

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien

Deckgläser	Marienfeld GmbH & Co. KG, Bad Mergentheim
Filter	Schleicher und Schuell, Dassel
Objektträger	Marienfeld GmbH & Co. KG, Bad Mergentheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml (safe lock)	Eppendorf, Köln
Schüttler	Janke und Kunkel IKA, Stauten
Serologische Pipetten	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Skalpell	Feather Safety Razor Co., Japan
Spinalnadeln 19 G x 3 ¹ / ₂	Terumo Corporation, Tokio, Japan
Zellsieb, 40 µm	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.2 Chemikalien

Beriglobin	Aventis, Straßburg, Frankreich
DAPI	Calbiochem, Darmstadt
EDTA 0,5 M	Sigma-Aldrich, München
Eosin-G-Lösung 0,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	J.T.Backer, Deventer, Niederlande
Hämalaun-Lösung nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kollagenase Typ IV	Sigma-Aldrich, München

Methylenblau Vitis	Neopharma GmbH&Co.KG, Vastra Frölunda, Schweden
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma-Aldrich, München
Percoll	Amershan Biosciences, Wien, Österreich
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Xylol	J.T.Backer, Deventer, Niederlande

2.1.3 Antikörper

Maus anti-CD1a AK, PE konjugiert	Beckman/Coulter, Fullerton, USA
Maus anti-CD3 AK, Alexa 405 konjugiert	Geschenk der AG Scheffold, Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin
Maus anti-CD4 AK, PE-CY5 konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Maus anti-CD8 AK, PE-CY7 konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Maus anti-CD20 AK, PE-CY7 konjugiert	Beckman/Coulter, Fullerton, USA
Maus anti-CD25 AK, PE-CY7 konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Maus anti-CD33 AK, FITC konjugiert	Beckman/Coulter, Fullerton, USA
Maus anti CD38 AK, PE-CY5 konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Maus anti-CD45 AK, APC-CY7 konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Maus anti-CD45R0 AK, PE konjugiert	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Maus anti-CD62L AK, APC konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Maus anti-CD69 AK, APC konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
Maus anti-CD103 AK, PE konjugiert	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Maus anti-HLA-DR AK, APC konjugiert	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA

Maus anti- $\gamma\delta$ TCR AK, FITC konjugiert

BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA

2.1.4 Puffer und Medien

Amphotericin B

Biochrom AG, Berlin

Fetales Bovines Serum

Biochrom AG, Berlin

Gentamycin

Biochrom AG, Berlin

HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Biochrom AG, Berlin

HEPES-Puffer 1M

Biochrom AG, Berlin

Penicillin/Streptomycin

Biochrom AG, Berlin

RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin

Biochrom AG, Berlin

Zellisolationsmedium

RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin

Amphotericin (10 $\mu\text{g/ml}$)

Gentamycin (50 $\mu\text{g/ml}$)

Penicillin/Streptomycin (100 $\mu\text{g/ml}$)

HEPES-Puffer (30 $\mu\text{mol/ml}$)

FACS-Puffer

RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin

3% Fetales Bovines Serum

2.1.5 Software

Statview, EXCEL

2.2 Methoden

2.2.1 Patienten und Biopsieentnahme

In der vorliegenden Arbeit wurden mononukleäre Zellen sowohl aus Lymphfollikeln des Kolons, als auch aus Peyer'schen Plaques des terminalen Ileums isoliert und charakterisiert. Hierfür wurden zum einen Operations-Präparate des Kolons oder Rektums von 36 Patienten, die sich aufgrund eines Karzinoms einer Resektion des betreffenden Darmabschnitts unterzogen hatten, aufgearbeitet. Von den Patienten waren 16 weiblich und 20 männlich, der Altersmedian der Patienten betrug 64 Jahre (33-86 Jahre). Die betrachteten Mukosa-Bereiche waren makroskopisch unauffällig und wurden mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 5 cm zum Tumor entnommen.

Zum anderen wurden Biopsien aus dem terminalen Ileum von 54 Patienten mit einem Alter von im Median 52 Jahren (18-83 Jahre) untersucht. Hiervon waren 33 Patienten weiblich und 25 männlich. Alle Patienten wurden zum Tumorausschluss koloskopiert und biopsiert und wiesen weder makroskopisch noch mikroskopisch Entzündungszeichen auf. In beiden Kollektiven erfolgte ein Ausschluss von Patienten, die eine immunmodulatorische Therapie erhalten hatten. Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt, alle Patienten wurden über die Abnahme von Biopsien für Forschungszwecke informiert und willigten schriftlich in die Untersuchung ein.

2.2.2 Präparation der Peyer'schen Plaques/Lymphfollikel

2.2.2.1 Biopsien

Die Biopsien aus dem terminalen Ileum wurden sofort nach der Entnahme in einer Petrischale mit PBS nativ unter einem Stereomikroskop (Olympus, Hamburg) betrachtet. Peyer'sche Plaques sind unter dem Mikroskop innerhalb der typisch samtartigen Zottenstruktur der Mukosa des Dünndarms eindeutig als leicht erhabene, halbkugelförmige, zottenfreie Areale zu identifizieren (Abbildung 8). Betrachtete man die Biopsien zusätzlich von der serosalen Seite aus, so fiel auf, dass sich die kugelförmigen Plaques tief in die Lamina propria fortsetzten. Vorhandene Peyer'sche Plaques wurden mit einem Skalpell vorsichtig herauspräpariert, wobei darauf geachtet wurde alle Zotten zu entfernen. Das

restliche, eindeutig Plaques-freie Gewebe diente zur Gewinnung der mononukleären Zellen aus der Lamina propria.

