert:

50 % Alkohol:	1 x 5 min
70 % Alkohol:	2 x 5 min
90 % Alkohol:	2 x 5 min
Absoluter Alkohol:	2 x 5 min

Da Ethanol mit dem Epoxid-Einbettungsharz nicht mischbar ist, wurde nach der Dehydratation als Intermedium Butyl-2,3-epoxypropylether eingesetzt.

Einbettung in Epoxidharz (Epon 812)

Zur besseren Infiltration mit dem Einbettungsmedium wurden die Proben bei Raumtemperatur für 1 h in einem 1:2 Gemisch aus Epon C und Butyl-2,3-epoxypropylether und anschließend in reinem Epon C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Filtermembranen in 0,5 cm² große Stücke geschnitten und in Flachbett-Einbettungskammern überführt. Die Kammern wurden mit Epon C aufgefüllt und zur Polymerisation für 48 h bei 60 °C inkubiert. Danach mussten die Blöcke zwei Tage bei Raumtemperatur aushärten.

Ultramikrotomie

Mit dem Glasmesser wurden von den ausgehärteten Blöcken erst 500 nm dicke Semidünnschnitte präpariert, um eine geeignete Schnittebene für die Anfertigung von 50 nm dicken Ultradünnschnitten festlegen zu können. Nach der Überführung auf einen Objektträger wurden die Semidünnschnitte auf einer Heizplatte für 10 s bei 80-90 °C hitzefixiert und danach mit Toluidinblau-Lösung angefärbt. Überschüssige Färbelösung wurde mit A. bidest abgespült. Die Schnitte wurden mit Corbit-Balsam eingebettet und unter Öl im Lichtmikroskop betrachtet.

50 nm Ultradünnschnitte wurden mit dem Diamantmesser präpariert und auf Formvar-befilmten Einloch-Kupfer-Trägernetzchen aufgefangen.

Schnitt-Kontrastierung

Es wurde eine Doppelkontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds in Petrischalen auf Parafilm nach der Tropfenmethode durchgeführt. Die Schnitte wurden für 15 min in 1 % Uranylacetat inkubiert und anschließend in A. bidest wiederholt gewaschen. Die Schnitte wurden für 5 min mit Bleicitrat und, um Bleicarbonatniederschläge zu vermeiden, in Gegenwart von NaOH-Plätzchen kontrastiert. Nach wiederholten Waschschrinen mit A. bidest wurden die Schnitte luftgetrocknet und anschließend mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop (EM 906) untersucht.

3.6 Molekularbiologische Techniken

3.6.1 Extraktion von Gesamt-RNA

Lysispuffer	mit 0,1 M Mercaptoethanol
QIAshredder	Fragmentierungs-Säulen
RNeasy-Kit	Mini-Säulen
DNase I	2,7 Kunitz Units/ μ l
Puffer RDD	DNase-Puffer für Abbau auf der Silika-Membran
DEPC-H ₂ O	RNase-frei; alle Qiagen, Hilden

Für die Analyse der Zytokinexpression in der semiquantitativen RT-PCR und für die Experimente mit Genchips wurden LC lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Durch Anwendung der *single-step* Methode (CHOMCZYNSKI UND SACCHI, 1987) werden über eine Lösung mit Guanidinisothiocyanat Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert. Über Adsorptions-Chromatographie werden RNA-Moleküle, die größer als 200 Basen sind, an die Silika-Matrix einer Mini-Säule gebunden und die DNA und Proteine durch Waschschrine entfernt. Eine anschließende Inkubation mit DNase I minimiert die Kontamination mit genomischer DNA. Das erhaltene Gemisch aus Gesamt-RNA enthält hat einen mRNA-Anteil von 2 %.

