

## 3 Material und Methoden

Die Chemikalien wurden von Merck bezogen, wenn nichts anderes angegeben ist. Die verwendeten Primer wurden von Tib Mol Biol synthetisiert. Der Bezugsquellen-Nachweis ist auf Seite 99 im Anhang angegeben.

### 3.1 Computer-Programme und Datenbank

Cell Quest	Version 3.2.1f1X (BD)
Prism	Version 3.0 (Graph Pad Software)
ABI Sequence Analysis	Version 3.4.1 (Perkin Elmer Applied Biosystems)
V-BASE	<a href="http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT.php?menu=901">http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT.php?menu=901</a>

### 3.2 Lösungen

FACS-Puffer	PBS, 0,5 % BSA (Fraktion V, Sigma), 4 mM EDTA, pH 8,0
YT-Medium	16 g Tryptone-B, 10 g Hefeextrakt-B, 5 g NaCl (Bio 101)
YT-Agar	YT-Medium, 50 µg/ml Ampicillin (Sigma) + 15 g/l Agar (Selekt Agar, Sigma)
NaPhosphat-Puffer	1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-Puffer	130 mM NaCl, 10 mM NaPhosphat-Puffer
Probenpuffer	25 mM Bromphenolblau (Sigma), 15% Ficoll (Amersham)
TBE-Puffer	0,1 M Tris-HCl (ICN Biomedicals), 0,1 M Borsäure, 3 mM EDTA
TBS-Puffer	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 1 M HCl, pH 7,6
TENS-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5 % Natriumdo-decylsulfate (SDS), pH 8,0
TNB-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,5 % Blockierungsrea-genz (TSA-Kit)
TNT-Puffer	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 0,05 % Tween20 (Sigma)

### 3.3 Primer

Amplifikat	Primersequenz (5' → 3')
<i>Schwere Kette</i>	
VH2	AgA TCA CCT TgA Agg AgT CTg g
VH3	g TgC AgC Tgg TgS AgT CTg g
VH4	Agg TgC AgC TgC Agg AgT Cg
VH4N	Agg TgC AgC TAC AgC AgT gg
VH6	C AgC TgC AgC AgT CAg gTC C
α1/2	gAg gCT CAg Cgg gAA gAC CTT g
γ4	gAg ggC gCC Agg ggg AAg AC
hum M3	ACg ggg AAT TCT CAC Agg AgA C
<i>Leichte Kette</i>	
Kappa	
Vκ1/4	C ATC CAg WTg ACC CAg TCT CC
Vκ2b	gAT RTT gTg ATg ACT CAg TCT CC
Vκ2/4/6	T ATT gTg ATg ACC CAg ACT CC
Vκ3	CTK TgT CTC CAg ggg AAA gAg
Vκ5	A ACC ACA CTC ACg CAg TCT CC
K110	AA gAT gAA gAC AgA Tgg TgC AgC CAC
Lambda	
Vλ1	gTC TgT gTT gAC gCA gCC gC
Vλ2	CA gTC TgC CCT gAC TCA gCC
Vλ3a	CTA TgT gCT gAC TCA gCC ACC
Vλ3b	C TTC TgA gCT gAC TCA ggA CC
Vλ4b	gCT TgT gCT gAC TCA ATC gCC
Vλ7/8	gAC TgT ggT gAC YCA ggA gC
L115	ggg Cgg gAA CAg AgT gAC Cg
<i>Primer für TOPO 2.1 Vektor</i>	
+40	CAg gAA ACA gCT ATg AC

Amplifikat	Primersequenz (5' → 3')
<i>Chemokinrezeptor spezifische Primer</i>	
5'-Primer CCR6	CAT ggA ACT CAT gTT TTT AAA ggg C
3'-Primer	CCA TgC CTA gCC CAT gAC AgT A
5'-Primer CCR7	AgC ACA CTC ATC CCC TCA CTT g
3'-Primer	AgC CAA gAg CTg AgT gCA TgT C
5'-Primer CCR9	gTg ACC ATC ACT gTC CTg ACC g
3'-Primer	ACg AgA TCC Cgg Cgg AAT CTC
5'-Primer CXCR3	CAC TgC CCT TCT CAT TTg gAA ACT
3'-Primer	gCA AAT ATA gAg gTC TTg ggg AC
5'-Primer CXCR4	ggA CCT gTg gCC AAg TTC TTA gTT
3'-Primer	ACT gTA ggT gCT gAA ATC AAC CCA
5'-Primer CXCR5	Cag gAC AAC gAg AAA gCC CTA Ag
3'-Primer	ggT CTC TgT gCT gCC TgT ACT gT