2.2.2.2 Resektate

Die Mukosa der Kolon-Resektate wurde mit Hilfe eines Skalpell von der Tunica muscularis getrennt und aufgespannt. Um den Schleim zu entfernen, wurden die präparierten Gewebestücke mit 0,1 prozentiger Acetylcysteinlösung beträufelt, was eine bessere Sicht ermöglichte. Im Anschluss wurde die Mukosa je nach Größe des aufgespannten Stückes mit 1-2 ml Methylenblau gefärbt und unter dem Stereomikroskop betrachtet. Die Färbung der Mukosa diente dazu, die Lymphfollikel, bei denen es sich um leicht erhabene, rundliche Strukturen handelt, die das regelmäßige Kryptenmuster unterbrechen, sichtbar zu machen (Abbildung 9). Da sich die Lymphfollikel unterhalb des Epithels in der Lamina propria und Submukosa noch verbreitern, wurden vorhandene Follikel mit einem Skalpell kegelförmig herausgeschnitten (Abbildung 1) und wiederum getrennt vom restlichen eindeutig Follikel-freien Gewebe aufgearbeitet. Bei allen Präparationsschritten wurde darauf geachtet, ein Austrocknen des Gewebes durch ständiges Beträufeln mit PBS zu vermeiden.

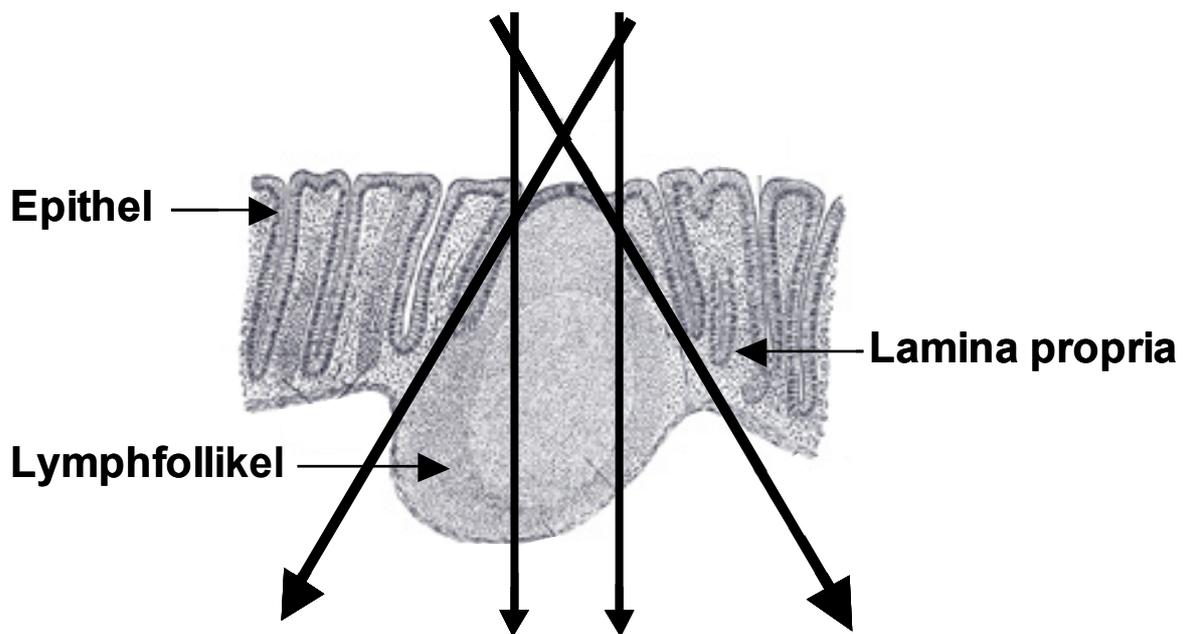


Abbildung 1. Präparation eines Lymphfollikels des Kolons, die Pfeile deuten die jeweiligen Schnittrichtungen an. Die kegelförmige Schnittrichtung erfasst im Gegensatz zur graden Schnittrichtung den gesamten Follikel.

2.2.3 Isolation und Aufarbeitung der mononukleären Zellen

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode zur Isolation der mononukleären Zellen aus der Lamina propria der Gewebeproben bzw. aus den Peyer'schen Plaques/Lymphfollikeln, handelt es sich um eine enzymatische Lösung des Gewebeverbandes. Isolation und Aufarbeitung der Zellen erfolgten für Lymphfollikel-Leukozyten (LFL) und Lamina-propria-Leukozyten (LPL) getrennt.

Die frisch präparierten Follikel und das Kontrollgewebe wurden zunächst 30 Minuten bei 37°C in 10 ml calcium- und magnesiumfreiem HBSS mit 1 mM EDTA inkubiert, um das Epithel und die intraepithelialen Lymphozyten zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend folgte eine Inkubation von 2,5 Stunden in 10 ml Zellisolationsmedium mit 0,2 % Kollagenase bei 37°C unter CO₂-Begasung. Während der gesamten Zeit standen die Proben auf einem Schüttler und wurden zusätzlich alle 30 Minuten gevortext.

Zur weiteren Homogenisierung wurde die Suspension nach der Inkubation 4-6 mal mit einer 19 G-Kanüle aufgezogen, so dass kleinere, bereits angedaute Gewebeverbände gelöst wurden. Zur Entfernung eventuell noch vorhandener Gewebereste aus der Suspension wurde diese mit einem Zellsieb (40 µm) gefiltert, anschließend im Verhältnis 2:1 mit 90%iger Percoll-Lösung gemischt und 12 Minuten bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet resuspendiert. Dies diente ebenfalls der Entfernung von Geweberesten, toten Zellen und Epithel.

Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit 20 ml RPMI 1640 Medium mit 10% FCS gewaschen, 10 Minuten bei 600x g zentrifugiert und in 500 µl Kulturmedium resuspendiert. Auszählung und Begutachtung der Zellen erfolgten in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung nach Anfärbung mit Trypanblau zur Kennzeichnung toter Zellen.

Nach der Isolation wurden die Zellen den folgenden Analysen direkt zugeführt.

2.2.4 Durchflusszytometrische Analyse

2.2.4.1 Einleitung

Die Durchflusszytometrie, auch fluorescence activated cell sorting (FACS) genannt, ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften. Relative Zellgröße, Granularität, sowie bis zu zehn Fluoreszenzfarben können ermittelt und über eine angeschlossene Datenauswerteinheit verarbeitet werden.