Stimulierte LC aus der Zellkultur wurden 2x gewaschen, in 350 µl Lysispuffer aufgenommen, resuspendiert und als Zelllysate bei -80 °C eingefroren. Die in den Lysaten enthaltene genomische DNA mit hohem Molekulargewicht wurde durch Zentrifugation über die Matrix der Shredder-Säulen fragmentiert. Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy-Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Mini-Säule wurde mit 10 µl DNase-Lösung und 70 µl RDD-Puffer bei 30 °C für 15 min inkubiert und nach weiteren Waschsritten mit 30 µl DEPC-H₂O eluiert.

3.6.2 Konzentrationsbestimmung über RiboGreen

RiboGreen	1 ml Lösung in DMSO, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
TE-Puffer	Lösung mit 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA in DEPC-H ₂ O, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
RNA-Standard	16S und 23S aus E. coli, 100 µg/ml Lösung in TE-Puffer, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
FL600 FA	Fluoreszenz-Reader mit Analyse-Software KC4, Bio-Tek, Winooski, Vermont, USA

Da die Menge an extrahierter RNA aus den Experimenten mit mehreren Stimulationen pro Präparation eines Hautspenders begrenzt war, wurde die RNA über einen hochsensitiven Fluoreszenzfarbstoff quantifiziert. RiboGreen färbt Nukleinsäuren und detektiert bis 1 ng/ml RNA im Fluoreszenz-Reader bei einem Emissionsmaximum von 520 nm. Der Test wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Für einen Test mit Standards im höheren Messbereich wurden RNA-Standards in TE-Puffer in serieller Verdünnung auf eine Konzentration von 1 µg/ml bis 20 ng/ml eingestellt. Die RNA-Proben wurden 1:100 in TE-Puffer verdünnt und 100 µl in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert.

Danach wurden 100 µl der 1:200 in TE-Puffer verdünnten RiboGreen-Lösung dazugegeben, gemischt und bei RT für 5 min abgedeckt inkubiert. Anschließend wurde der Farbstoff im Fluoreszenz-Reader bei einer Wellenlänge von 480 nm angeregt und die Emission bei 520 nm detektiert. Anhand der Standardkurve wurden die Konzentrationen der RNA-Proben ermittelt.

3.6.3 cDNA-Synthese

<i>random hexamers</i>	Hexamerprimer pd(N) ₆ , 100 µM, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphat, 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, Lösung in Aqua dest., Gibco BRL, Grand Island, Nebraska, USA
Erststrang-Puffer	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
SuperScript	Modifizierte Reverse Transkriptase aus <i>Moloney murine leukemia virus</i> (MMLV), Gibco BRL, Grand Island, Nebraska, USA
RNase Inhibitor	Promega, Madison, Wisconsin, USA

In ein 500 µl Eppendorfgefäß wurden 9 µl Gesamt-RNA überführt und das Gefäß ins Eisbad gestellt. Für alle Ansätze wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt aus (für 1 Ansatz):

- 1 µl Hexamerprimer
- 1,25 µl dNTP (10mM)
- 4 µl Erststrang-Puffer
- 2 µl DTT (0,1 M)

Je 8,25 µl des Reaktionsgemisches wurden zu den RNA-Proben gegeben und diese für 5 min bei 90 °C zur Auffaltung der Sekundärstruktur im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Proben im Eisbad für 2 min abgekühlt und der Inhalt der Gefäße durch kurze Zentrifugation zusammengeführt. In jedes Reaktionsgefäß wurden 0,5 µl RNase Inhibitor und 0,5 µl SuperScript Reverse Transkriptase pipettiert und kurz zentrifugiert.

Anschließend wurden die Proben erst für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die reverse Transkription für 40 min bei 42 °C im Heizblock. Im Anschluss wurden die RNA-cDNA Hybrid-Doppelstänge durch Inkubation der Proben für 10 min bei 90 °C denaturiert und die reverse Transkriptase inaktiviert. Nach Zusammenführung des Proben- volumens in den Gefäßspitzen durch kurze Zentrifugation wurden die Proben bei -20 °C in der Kühltruhe aufbewahrt.