### 3.4 Verbrauchsmaterial

Blutabnahme	Vacutainer® cpt System (Becton Dickinson)
Laborfilm	Parafilm (American National Can)
Messer für Mikrotom	Microedge (Microm)
PCR-Gefäße	0,2 ml 8ter Streifen (Eppendorf)
Petrischalen	∅ 10 cm (Greiner)
Pipettenspitzen	sterile, gefilterte (Greiner, Biozym)
Reaktionsröhrchen	15 und 50 ml (Corning)
Reaktionsgefäße	0,5; 1,0; 2,0 ml (Eppendorf)

### 3.5 Gewebe und Blut

Blutproben von 26 Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), 13 Patienten mit Osteoarthritis (OA), sowie 11 Patienten mit systemischen Lupus erythematodes (SLE) und 21 gesunden Kontrollen wurden untersucht. Die Patienten wurden in der Rheumatologie oder Orthopädie der Charité, Humboldt Universität Berlin behandelt. Einige der Blutproben der Kontrollen stammen aus der Blutbank der Charité, die anderen von freiwilligen Spendern aus dem DRFZ. Die Untersuchungen am Blut von Patienten und Kontrollen aus der Blutbank wurden von der Ethikkommission der Charité genehmigt. Zu den gesunden Kontrollen liegen keine klinischen Daten vor.

In der Tabelle 3.1 sind Angaben zu Alter und Geschlecht der Patienten sowie Blut-Senkungs-Geschwindigkeit (BSG), C-reaktives-Protein (CRP) und Leukozytenzahl zusammengefasst. Die klinischen Daten der einzelnen Patienten sind im Anhang in der Tabelle A.1 angegeben. Diese Tabelle enthält auch Angaben über Medikamente, die Einfluss auf die untersuchten Erkrankungen haben, zusätzlich nahmen einige Patienten Herz-Kreislauf Medikamente ein oder injizierten Insulin.

Tabelle 3.1: **Charakteristika der untersuchten Patientengruppen**

Charakteristika	RA	OA	SLE	Kontrolle
Anzahl (weiblich/männlich)	26 (21/5)	13 (8/5)	11 (10/1)	21 (15/6)
Durchschnittsalter (Jahre $\pm$ SD)	59 $\pm$ 12	70 $\pm$ 6,2	36 $\pm$ 16,4	43 $\pm$ 12,7
Dauer der Erkrankung (Jahre $\pm$ SD)	3 $\pm$ 10,84	3 $\pm$ 2,7	9 $\pm$ 7,9	(-)
CRP [mg/dl]	3,0 $\pm$ 3,1	0,2 $\pm$ 3,3	0,6 $\pm$ 0,9	(-)
BSG [mm/h]	29 $\pm$ 30,5	25 $\pm$ 19,4	29 $\pm$ 16,7	(-)
Leukozytenzahl [ $10^9/l$ ]	9,13 $\pm$ 2,69	7,86 $\pm$ 2,67	4,10 $\pm$ 1,10	(-)
Behandlung	NSAR/ TNF-Blocker	NSAR	Cortison/ Immunosup.	keine

Der Median mit Standardabweichung für Alter, Dauer der Erkrankung und klinische Parameter der Patientengruppen. NSAR, nicht steroidale Antirheumatika; Immunosup., immunsuppressive Therapie.

Vier Synovialflüssigkeits-Proben und 37 Synovialgewebe von RA-Patienten wurden untersucht. Von einigen Synovialgeweben wurden nur Gefrierschnitte angefertigt, 15 wurden mittels FACS-Analyse untersucht. Zu sechs Geweben liegen die klinischen Daten der Patienten vor. Für die immunohistochemischen Untersuchungen wurden als Kontrolle zwei Synovialgewebe von Patienten mit OA und einem Unfallopfer untersucht. Die Gewebeproben stammen von Prof. Dr. V. Krenn, Institut für Pathologie der Charité.