Vor der Messung werden die Zellen mit Fluoreszenz-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenantigene gefärbt. Diese Antigene sind erstmals in der Konferenz von Wien (1969) erfasst und nach der CD-Nomenklatur „cluster of differentiation“ einheitlich benannt worden. Auf diese Weise konnten im Laufe der Jahre mehr als 250 verschiedene Zelloberflächen-Antigene bestimmt und benannt werden. Zur Analyse wird die in einem Probenröhrchen vorgegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare in die Messküvette gesogen. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die sie umgebene Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen und die Zellen

aneinandergereiht sequentiell den Analysenpunkt erreichen. Dieser Vorgang wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. An diesem Punkt werden die Zellen von einem Laser angeregt (Abbildung 2).

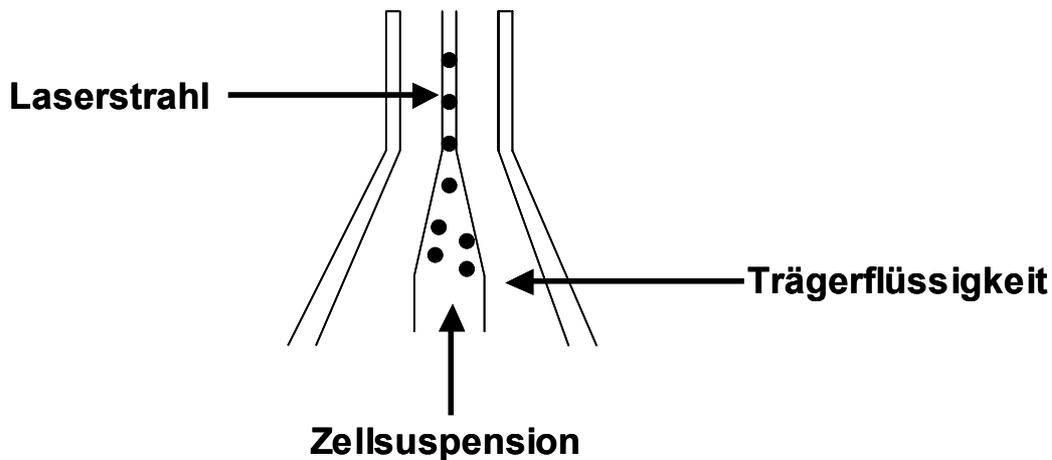


Abbildung 2. Hydrodynamische Fokussierung eines Durchflusszytometers.

Die Zellen interagieren mit dem einfallenden Lichtstrahl, wobei nur die Richtung, nicht die Wellenlänge des anregenden Lichtes verändert wird. Die Lichtstreuung wird sowohl von der Zellgröße und der Struktur der Zellmembran, als auch von intrazellulären Bestandteilen beeinflusst. Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut, der größte Anteil streut in die Vorwärtsrichtung. Dieses Licht wird als Vorwärtsstreulicht (engl. forward light scatter, FSC) bezeichnet und ist vor allem ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hängt hauptsächlich von der intrazellulären Granularität ab und wird als Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC) bezeichnet.

In der späteren Analyse werden diese beiden Parameter in einem zweidimensionalen Koordinatensystem (DotPlot) miteinander korreliert, das heißt es wird jeweils dort ein Punkt eingezeichnet, an dem sich die Intensitätswerte von Größe und Granularität einer Zelle schneiden. Auf diese Weise lassen sich Leukozytensubpopulationen wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten identifizieren, da jede Subpopulation ihr eigenes charakteristisches Muster aufweist (Abbildung 3).

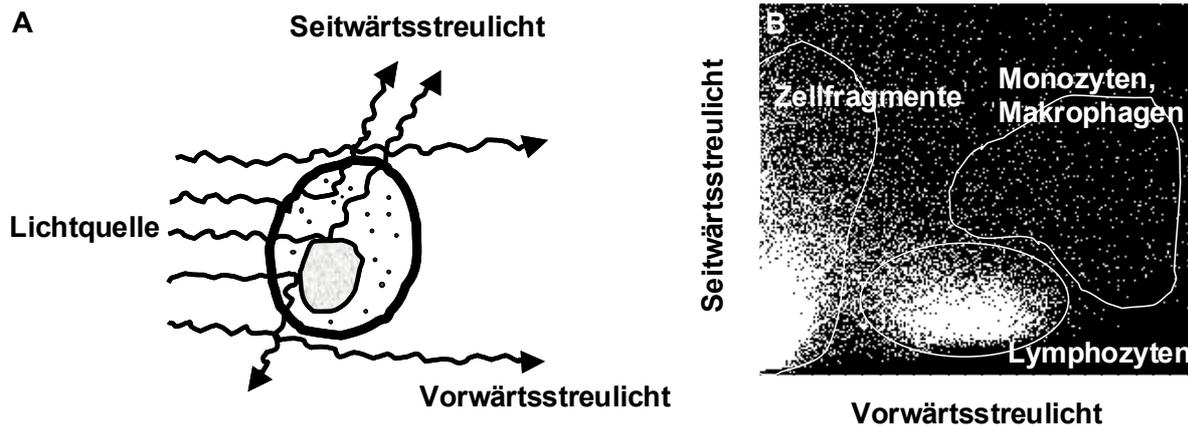


Abbildung 3. A zeigt die Streuung des Lichtes nach Anregung einer Zelle durch einen Laser. Das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht für die Granularität. B zeigt die Korrelation von Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) in einem zweidimensionalen Koordinatensystem (DotPlot). Es handelt sich um die durchflusszytometrische Analyse von mononukleären Zellen aus Peyer'schen Plaques. Man erkennt die für die jeweiligen Zellpopulationen charakteristischen „Wolken“.