3.6.4 Semi-quantitative Analyse in der RT-PCR

Da die Anzahl der isolierbaren LC spenderbedingt begrenzt ist, bietet die reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) gegenüber anderen Verfahren den Vorteil, mit wenig mRNA-Ausgangsmaterial, umgeschrieben in cDNA, die Expression mehrerer Gene für Zytokine untersuchen zu können. Außerdem können wegen der Sensitivität der Methode bereits wenige Kopien transkribierter mRNA und auch die individuelle Gen- expression der Untereinheiten von heterodimeren Proteinen wie IL-12p70 detektiert werden. In einigen Experimenten wurden mehrere Gene inflammatorischer Zytokine gleichzeitig in der Multiplex-PCR nachgewiesen.

Um nicht kontamierende, genomische DNA zu amplifizieren, wurden die Primer so ausgesucht, dass sie über Intron-Exon-Grenzen lagen. Die Primer wurden nach den üblichen Bedingungen (Kriterien: Länge, Schmelztemperatur, Spezifität, Bereiche komplementärer Sequenzen, C/G-Gehalt, Polypyrimidin oder Polypurin-Bereiche und 3'-Endsequenzen) gewählt oder mit Primer Express Software (Version 2.0, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) entworfen. Primer wurden in 0,1-0,5 µM Endkonzentration in den PCR Ansätzen eingesetzt. Da inflammatorische Zytokine der IL-12 Familie von LC schwach exprimiert werden, wurden 2 µl Ausgangs-cDNA eingesetzt und die Produkte für 38 Zyklen amplifiziert.

Es wurde ein üblicher PCR-Reaktionspuffer (Master Mix) angesetzt, bestehend aus Ausgangs-DNA (*template*), Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTP), *sense*- und *antisense*- Oligonukleotid-Primern, Magnesiumchlorid- und PCR-Puffer und der hitzebeständigen DNA- Polymerase Taq.

Trio-Thermoblock	Thermocycler, Biometra, Göttingen
Aqua ad injectabile	10 ml Patrone, Braun, Melsungen
	dNTPs, 4x 50 µl mit 1,8 ml A. Braun, Gibco BRL, Grand Island, Nebraska, USA
Taq-Polymerase	portioniert bei 4 °C, Perkin-Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA
Taq-Puffer	(10x), mit MgCl ₂ , Perkin-Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA
PCR-Reaktionsgefäße	Micro-Amp, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA

Oligonukleotide

<u>Primer</u>	<u>Größe</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Anlagerungs-T</u>
IL-12p35	264 bp	Vw 5'-TTATGATGGCCCTGTGCCTTAG-3' Rw 5'-CCCGAATTCTGAAAGCATGAAG-3'	52 °C
IL-12p40	270 bp	Vw 5'-GCAAAACCCTGACCATCCAA-3' Rw 5'-AGCCTCTGCTGCTTTTGACAC-3'	53 °C
IL-27p28	339 bp	Vw 5'-TGGGAGAGCAGCTCCCTGAT-3' Rw 5'-GGGCTGAAGCGTGGTGG-3'	60 °C
EBI3	332 bp	Vw 5'-TTCATTGCCACGTACAGGCTC-3' Rw 5'-TGACGCTTGTAACGGATCCAG-3'	55 °C
IL-18	342 bp	Vw 5'-GCTTGAATCTAAATTATCAGTC-3' Rw 5'-GAAGATTCAAATTGCATCTTAT-3'	55 °C
IL-15	301 bp	Vw 5'-GTTATTTCACTTGAGTCCGGAGATG-3' Rw 5'-TTTTGACAGCACATTTGAAATGC-3'	60 °C
β-Actin	441 bp	Vw 5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' Rw 5'-TGGAAGGTGGACAGCGAGGC-3'	62 °C

Die Primer wurden von Metabion, Panegg-Martinsried und TIB Molbiol, Berlin bezogen. Für Multiplex PCR-Analysen von inflammatorischen Zytokinen wurden Primer, spezifisch für TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, GM-CSF und TGF- β aus dem Kit hINF1G (Maxim Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA) verwendet.