## 3.6 Präparation von Gewebe

Das Gewebe wurde nach der Synovektomie in sterile Kochsalzlösung überführt. Zweimal wurde mit steriler Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und das Fettgewebe von zelligem Synovialgewebe mittels Pinzette und Schere getrennt. Für Gefrierschnitte wurde ein Teil des Gewebes in kleine Schälchen (10x10x5 mm Tissue Tek, Vogel) mit Einbettmedium (OCT, Tissue Tek, Vogel) überführt. Die Präparate wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

### 3.6.1 Einzelzell-Suspension aus Gewebe

Der Rest des Synovialgewebe wurde mechanisch mit einer Schere zerkleinert. Zum enzymatischen Aufschluss wurden 5 ml Kollagenase P (20 mg/ml, Boehringer) und 5 ml Kollagenase D (20 mg/ml, Boehringer) in 20 ml RPMI Medium (Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (Gibco) zu dem Gewebe gegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch ein 100 µm Zellsieb (Becton Dickinson) in ein neues Gefäß überführt und so Zellklumpen und z.T. Fett abgetrennt. Das Volumen wurde mit PBS auf 40 ml aufgefüllt.

### 3.6.2 Dichtegradientenzentrifugation

10 ml Ficoll (Amersham) wurden mit 40 ml der Zellsuspension oder verdünntem Blut (10 ml Heparin- oder EDTA-Blut mit PBS aufgefüllt) überschichtet. Der Ansatz wurde 25 min mit 15.000 Upm ohne Bremse, bei 20 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus). Die Lymphozyten bilden mit anderen einkernigen Zellen einen Ring zwischen der PBS- und der Ficoll-Schicht. Erythrozyten sinken auf den Grund, das Fett schwimmt an der Oberfläche. Die Lymphozyten wurden abpipettiert und in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch die Zugabe von 35 ml PBS mit 0,5 % Rinderserum Albumin (BSA Fraktion V, Sigma) und 4 mM Ethylendinitrietetraessigsäure (EDTA) und anschließender Zentrifugation gewaschen. Der Zentrifugationsschritt erfolgte bei 15.000 Upm für 20 min, bei 20 °C und mit Bremse.

## 3.7 Immunhistochemische Methoden

### 3.7.1 Beschichten von Objektträgern

Objektträger (76x26 mm, Menzel) wurden mit Aminopropylengruppen beschichtet, um das Anhaften der Gewebeschnitte zu verbessern. Die Objektträger wurden mit Aceton (Roth) entfettet

und mit 2 % 3-Aminopropyltriethoxysilan (Sigma) in Aceton für je 5 min behandelt. Reste wurden mit Wasser heruntergespült. Nach dem Trocknen an der Luft wurden sie in Aluminiumfolie locker verpackt und zwei Stunden bei 250 °C gebacken.

### 3.7.2 Gefrierschnitte

Die optimale Temperatur des Kryostaten (HM 500 OM) richtet sich nach dem Gewebe und liegt zwischen -10 °C und -30 °C. Von den Gewebestücken wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Dicke entspricht einer einzelnen Zellschicht. Jeweils zwei Schnitte wurden auf einem beschichteten Objektträger aufgenommen und luftgetrocknet. Die Schnitte wurden 5-10 min bei 50 °C auf einem Heizblock und 10 min in Aceton fixiert. Nach dem vollständigen Trocknen wurden sie mit Calciumchlorid bei -70 °C aufbewahrt.