Unter Fluoreszenz versteht man das durch Strahlung angeregte Leuchten eines Stoffes. Die fluoreszierenden Farbstoffe absorbieren Lichtenergie in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich, dem sogenannten Absorptionsspektrum. So können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig von einem Laser angeregt werden, wenn ihre Absorptionsspektren in einem ähnlichen Wellenlängenbereich liegen. Mit Hilfe dieser Energie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau transformiert. Mit dem Rücksprung des Elektrons zum Grundniveau wird anschließend Licht einer geringeren Energie und somit einer längeren Wellenlänge als die des anregenden Lichtes emittiert. Dieses abgestrahlte Licht bildet das Emissionsspektrum des Stoffes. Im Gegensatz zum gleichen Anregungsspektrum müssen die Emissionsmaxima deutlich voneinander differieren, da sonst eine Unterscheidung der Fluoreszenzintensitäten mit getrennten Detektoren nicht möglich ist. Die Detektoren transformieren das Lichtsignal in ein elektrisches Signal; ihnen vorgeschaltet sind spezifische Filter, die aufgrund ihrer absorbierenden und reflektierenden Eigenschaften nur Licht bestimmter Wellenlänge in die Detektoren lenken. Es gibt drei Arten von Filtern, zum einen die Langwellenfilter (engl. longpass, LP), die Licht mit längerer Wellenlänge als der Filterzahl transmittieren lassen; z.B. lässt ein 500-LP-Filter Licht einer Wellenlänge von über 500 nm passieren und reflektiert oder absorbiert jegliches Licht kürzerer Wellenlänge. Die Kurzwellenfilter

(engl. shortpass, SP) haben gegenteilige Eigenschaften, sie reflektieren Licht mit längerer Wellenlänge als der Filterzahl. Ein anderer Filtertyp sind die Diskriminierungsfilter (engl. bandpass, BP), die nur Licht aus einem relativ engen Bereich passieren lassen. So hat ein 500/50-BP-Filter eine Transmission von Licht in einem Wellenlängenbereich von 500 ± 50 nm. Die zu verwendenden Filter unterscheiden sich von Fluochrom zu Fluochrom und sind abhängig von den jeweiligen Emissionsspektren.

Die genannten Voraussetzungen werden für die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allo-Phyco-Cyanin (APC) und Alexa 405 erfüllt (Tabelle 1). Zum Teil handelt es sich bei den verwendeten Farbstoffen um Tandem-Konjugate (PE-Cychrom5 (PE-CY5), PE-CY7, APC-CY7). Das Prinzip dieser Konjugate ist es, zunächst den ersten Farbstoff (PE, APC) des Tandems durch den entsprechenden Laser anzuregen. Das anschließend emittierte Licht regt wiederum den zweiten Farbstoff an, dessen emittiertes Licht dann erst detektiert wird. Diese Konjugate ermöglichen durch eine Erweiterung des Farbstoff-Spektrums die Analyse von mehr als vier Farben pro Färbung.

Tabelle 1. Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluochrome, sowie detektierender Laser, Detektor und Filter am LSRII.

Fluochrom	Absorptions- maximum	Emissions- maximum	Laser	Detektor	Filter
FITC	494 nm	519 nm	488 nm	E	502LP- 530/30BP
PE	496 nm, 564 nm	578 nm	488 nm	D	556LP- 576/26BP
PE-CY5	496 nm, 564 nm	667 nm	488 nm	C	635LP- 665/40BP
PE-CY7	496 nm, 564 nm	785 nm	488 nm	A	735LP- 780/60BP
APC	650 nm	660 nm	633 nm	C	660/20BP
APC-CY7	650 nm	785 nm	633 nm	A	735LP- 780/60BP
Alexa 405	401 nm	421 nm	405 nm	B	450/40BP
DAPI	359 nm	461 nm	405 nm	A	505LP- 525/50BP

FITC: Fluorescein-isothiocyanat, PE: Phycoerythrin, PE-CY5: Phycoerythrin-Cychrom5, PE-CY7: Phycoerythrin-Cychrom7, APC: Allo-Phyco-Cyanin, APC-CY7: Allo-Phyco-Cyanin-Cychrom7, DAPI: 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid.

Passiert eine Zelle nun den Analysenpunkt, so sendet sie je nach gefärbten Oberflächenantigenen, Größe und Granularität unterschiedlich Signale aus, die von den Detektoren empfangen und quantifiziert werden, das heißt es wird die Amplitude der Pulse bestimmt und gespeichert. Bei der späteren Auswertung besteht dann die Möglichkeit durch Festlegung von Grenzen oder Bereichen nur solche Zellen zur Darstellung kommen zu lassen, die in einem oder mehreren Parametern innerhalb eines bestimmten Wertebereichs liegen. Beispielsweise werden durch Vorgaben von Begrenzungen nur solche Zellen erfasst, die in ihren Streulichteigenschaften (FSC, SSC) einer bestimmten Leukozytensubpopulation zuzuordnen sind. Dieses „Filtern“ bezeichnet man auch als „Gating“.

Jede Zelle, die mit Licht von einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, zeigt auch ohne spezifische Anfärbung aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften eine gewisse Autofluoreszenz in allen Kanälen. Aus diesem Grund wird immer eine ungefärbte Probe als negative Kontrolle mitgeführt und der höchste Wert bestimmt, in den die

Fluoreszenz einer negativen Zelle fallen kann. Dieser Wert wird für alle folgenden Messungen beibehalten, so dass jede Zelle mit einem höheren Wert als positiv betrachtet werden kann. Tote Zellen haben eine wesentlich höhere Autofluoreszenz als vitale Zellen, so dass es sich empfiehlt, die toten Zellen aus der Auswertung auszuschließen, da ansonsten die Autofluoreszenz der toten Zellen die positiven Werte der lebenden Zellen überlagern und falsch hohe Werte gemessen würden. Des Weiteren werden Zellen, die nach Anfärbung mit einem bestimmten Oberflächen-Antikörper besonders hell strahlen als hoch-positiv bezeichnet. Diese hoch-positiven Zellen stellen teilweise eigene Subpopulationen mit eigenen Eigenschaften innerhalb der Population dar, die für den untersuchten Oberflächenmarker positiv ist.