PCR-Reaktionsgefäße wurden im Eisbad in einen Ständer einsortiert. Der Master-Mix wurde aus Wasser, Puffer, dNTPs, den beiden Primern und Taq-Polymerase im 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt.

Pipettierschema Master Mix für 1 Reaktion (23 µl):

- 19,0 µl H₂O
- 2,5 µl PCR-Puffer (10x)
- 0,5 µl dNTPs (10 mM)
- 0,25 µl sense Primer (20 µM)
- 0,25 µl antisense Primer (20 µM)

Dieser Master Mix wurde gevortext und ins Eisbad gestellt, dann wurden 0,5 µl Taq-Polymerase für jeden Ansatz dazupipettiert.

Je 2 µl cDNA (original aus cDNA-Synthese oder Verdünnungen, eingestellt nach *housekeeping*-Gen β -Actin) wurden zu den vorgelegten 23 µl Master-Mix in ein Reaktionsgefäß pipettiert. Das PCR-Programm wurde gestartet und sobald die Temperatur über 90 °C war (*hot-start*), wurden die Proben in die Böcke des Thermocyclers eingesetzt. Es wurden 28 Zyklen bei dem *housekeeping*-Gen β -Actin, 38 Zyklen für schwach exprimierte Gene amplifiziert.

Agarosegel-Elektrophorese

Durch Elektrophorese mit 2%igem Agarosegel wurden DNA-Fragmente mit einer Länge von 0,1 bis 2 kb aufgetrennt und dargestellt. Die DNA-Moleküle wurden im Gel mit Ethidiumbromid angefärbt und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt. Im Gel-Dokumentationssystem wurden die Agarosegele fotografiert und dokumentiert.

0,5 M EDTA-Lösung	93,1 g Titriplex II (EDTA) in 500 ml Aqua dest., pH 8,0
50 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)	Stammlösung aus 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung + 57 ml 100%ige Essigsäure + 242 g Tris-Base (TRIZMA-Base, Sigma) auf 1 l Aqua dest., pH 8,3
1x TAE	Gebrauchslösung, für 100 ml: 2 ml 50 x TAE + 98 ml Aqua dest.

Agarose	2 % (w/v), Bioline, Luckenwalde
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ladepuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler	Größenstandard 100 bp DNA-Leiter Plus, MBI Fermentas, St. Leon-Rot
3000Xi-Kammer	Horizontal-Elektrophorese, BioRad, München
Gel Doc 2000	Gel-Dokumentationssystem mit UV-Einheit, BioRad, München

80 ml in TAE-Puffer (1x) aufgekochte Agarose wurde bei ca. 60 °C in einem Becherglas mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) vermischt und in einen Gelträger mit Kamm für die Probenkammern gegossen. Die amplifizierte Proben wurden mit Ladepuffer angefärbt. In die Taschen des erstarrten Agarosegels wurden 5 µl des Größenstandards und 10 µl der Proben pipettiert. An das Gel wurde für 30-40 min eine Spannung von 100-120 V gelegt. Danach wurde das Gel im Dokumentationssystem dem UV-Licht ausgesetzt und nach Einstellung von Blende und Belichtungszeit fotografiert und gespeichert.

3.6.5 Expressionsanalyse mit cDNA-Mikroarray

Zellen und RNA

MoLC wurden wie in Abschnitt 3.1.15 aus Monozyten generiert und über CD1c-MACS wie unter 3.1.9 beschrieben isoliert. Die eluierten Zellen wurden als CD1c⁺, die Zellen aus der Waschpuffer-Fraktion als CD1c⁻MoLC in die Stimulationsansätze eingesetzt:

- CD1c⁺MoLC + Wildtyp-Zellen - LPS
- CD1c⁺MoLC + CD40L-Zellen + LPS (1µg/ml)
- CD1c⁻MoLC + Wildtyp-Zellen - LPS
- CD1c⁻MoLC + CD40L-Zellen + LPS (1µg/ml)