### 3.7.3 Immunohistochemische Färbung

Die Gefrierschnitte wurden mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako) umkreist, um weniger Puffer und Antikörperlösung zu verbrauchen. Freie Proteinbindungsstellen im Gewebe wurden mit 3 % BSA in PBS-Puffer blockiert. Die Antikörper wurden in diesem Puffer verdünnt, in der Regel wurden 5 µg/ml des Antikörpers eingesetzt und für 30 min inkubiert. Als primärer Antikörper wurden vor allem Maus-anti-human-Antikörper verwendet (s. Tabelle 3.2). Der Kaninchen-anti-human-Ki67 ist eine Ausnahme. Als kombinierter sekundärer Antikörper (anti-Maus und anti-Kaninchen) mit alkalischer Phosphatase (AP) wurde das Envision System (Dako) verwendet und je ein Tropfen der gebrauchsfertigen Lösung auf das Gewebe getropft und für 20-30 min inkubiert. Neufuchsin wurde als Substratlösung für die alkalische Phosphatase immer frisch angesetzt. Es wurden 3,5 ml Tris-Puffer (0,05 M, pH 9,7) mit 1,25 ml Propandiol (0,2 M) und 50 µl Levamisol (40 mg/ml, Sigma) gemischt. 10 µl Neufuchsin (0,05 mg/ml, Sigma) wurden mit 25 µl Natriumnitrit (0,05 mg/ml) separat gemischt und 1 min inkubiert. Die Neufuchsin-Mischung wurde zu dem Puffer gegeben und 30 µl Naphtol (25 mg (Sigma) in 300 µl N,N-Dimethylformamid, (Sigma)) und der pH-Wert mit 2 N HCl auf 8,7 eingestellt. Die Lösung wurde gut gemischt und durch einen 0,22 µm Filter (Millipore) gegeben. Es wurden 100 µl pro Schnitt eingesetzt. Nach Erreichen der gewünschten Farbtintensität (10-45 min) wurde die Reaktion mit PBS gestoppt. Zur Herstellung des Kontrastes wurden mit Hämatoxylin (0,1 % Mayer's Hämatoxylin Lösung, Sigma) die Zellkerne angefärbt. Als Substrat für die Peroxidase wurden 3,3-Diaminobenzidin-Tabletten (DAB, Sigma) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Färbung wurde beendet und gegengefärbt wie beschrieben. Die Präparate wurden mit flüssiger Gelatine (Kaiser's Glyceringelatine) betropft und mit Deckgläsern (24x50 mm, Menzel) eingedeckt.

Tabelle 3.2: Antikörper für immunohistochemische Färbungen

Epitop	Antikörper	Verdünnung
anti-CD4	Maus, Klon: MT310 (Dako)	1:50
anti-CD20	Maus, Klon: L26 (Dako)	1:30
anti-CD31	Maus, Klon: JC/10A (Dako)	1:30
anti-CD38	Maus, Klon: AT13/5 (Dako)	1:100
anti-CD68	Maus, Klon: EBM11 (Dako)	1:200
anti-CXCL10	Maus, Klon: 33036.211 (R&D)	1:20
anti-CXCL12	Maus, Klon: 79014.111 (R&D)	1:20
anti-CXCL13	Maus, Klon: 53610.11 (R&D)	1:20
anti-BAFF	Ratte, Klon: Buffy-2 (Alexis)	1:20
anti-FDC	Maus, Klon: Wü 2*	1:50
anti-Fibroblasten	Maus, Klon: 5B5 (Dako)	1:25
anti-Ki 67	Kaninchen, Polyklonal (Dako)	1:50
anti-Maus Ig-POD	Kaninchen, 1 mg/ml (Dako)	1:100
anti-Ratten IgM-POD	Ziege, 0,8 mg/ml (Dunn)	1:20
anti-FITC-POD	1 mg/ml (Roche)	1:100
Kontrolle	Maus mIgG2B-FITC (R&D)	1:100

Der Wü Antikörper(\*) wurde freundlicherweise von Dr. A. Greiner von der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

### 3.7.4 Verstärkung von immunohistochemischen Färbungen

Färbungen von gering konzentrierten Strukturen wurden durch die Verwendung des TSA Fluorescein Systems (Perkin Elmer) verstärkt. Die Gewebeschnitte wurden 30 min bei Raumtemperatur mit dem Tris-NaCl-Blockierungs (TNB)-Puffer blockiert und der primäre Antikörper in TNB-Puffer verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 5 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Der ungebundene erste Antikörper wurde mit TNT-Puffer bei Raumtemperatur in 3 x 5 min Waschschritten gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde Kaninchen-anti-Maus-Peroxidase eingesetzt, die Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur. Es wurde wie oben beschrieben gewaschen. Die Verstärkung erfolgte durch die Zugabe von 150 µl Tyramid Signal Amplifikation (TSA) (1:50 in Verdünnungsreagenz, aus dem Kit). Nach 7 min wurde das TSA wieder von den Schnitten gewaschen. Das Gewebe wurde mit einem anti-FITC-Antikörper, der Peroxidase-gekoppelt war, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor die Peroxidase-Substratlösung (s. o.) zugegeben wurde, musste überschüssiger Antikörper heruntergespült werden. Zur Kernfärbung wurde Hämatoxilin verwendet (s. o.).