2.2.4.2 LSR II

Aufgrund der relativ geringen Zellausbeute und dem gleichzeitigen Wunsch, möglichst viele Oberflächenmarker zu untersuchen, war es nicht möglich, auf ein durchflusszytometrisches Routineverfahren zurückzugreifen, da die heutzutage standardmäßig eingesetzten Geräte wie zum Beispiel das FACS-Calibur von Beckton Dickinson nur für die Messung von vier Fluoreszenzen pro Färbung ausgestattet sind. Aus diesem Grund wurden alle durchflusszytometrischen Untersuchungen am LSR II von Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA) durchgeführt. Dieses Gerät verfügt über mindestens drei Laser von unterschiedlicher Wellenlänge. Sie werden als blau (488 nm Wellenlänge), rot (633 nm Wellenlänge) und violett (405 nm Wellenlänge) definiert. Aufgrund dieser Ausstattung ist das Gerät in der Lage, acht Farben gleichzeitig zu messen. Optional kann noch ein UV-Laser (355 nm Wellenlänge) eingebaut werden, so dass die simultane Messung von bis zu 10 Farben möglich ist. Das von den Zellen emittierte Licht wird über die oben beschriebenen Filter zu Octagon und Trigon-Detektor-Einheiten gelenkt und in diesen in elektronische Signale umgewandelt (Abbildung 4).

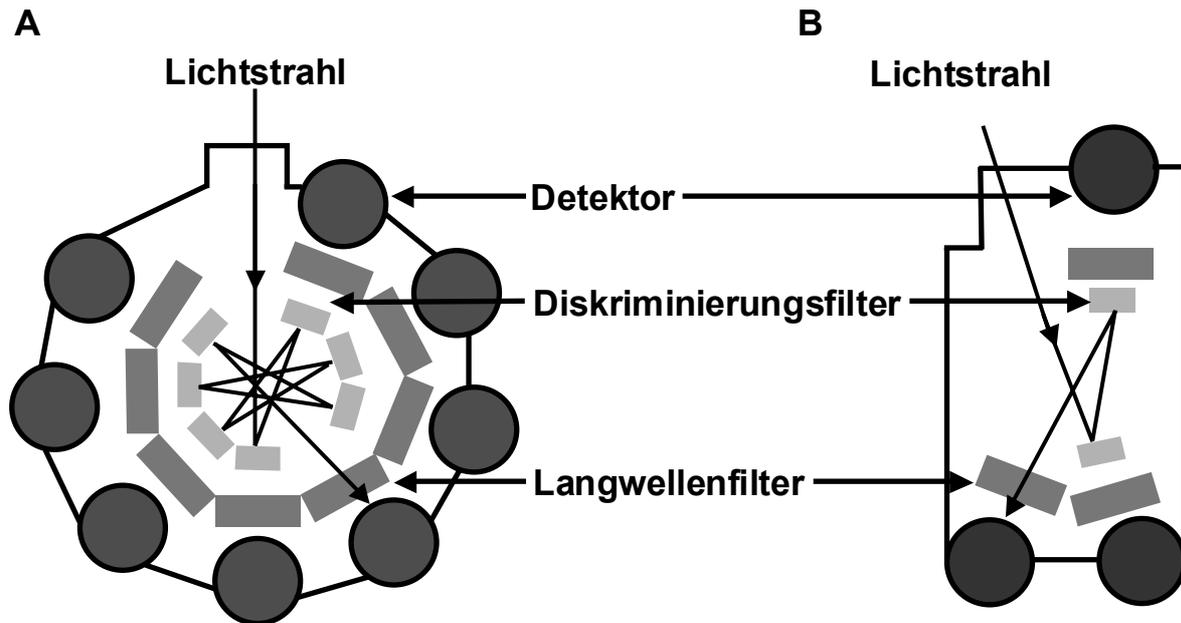


Abbildung 4. Octagon- (A) und Trigon-Einheit (B) des LSR II. Das von den Zellen emittierte Licht kann je nach Wellenlänge die Diskriminierungs- und Langwellenfiltern passieren oder wird reflektiert. Durch die Reflexion gelangt das Licht zur nächsten Filter-Detektor-Einheit. Jedem Laser ist eine Octagon- (488nm-Laser) oder Trigon-Einheit (355nm-, 405nm-, 633nm-Laser) zugeordnet.

Jeder Laser regt je nach Wellenlänge nur bestimmte Farbstoffe an, die vier Laser geben ihr Licht nacheinander ab, so dass die Detektoren Tandem-Konjugate mit dem gleichen zweiten Farbstoff wie z.B. PE-CY7 und APC-CY7 voneinander unterscheiden können.

Die Konfiguration der Detektoren und Filter des Gerätes bezüglich der in dieser Arbeit verwendeten Fluochrome ist ebenfalls in Tabelle 1 zusammengefasst.

2.2.4.3 Kompensation und Instrumentenkonfiguration

Trotz der oben dargestellten Fluoreszenzmaxima für die verschiedenen Fluochrome kommt es bei der Verwendung mehrerer Fluochrome zu einer partiellen Überlagerung der Emissionsspektren (Abbildung 5).