Die MoLC wurden auf den adhärennten Fibroblasten im Verhältnis 10:1 ausgebracht und für 6 h stimuliert. Danach wurden die Zellen, ohne die Fibroblasten-Zellschicht mit der Pipettenspitze zu berühren, von den Gewebekultur-Platten zurückgewonnen. Stimulierte MoLC aus der Zellkultur wurden 2x gewaschen, in 350 µl Lysispuffer aufgenommen, resuspendiert und als Zellysate bei -80 °C eingefroren. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy-Kit wie unter **3.6.1** beschrieben extrahiert. Die RNA-Amplifikation, die Hybridisierung des Mikroarrays und die Datenanalyse wurden von der Firma Memorec, Köln durchgeführt. Von den Gesamt-RNA-Proben wurde je 2 µg linear amplifiziert und die Qualität der amplifizierten RNA im Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Kalifornien, USA) geprüft.

PIQOR cDNA-Mikroarray

Mit einem piezoelektrischen Spotter werden auf der Oberfläche einer Glasplatte cDNA kovalent gebunden. Die cDNA repräsentieren 642 Gene. Jeder cDNA-Klon ist 200-400 bp groß, enthält keine repetitiven Elemente, hat minimale Homologie zu anderen Mitgliedern der Genfamilie (minimale Kreuzhybridisierung) und die Regionen sind in allen alternativen Spleiß-Varianten vertreten. In Testexperimenten wurde dieselbe RNA mit Cy3 grün und Cy5 rot markiert und die Varianz innerhalb eines Array mit <2-fach bestimmt (Angaben Memorec). Mit zwei RNA-Proben, die auf identischen Mikroarrays hybridisiert wurden, konnte die Inter-Array-Varianz mit <10 % gemessen werden. Der PIQOR-Array kann Gene innerhalb eines 200-fachen dynamischen Bereichs quantifizieren und Gene, die nur in 3-5 Kopien/Zelle exprimiert werden, detektieren.

Die amplifizierten RNA (2 µg) wurden mit Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffen als Sonden markiert. Dabei wurden die unstimulierten Proben mit Cy3 grün-markiert, die stimulierten Proben mit Cy5 rot-markiert. In einer Hybridisierungsstation wurden beide Sonden für 14 h auf dem Mikroarray-Chip hybridisiert.

Der Fluoreszenzscanner detektierte die Chip-Fluoreszenz. In der Overlay-Darstellung zeigt die Farbe Rot, dass Cy5-Fluoreszenz über Cy3-Fluoreszenz dominiert. Das Gen, das an diesem Punkt auf dem Chip analysiert wird, ist in der stimulierten Probe höher exprimiert als das entsprechende Gen der unstimulierten Probe. Hat die Grün-Fluoreszenz höhere Inten-

sitäten als die Rot-Fluoreszenz, ist das Gen in der stimulierten Probe gegenüber der unstimulierten weniger stark exprimiert. Gelbe Fluoreszenz zeigt gleiche Intensitäten beider Signale und damit keine differenzielle Expression an. Die Helligkeitswerte der Fluoreszenz werden in absolute Expressionswerte umgewandelt.

In der Auswertung wurden die Signalintensitäten im doppellogarithmischen Plot grafisch dargestellt. Als Ergebnis wurde eine Kandidatenliste der Gene aufgestellt, die gleiche oder 2-fach größere Signalintensitäten gegenüber den Negativkontrollen hatten und die größer oder gleich 1,5-fach differenziell exprimiert wurden. In dieser Liste wurden der Gennamen, der SwissProt- und UniGene-Eintrag, der Signalquotient und der Variationskoeffizient der Doppelspots aufgeführt. Der Signalquotient bildet sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensität von Cy5 zu Cy3. Der Kehrwert der Quotienten wurde für die reprimierten Gene mit -1 multipliziert.