## 3.8 Durchflusszytometrische-Methoden

Für FACS-Messungen (engl.: fluorescence activated cell sorter [136]) wurden die Zellen mit Antikörpern, die gegen Oberflächenmarker gerichtet sind, markiert. Die Antikörper sind an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die im FACS-Gerät mit einem Laser angeregt werden. Die einzelnen Zellen werden anhand der Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Fluoreszenzstrahlung charakterisiert.

### 3.8.1 FACS-Messung

Die nach der Präparation (s. Abschnitt 3.6.2) zentrifugierten Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden pro Färbung 100 µl Aliquots abgenommen, zentrifugiert (Biofuge pico, Haereus) und die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit den jeweiligen Antikörpern aufgenommen (s. Tabelle 3.3), wobei in dieser Arbeit bis zu vier Antikörper (mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC, PE, PerCp, Cy5) kombiniert wurden.

Die Ansätze wurden mindestens 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 µl FACS-Puffer gestoppt. Es folgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper wie für den primären beschrieben. Bei biotinierten primären Antikörper wurden die Zellen in 100 µl Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-Lösung (mit sekundären Antikörper für die anderen primären Antikörper) resuspendiert. Die Zellen wurden durch die wiederholte Zugabe von FACS-Puffer und zentrifugieren gewaschen, in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und an einem FACS-Gerät (FACSCalibur, Becton Dickinson) gemessen. Propidiumjodid 5 µl (1 mg/ml) wurde verwendet, um tote Zellen zu färben, die von der Analyse ausgeschlossen wurden.

### 3.8.2 FACS-Zellsortierung

Die Zellmarkierung erfolgte wie oben beschrieben. Aus den Zellsuspensionen wurden Einzelzellen, die die gewünschte Oberflächenmarkierung tragen, durch das Ablenken des Flüssigkeitsstrahls im FACS-Gerät aussortiert. Die Zellen wurden für die anschließende Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) direkt in 0,2 ml PCR-Gefäße sortiert, in denen 20 µl 1x RT-PCR Puffer (one step RT-PCR Kit, Qiagen) vorgelegt wurde. Die Zellen wurden bei -70 °C gelagert.



Tabelle 3.3: Antikörper für durchflußzytometrische Messungen

Epitop	Antikörper	Verdünnung
anti-CD19-bio	Maus, Klon: BU12 (DRFZ)	1:100
anti-CD20-FITC	Maus, Klon: B-Ly1 (Dunn)	1:50
anti CD27-Cy5	Maus, Klon: 2E7*	1:400
anti-CD38-FITC	Maus, Klon: HIT2 (BD Pharmingen)	1:100
anti-CCR5-FITC	Maus, IgG2b, Klon: 45523.111 (R&D)	1:10
anti-CCR6-FITC	Maus, IgG2b, Klon: 53103.111 (R&D)	1:10
anti-CCR7-FITC	Ratte, IgG2a, Klon: 3D12 <sup>◇</sup>	1:10
anti-CCR9-FITC	Maus, IgG2a, Klon: 112509.111 (R&D)	1:10
anti-CXCR3-FITC	Maus, IgG2b, Klon: 49801.111 (R&D)	1:10
anti-CXCR3-PE	Maus, IgG1, Klon 1C6 (BD Pharmingen)	1:20
anti-CXCR4-PE	Maus IgG2a, Klon: 12G5 (BD Pharmingen)	1:10
anti-CXCR4	Ratte, IgG2b <sup>◇</sup>	1:50
anti-CXCR5-FITC	Maus IgG2b, Klon: 51505.111 (R&D)	1:10
anti-CXCR5-FITC	Ratte IgG2a, Klon: 8-B2 <sup>◇</sup>	1:100
mIgG2b-FITC	Isotypenkontrolle (R&D)	1:100
mIgG2a-FITC	Isotypenkontrolle (R&D)	1:10
anti-Ratte-PE	Ziege, 0,5 mg/ml (Dunn)	1:100
Streptavidin-PE	0,5 mg/ml in PBS/Azid (BD Pharmingen)	1:100
Streptavidin-FITC	0,5 mg/ml in PBS/Azid (BD Pharmingen)	1:100
Streptavidin-PerCP	0,1 mg/ml in PBS/Azid (BD Pharmingen)	1:100

Die Antikörper wurden freundlicherweise von M. Lipp, Berlin (<sup>◇</sup>) und René van Lier, Amsterdam (\*) zur Verfügung gestellt.