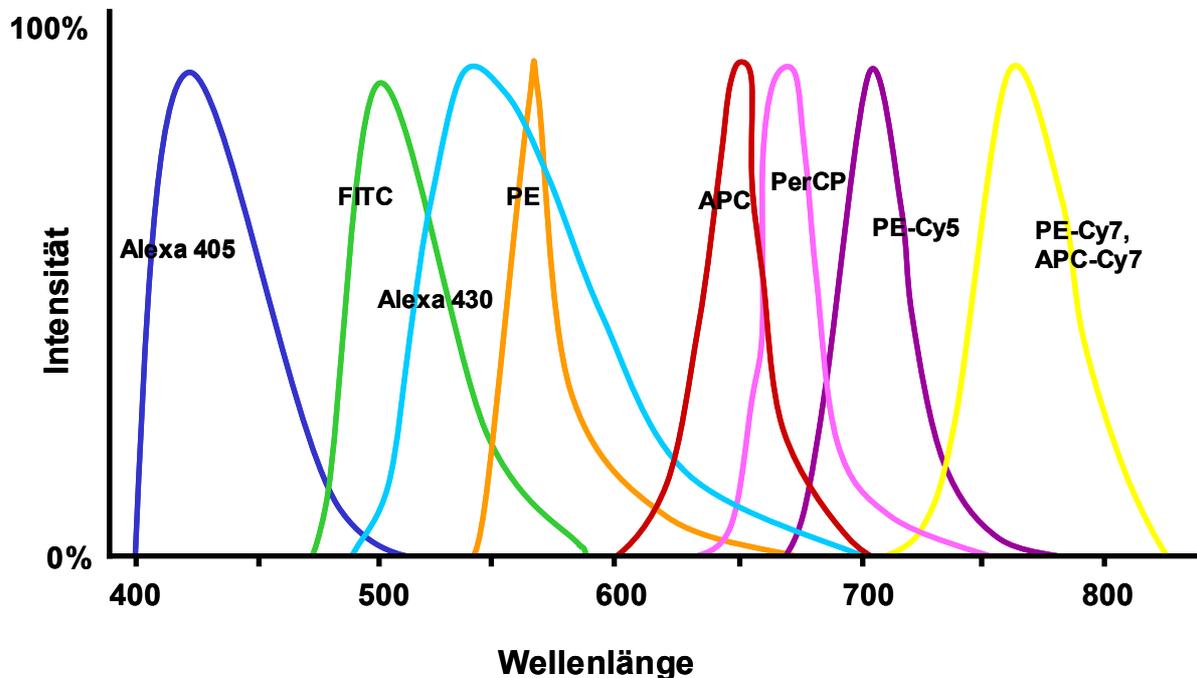


Abbildung 5. Emissionsspektren kommerziell verwendeter Fluochrome.

Durch diese Überschneidung, z.B. der FITC- und der PE-Emission, werden die Fluoreszenzen von den Detektoren relativ zu hoch gemessen. Diesem Problem wird mit einer elektronischen Kompensation begegnet, bei der man mit Hilfe von einfach gefärbten Proben jede Fluoreszenz gegen die anderen abgleicht. So muss zum Beispiel das auch im PE-Kanal detektierte FITC-Signal von diesem subtrahiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der geringen Zellzahlen diese Werte einmalig am Anfang der Messreihe etabliert und im folgenden angeglichen. Um die Überschneidungen möglichst gering zu halten, musste vor Beginn der Messungen jeder Farbstoff einzeln austitriert werden, um eine Balance zwischen benötigter Helligkeit der Fluoreszenz und unerwünschter Strahlung in andere Kanäle zu finden (Tabelle 3). Je mehr Fluoreszenzfarbstoffe zusammen in einer Färbung gemessen werden, desto schwieriger wird die Kompensation, da die Fluoreszenzmaxima abhängig von den kommerziell zur Verfügung stehenden

Farbstoffen nicht beliebig weit auseinander zu legen sind. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit maximal acht Farbstoffe pro Färbung verwendet.

2.2.4.4 Färbung und Messung

Pro Färbung wurden jeweils 100 μ l Zellsuspension in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit der entsprechenden Menge an monoklonalen Antikörpern (Tabelle 2, Tabelle 3) versetzt. Zusätzlich wurden zu jeder Probe 2 μ l Beriglobin gegeben. Hierbei handelt es sich um humane Immunglobuline zur Absättigung unspezifischer F_c -Bindungsstellen. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei 4°C. Als Negativkontrolle zur Bestimmung der Autofluoreszenz diente eine ungefärbte, nur mit Beriglobin versetzte Probe. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 5 Minuten bei 2800 rpm und 4°C in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, anschließend mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und nochmals 5 Minuten zentrifugiert. Für die Messung wurde das Zellpellet in 500 μ l FACS-Puffer resuspendiert und auf Eis transportiert. Während der gesamten Dauer von Färbung und Transport wurde darauf geachtet, die Zellen vor Licht zu schützen, um einem möglichen Zerfall der Farbstoffe vorzubeugen.

Da zum einen tote Zellen eine wesentlich höhere Autofluoreszenz aufweisen als vitale Zellen und es zum anderen erwünscht war, nur die lebenden Zellen in die Auswertung eingehen zu lassen, wurde der Zellsuspension direkt vor der Messung 0,5 μ l 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) zugesetzt. DAPI bindet als Fluoreszenzfarbstoff an zelluläre DNA, wobei nur die Zellmembran toter Zellen für DAPI durchlässig ist. Sowohl zu den gefärbten Proben als auch zu den Negativkontrolle wurde DAPI zugefügt.

Tabelle 2. Gleichzeitig gefärbte Oberflächenmarker pro Färbung.

	APC-Cy7	Alexa 405	FITC	PE	Pe-Cy5	PE-Cy7	APC
Färbung 1	CD45	CD3	-	CD103	CD4	CD25	CD62L
Färbung 2	CD45	CD3	CD33	CD1a	CD38	CD20	HLA-DR
Färbung 3	CD45	CD3	$\gamma\delta$ -TCR	CD45R0	CD4	CD8	CD69

Tabelle 3. Eingesetzte Verdünnung der Fluochrome.

Antikörper	Verdünnung
CD45 (BD Pharmingen)	1:100
CD3 (Geschenk der AG Scheffold, DRFZ, Berlin)	1:100
CD103 (DakoCytomation)	1:10
CD4 (BD Pharmingen)	1:10
CD25 (BD Pharmingen)	1:10
CD62L (BD Pharmingen)	1:10
CD33 (Beckman/Coulter)	1:50
CD1a (Beckman/Coulter)	1:10
CD38 (BD Pharmingen)	1:20
CD20 (Beckman/Coulter)	1:50
HLA-DR (BD Pharmingen)	1:10
$\gamma\delta$ -TCR (BD Pharmingen)	1:20
CD45R0 (DakoCytomation)	1:10
CD8 (BD Pharmingen)	1:50
CD69 (BD Pharmingen)	1:5

2.2.4.5 *Positivkontrollen*

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit von Antikörpern, die an Oberflächenmarker binden, die nur in geringen Anteilen in der gemessenen Zellpopulation enthalten waren, wurden Kontrollen mit anderen Zellpopulationen durchgeführt. Bei den verwendeten Zellpopulationen ist aus der Literatur bekannt, dass sie diese

Oberflächenmarker in ausreichender Menge exprimieren. So wurden für den $\gamma\delta$ -Rezeptor-Antikörper intraepitheliale Lymphozyten und für CD25 mit PHA stimulierte Lymphozyten als Positivkontrollen eingesetzt. Des Weiteren wurden die kompletten Färbungen nach der Etablierung an Blut-Leukozyten durchgeführt. Bei all diesen Untersuchungen ergaben sich funktionsfähige Antikörper, die mit der Literatur vergleichbare Werte lieferten (Daten nicht gezeigt).

2.2.4.6 Auswertung

Für die Auswertung der FACS-Daten wurde die FACS Diva Software von Beckton Dickinson verwendet. Zunächst erfolgte mit dem DAPI-Farbstoff und dem Oberflächenantigen CD45 eine generelle Klassifizierung der Zellen: Zum einen gingen nur Zellen in die Betrachtung ein, die den DAPI-Farbstoff nicht aufgenommen, also DAPI-negativ und somit vital waren. Auch zur Bestimmung der Autofluoreszenz der Zellen beschränkte sich die Betrachtung auf DAPI-negative Zellen. Mit dem Ausschluss aller toten Zellen reduzierte sich die gemessene Autofluoreszenz der Negativkontrolle auf normale Werte, so dass sich die folgenden Betrachtungen auf diese Werte beziehen konnten. Des Weiteren mussten die Zellen zusätzlich CD45-positiv sein. CD45 ist ein transmembranöses Glykoprotein, das auf allen kernhaltigen hämatopoetischen Zellen, den Leukozyten, exprimiert wird (57). Die gesamten Auswertungen beziehen sich also nur auf lebende Leukozyten (Abbildung 6).

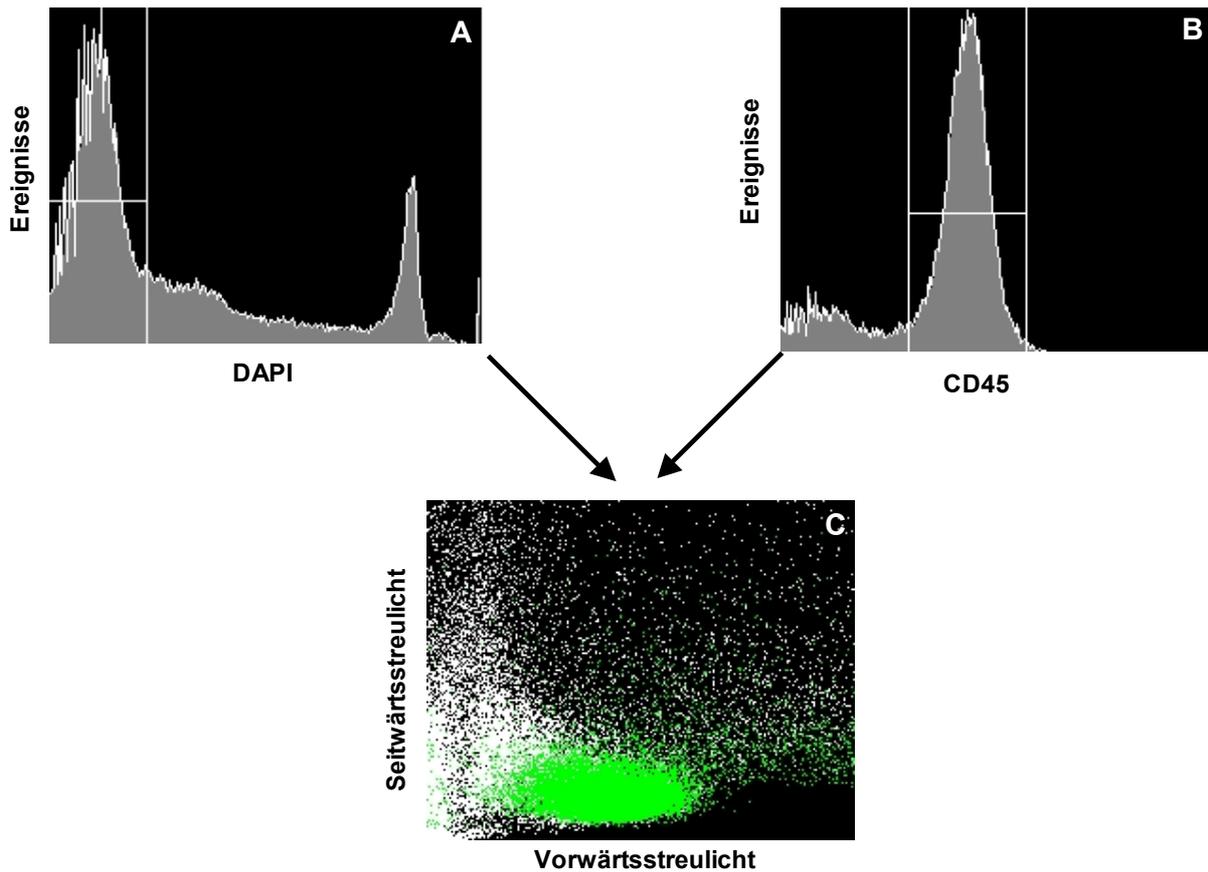


Abbildung 6. Durchflusszytometrische Analyse von mononukleären Zellen aus Peyer'schen Plaques. In Histogrammen (A,B) ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zahl der Ereignisse aufgetragen. Die jeweiligen Markierungen kennzeichnen die Populationen, die in die Auswertung eingingen: DAPI-negative Zellen (A) und CD45-positive Zellen (B). C zeigt die Auftragung der Zellen nach Größe (Vorwärtsstreuung) und Granularität (Seitwärtsstreuung), dargestellt in grün sind DAPI-, CD45+-Leukozyten. Logarithmische Darstellung der Fluoreszenzintensitäten, lineare Darstellung der Ereignisse, Vorwärtsstreuung, Seitwärtsstreuung.