### 3.9 Migrations-Test

Mit diesen Test wurde die Wanderung von Zellen auf ein bestimmtes Chemokin getestet. In einem Zwei-Kammer-System (Transwellplatten, Costar) wurden in die obere Kammer Zellen ausgesät. Diese Kammer ist durch eine Membran mit 5 µm großen Poren von der unteren Kammer getrennt, in der das zu testende Chemokin, in Medium, gelöst vorliegt. Die Zellen können nicht durch die Poren fallen, sondern müssen sich aktiv hindurch bewegen, wenn sie chemotaktil auf das Chemokin reagieren.

In die obere Kammer der Transwellplatten (12er Platte) wurden je 50  $\mu\text{l}$  einer humanen Fibronectin Lösung (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Gibco) in Aqua dest.) gegeben und eine Stunde im Brutschrank (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ , Heraeus) inkubiert, um die Membran zu beschichten. Die Flüssigkeit wurde dann wieder abgesaugt und die Einsätze für zwei Stunden im Brutschrank getrocknet. Die Lymphozyten wurden aus dem Blut über eine Dichtegradientenzentrifugation (s. Abschnitt 3.6.2) isoliert. Die Zellen wurden zweimal mit Medium (RPMI ohne Methylrot) gewaschen und die Zellzahl auf  $5 \cdot 10^6/\text{ml}$  in Testmedium (RPMI mit 0,5 % BSA) eingestellt. Es wurden immer Dreifach-Messungen ange-setzt. In die untere Kammer wurden 0,6 ml Testmedium mit oder ohne Chemokin (CXCL10 und CXCL12, R&D) gegeben. In die Einsätze wurden 0,1 ml der Zellsuspension eingesäht (entspricht  $5 \cdot 10^5$  Zellen). Nach einer Stunde Inkubation wurden die Zellen der oberen und unteren Kammer in FACS-Puffer aufgenommen und wie unter Abschnitt 3.8.1 beschrieben gefärbt und gemessen.

### 3.10 Molekularbiologische Methoden

#### 3.10.1 Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion

Die RNA aus den sortierten Zellen des Synovialgewebes, der Synovialflüssigkeit oder dem Blut wurde in einem RT-PCR-Verfahren in cDNA umgeschrieben, ohne dass die RNA aus der Zelle isoliert wurde. Bei der angewendeten RT-PCR-Strategie für die V-Gene der B-Zellen wurde die RNA für den BCR erst in eine komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe von Primern, die im konstanten Bereich der H-Kette ( $\gamma$  4, hum M3,  $\alpha$  1/2) bzw. L-Kette (für  $\kappa$  K110 und für  $\lambda$  L115) binden, umgeschrieben.

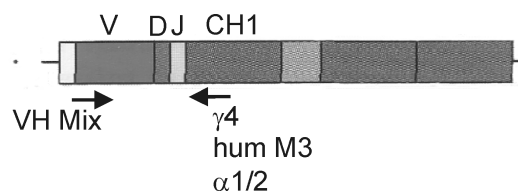


Abbildung 3.1: **Lage der Primer für die RT-PCR der H-Kette.** Die Primer  $\gamma$  4, hum M3,  $\alpha$  1/2 liegen im ersten Exon des konstanten, die des VH-Primer-Mixes im variablen Bereich der Antikörper-Kette.

Die Sequenzen der Primer sind in der Tabelle auf Seite 18 aufgelistet und die Lage der Primer ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Im zweiten Schritt wurde die cDNA als Vorlage für eine PCR

genutzt, bei der eine Mischung von Primern für die variable Region (VH und V $\kappa$  bzw. V $\lambda$ ), des BCR eingesetzt wurden.

Zu den in 20  $\mu$ l 1x RT-PCR Puffer sortierten Zellen wurden 30  $\mu$ l eines Mixes gegeben.

Der Mix enthält:

Lösungen	Volumen
5x RT-PCR Puffer (Kit)	6 $\mu$ l
dNTP Mix (10 mM je dNTP, Pharmingen)	2 $\mu$ l
Enzym-Mix (Kit)	2 $\mu$ l
Q-Solution (Kit)	10 $\mu$ l
3'Primer (10 pmol)	1 $\mu$ l
5'Primer (10 pmol)	1 $\mu$ l
Wasser (Biozym)	8 $\mu$ l
Endvolumen	30 $\mu$ l

Die RT-PCR wurde in einem PCR-Gerät (Mastercycler, Eppendorf) durchgeführt. Für die RT-PCR der H- und L-Kette des BCR wurde die RNA bei 50 °C für 60 min in cDNA mit den Primern in dem ersten Exon der konstanten Bereiche umgeschrieben. Der Ansatz wurde gedrittelt und je 1  $\mu$ l des Primer VH- oder V $\kappa$ - oder V $\lambda$ -Mix zugegeben. Der VH-Primer-Mix enthält je 10 pmol der Primer VH2, VH3, VH4, VH4N und VH6. Der V $\kappa$ -Mix enthält die Primer V $\kappa$ 1/4, V $\kappa$ 2b, V $\kappa$ 2/4/6, V $\kappa$ 3 und V $\kappa$ 5. Der V $\lambda$ -Mix enthält die Primer V $\lambda$ 1, V $\lambda$ 2, V $\lambda$  3a, V $\lambda$ 3b, V $\lambda$ 4b und V $\lambda$ 7/8.

Für die Amplifikation der Chemokinrezeptoren in B-Zellen aus peripherem Blut wurde das Einschrittverfahren nach Angaben der Hersteller (Qiagen) durchgeführt.

Das PCR-Programm umfasst nach der Denaturierung (95 °C, 15 min) 40 Zyklen mit 94 °C für 1 min, 67 °C für 1 min und 72 °C für 1 min sowie abschließend 72 °C für 10 min und Abkühlen auf 4 °C.

Die PCR-Produkte wurden in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Für analytische Gele wurden je nach Fragmentgröße 1-2 % Agarose (Appligene Oncor) mit 0,03 % Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml, Boehringer) verwendet, für präparative 1 % Agarose (NuSieve GTG, Biozym). Die Auftrennung erfolgt in Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer bei 100-120 V. Aus präparativen Gelen wurden Banden von Interesse mit Minilanzetten (B. Braun) ausgeschnitten.

### DNA Elution aus Agarosegel

Zu den Gelstücken wurden 10 µl Silika Gel Partikeln (Jet Sorb, Genomed) und 300 µl Puffer A1 (im Kit enthalten) gegeben und 15 min bei 50 °C inkubiert. Alle 3 min wurden die Ansätze gemischt. Anschließend wurde 30 s bei 10.000 Upm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 300 µl A1 resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Der Niederschlag wurde noch zweimal in Puffer A2 (im Kit enthalten) gewaschen und dann an der Luft getrocknet. Um die DNA von der Jet Sorb Matrix zu lösen, wurde der Niederschlag wieder in 20 µl Wasser aufgenommen und 5 min bei 50 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation (s.o.) in ein neues Gefäß überführt.

## 3.10.2 Klonierung

### Ligation

Die zu untersuchende DNA wurde in die Vektor-DNA mit dem TOPO TA cloning Kit (Invitrogen) eingebaut. 1 µl Salzlösung (cloning Kit) wurden mit 2 µl DNA (nach Jet Sorb), 1 µl TOPO 2.1 Vektor (cloning Kit) und 2 µl Wasser gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### Transformation

Kompetente Zellen (TOP 10F', Invitrogen) wurden mit 2 µl des Ligationsansatzes 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Vektor-DNA erfolgte, nachdem die Zellen bei 42 °C für 30 s permeabilisiert wurden. Nach 2 min auf Eis wurden 200 µl SOC-Medium (cloning Kit) zu den Zellen gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. 30 µl wurden von dem Ansatz auf Hefe Tryptone (YT) Agar mit 64 µg/ml Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (Gibco) und 50 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indol-β-D-Galaktosid (Gibco) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurden weiße oder leicht hellblaue einzeln liegende Kolonien von der Platte isoliert und in 2 ml flüssigem YT-Medium über Nacht vermehrt.