Im Anschluss wurde jede Färbung nach individuellen Gesichtspunkten gesondert ausgewertet, und die Ausprägung der phänotypischen Merkmale innerhalb der vier untersuchten Leukozyten-Subgruppen verglichen. Bei diesen Subgruppen handelte es sich um die getrennt isolierten Leukozyten aus Follikeln und Lamina propria, die entweder aus dem Ileum oder aus dem Kolon stammten. Zum einen sollten Unterschiede zwischen Lymphfollikel-Leukozyten (LFL) und Lamina-propria-Leukozyten (LPL) ermittelt werden. Es handelte sich hierbei um gepaarte Vergleiche, die Daten von Ileum und Kolon wurden gepoolt betrachtet (Abbildung 7A). Zum anderen wurden die mononukleären Zellen von Ileum und Kolon miteinander verglichen, das heißt die Lymphfollikel-Zellen des Ileums mit denen des Kolons

sowie die mononukleären Zellen der Lamina propria des Ileums mit denen des Kolons (Abbildung 7B).

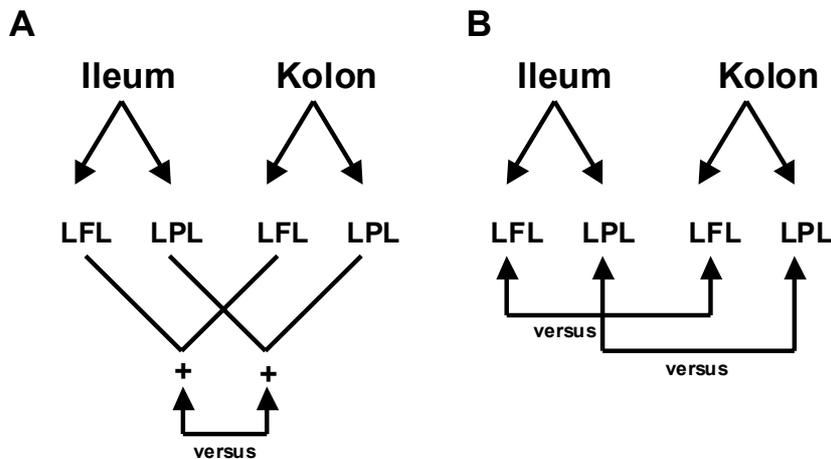


Abbildung 7. Darstellung der vier Leukozyten-Subgruppen und Illustration der Vergleichsanalysen. A: Lymphfollikel-Leukozyten (LFL) versus Lamina-propria-Leukozyten (LPL), B: Ileum versus Kolon.

2.2.5 Gefrierschnitte

2.2.5.1 Fixierung und Schnittverfahren

Um zu überprüfen, ob es sich bei den unter dem Mikroskop sichtbaren Strukturen tatsächlich um Lymphfollikel/Peyer'sche Plaques handelte, wurden zu Beginn der Arbeit einige dieser Strukturen präpariert, in PBS eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um einen histologischen Überblick über die Strukturen zu erhalten, wurde das umliegende Gewebe bei der Präparation nicht vollständig entfernt. Anschließend wurden die in einem Kryostat angefertigten 10 µm dicken Schnitte nach Durchführung einer Hämalaun-Eosin-Färbung (siehe unten) unter einem Durchlichtmikroskop betrachtet (Abbildung 8E, Abbildung 9D).

2.2.5.2 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung stellt eine Routinefärbung in der konventionellen Histologie dar. Ziel ist die Darstellung von Gewebsstrukturen im Organschnitt durch den Kernfarbstoff Hämalaun und Kontrastierung durch den Plasmafärbstoff Eosin.

Tabelle 4. Protokoll zur Hä malaun-Eosin-Färbung an Gefrierschnitten.

Substanz	Wirkdauer
Mayers Hä malaunlösung	5 min
Abspülen mit H ₂ O	Einige Sekunden
Differenzieren in HCL-Alkohol 1%	2-3 mal kurz eintauchen
Abspülen mit H ₂ O	Einige Sekunden
Unter fließendem Wasser bläuen	5 min
Eosin 0,5%	1 min
Aqua dest.	6 mal tauchen
Differenzieren in Ethanol 70%	5 min
Ethanol 80%	2 mal 2 min
Ethanol 96%	2 mal 2 min
Ethanol 100%	2 mal 2 min
Xylol	2 mal 2 min
Corbit-Balsam	30 min

2.2.6 Immunhistochemie

Die in dieser Arbeit gezeigten immunhistochemischen Färbungen (Abbildung 19, Abbildung 24) dienen der Illustration. Sie wurden durch das Pathologische Institut der Charité, Campus Benjamin Franklin im Rahmen von Routinefärbungen angefertigt.

2.2.7 Statistik

Die Darstellung der Daten erfolgte als Einzelwerte oder als Median und Bereiche. Zur statistischen Auswertung wurde Statview verwendet. Beim Vergleich gepaarter Daten (LFL vs. LPL) wurde der Wilcoxon-Signed-Rank-Test verwendet, für Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Gruppen (Ileum vs. Kolon) der Mann-Whitney-U-Test. Des weiteren diente die Spearman-Rangkorrelation der Untersuchung von Zusammenhängen zweier Parameter. $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.