### Präparation der Plasmid-DNA

Die Bakterien-Schüttelkultur wurde bei 13.000 Upm für 10 s abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 300 µl TENS-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 150 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) wurden Zellrümpfer abzentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wurde in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde durch die Zugabe von 900 µl Ethanol (96 %,

Roth) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Nach 20 min wurde die DNA bei 15.000 Upm für 10 min abzentrifugiert und durch die Zugabe von  $150\text{ }\mu\text{l}$  70 % Ethanol gewaschen. Abschließend wurde 5 min bei 15.000 Upm zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette abgenommen und die DNA ca. 10 min bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknet, um die letzten Reste Ethanol zu entfernen und in  $20\text{ }\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen. Der Erfolg der Klonierung der zu untersuchenden Sequenz in den Vektor, wurde durch ein Restriktionsverdau mit EcoRI (Enzym mit Puffer, Gibco) der isolierten Plasmid DNA gezeigt.

### 3.10.3 Sequenzierung

Für die Sequenzierung nach dem Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger [137] wurde ein Kit (Sequenzierungs Terminator Big Dye Kit, Perkin Elmer) verwendet, die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Für die Sequenzierung wurde der +40 Primer genutzt, der komplementär zu einer Sequenz im TOPO 2.1 Vektor ist (Sequenz des Primers s. Tabelle auf Seite 18).

Sequenzierungsansatz:

Lösungen	Volumen
Ready Reaktion Mix Big Dye (Perkin Elmer)	$2\text{ }\mu\text{l}$
Primer +40 (3 pM)	$3\text{ }\mu\text{l}$
Wasser (Biozym)	$4,5\text{ }\mu\text{l}$
DNA	$0,5\text{ }\mu\text{l}$
Endvolumen	$10,0\text{ }\mu\text{l}$

Die Proben durchliefen 20 Zyklen des Sequenzierungsprogramms mit  $96\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 s,  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 s und  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 4 min.

Die DNA-Fragmente wurden nach der Sequenzierung durch die Zugabe von  $80\text{ }\mu\text{l}$  Aqua dest.,  $10\text{ }\mu\text{l}$  Natriumacetat (3 M) und  $250\text{ }\mu\text{l}$  Ethanol (96 %) gefällt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 min bei max. Geschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die DNA wurde mit  $350\text{ }\mu\text{l}$  Ethanol (70 %) gewaschen und 5 min wie oben zentrifugiert. Ethanolreste wurden beim Trocknen bei  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  entfernt. Die DNA wurde in  $20\text{ }\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen und in den Probenhalter des Sequenzier-Geräts (ABI Prism 310, Perkin Elmer) gestellt. Die Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden in einer 47 cm langen Kapillare (Durchmesser von  $50\text{ }\mu\text{m}$ , Perkin Elmer) getrennt, die mit dem Polymer (POP6, Perkin Elmer) gefüllt war.

### 3.11 V-Gen-Sequenz-Analyse

Die erhaltenen V-Gen-Sequenzen wurden durch das DNA-Plot Search Programm mit den bereits publizierten humanen Keimbahnsequenzen der V-BASE Datenbank (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/DNAPLOT.php?menu=901>) verglichen. Die Keimbahngene mit der höchsten Homologie wurden identifiziert und zur Bestimmung der somatischen Mutationen als Referenzsequenz verwendet. Die Bestimmung der CDR in der Sequenz und die Nummerierung der Aminosäuren erfolgt nach Kabat [138].

### 3.12 Statistische Analyse

Für Patienten, die mehrfach untersucht wurden, sind die Daten gemittelt und der Median verwendet worden. Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software Prism (Version 3.0) durchgeführt. Zur Varianzanalyse mehrerer Gruppen wurde der nicht parametrische Test nach Kruskal-Wallis angewendet. Der nicht parametrischen Mittelwertvergleich von zwei unabhängigen Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-Test analysiert. Die statistische Analyse erfolgte im hierarchischen Verfahren. Es wurde zuerst der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, wenn dieser Test signifikante Unterschiede aufwies, wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde bei  $p \leq 0,05$  festgesetzt. Zur Analyse der Korrelationen zwischen den Chemokinrezeptor-tragenden B-Zell-Anteilen wurde der Test auf lineare Korrelation nach Pearson verwendet.