

3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen wird im Verlauf der Immunantwort in den sekundären lymphatischen Organen eingeleitet. Im späteren Verlauf protektiver Immunantworten sind IgG Antikörper sezernierende Zellen (ASC) dann im Knochenmark zu finden. Langlebige Plasmazellen, die im Verlauf einer Sekundärantwort entstehen, leisten einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung schützender Antikörpertiter. Man nimmt an, dass diese Funktion eng mit der Lokalisation der Plasmazellen im Knochenmark verknüpft ist. Außer im Knochenmark, das ein physiologisches Reservoir von ASC darstellt, sind diese Zellen unter pathologischen Bedingungen auch in verschiedenen anderen Geweben zu finden: an Orten, wo sich chronische Entzündungsprozesse abspielen, können Plasmazellen akkumulieren und persistieren. Bei bestimmten Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematoses tragen Antikörper zur Pathogenese bei, so dass die Immunglobuline in diesen Fällen den Organismus nicht schützen, sondern ihm schaden.

Die Einwanderung der Plasmazellen ins Knochenmark und in entzündetes Gewebe stellt vermutlich einen wichtigen Prozess dar, der für die Homöostase des gesamten Plasmazellkompartiments sowohl im physiologischen als auch pathologischen Zustand von Bedeutung ist. Es ist jedoch nur wenig über die Mechanismen bekannt, die diese Migration steuern.

Chemokine besitzen eine große Bedeutung für das Immunsystem, denn sie tragen zur Positionierung von an der Immunantwort beteiligten Zellen bei. Dies geschieht, indem sie bei diesen Zellen Chemotaxis auslösen.

In dieser Arbeit sollte die Rolle von Chemokinen bei der Migration von IgG-ASC in unterschiedliche Gewebe der Maus untersucht werden.

4 Material und Methoden

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen und Medien wird den einzelnen Methoden vorangestellt, da sie die Grundlage der durchgeführten Experimente waren. Die im Einzelnen verwendeten Materialien sind bei der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt.

4.1 Übersicht über die verwendeten Materialien

4.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herkunft
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄	Roth Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich
PBS mit Bovinem Serum-Albumin (PBS/BSA)	PBS 0,5 % BSA	Biomol
Saponin-Färbepuffer	PBS 0,2 % BSA 0,5 % Saponin	Biomol Sigma-Aldrich
Saponin-Waschpuffer	PBS 0,2 % BSA 0,1 % Saponin	Biomol Sigma-Aldrich
ELISPOT Blockierungs-Puffer	PBS 3 % BSA	Biomol
ELISPOT Puffer (BSA-frei)	PBS 3 % Magermilchpulver	Aldi
ELISPOT Waschpuffer	PBS 3 % BSA 0,01 % Tween 20	Sigma-Aldrich
AMP-Puffer	95 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP) 0,1 ml Triton X-405 150 mg/ml MgCl ₂ 900 ml Wasser pH 10,25 eingestellt mit HCl	Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herkunft
Komplettes Zellkulturmedium	Rosewell Park Memorial Institute	
	Medium(RPMI) 1640	Life Technologies
	10 % Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
	10 mM L-Glutamat	Invitrogen
	20 µM β-Mercaptoethanol	Invitrogen
	100 U/ ml Penicillin	Invitrogen
	100 µg/ ml Streptomycin	Invitrogen
Chemotaxismedium	RPMI Medium 1640	
	0,5 % BSA (endotoxinarm)	Sigma-Aldrich

4.1.2 Material für Immunisierungen

Bezeichnung	Herkunft
Spritzen	Braun
Kanülen	Braun
Ovalbumin aus Hühnerei (OVA)	Sigma-Aldrich
Imject®-Alum	Pierce

4.1.3 Material für zellbiologisches Arbeiten

Bezeichnung	Herkunft
Zellröhrchen 15/50 ml	Corning Costar,
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2 ml	Eppendorf
Pipetten	Pipetman
Pipettenspitzen	Corning Costar
Sterilfilter	Millipore
Zellkulturgefäße	Corning Costar
Zellsiebe	Becton Dickinson
Histopaque-1083	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd	Merck
Fibronectin	Invitrogen
Transwell®-Einsätze und 24-er Zellkulturplatten (5 µm Porengröße und 6,5 mm Durchmesser)	Corning Costar
96-er Mikrotiterplatten (flachbodig, hochbindend)	Corning Costar

4.1.4 ELISPOT-Reagenzien

Bezeichnung	Herkunft
<i>Detektionsantikörper</i> Ziege-Anti-Maus IgG-Biotin (polyklonal)	Southern Biotech
<i>Sekundärreagenz</i> Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Roche
<i>Substrat</i> 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich
<i>Trägersubstanz für das Substrat</i> Agarose (niedrige EEO)	Sigma-Aldrich

4.1.5 Rekombinante Chemokine

Die rekombinanten murinen Chemokine CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL19, CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, XCL1 und CX₃CXL1 stammten von der Firma R&D Systems. CCL17 war aus dem Kulturüberstand stabil transfizierter Insektenzellen (Schneider-2-TARC), gewonnen worden und wurde freundlicherweise von Gudrun Debes, AG Experimentelle Rheumatologie der Universitätsklinik Charité (HU Berlin) zur Verfügung gestellt.

4.1.6 Färbereagenzien für die Durchflusszytometrie

Absättigung unspezifischer Bindungsstellen

Zur Blockierung der Fc-Rezeptoren und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen vor der Färbung mit Anti-Fc-Antikörpern sowie mit Ratten-IgG inkubiert. Dadurch sollte eine höhere Spezifität der Färbung erzielt werden.

Bezeichnung	Herkunft
<i>Blockierung der Fc-Rezeptoren</i> Fc Block (Ratte-Anti-Maus CD16 bzw. CD32)	BD Pharmingen
<i>Blockierung unspezifischer Bindungsstellen</i> Ratten IgG	Biotrend

Oberflächenfärbungen

Für die Oberflächenfärbungen wurden Ak verwendet, die an Phycoerythrin (PE) oder Biotin gekoppelt waren. Der 1D9 (Anti-Maus CXCR4)-Antikörper war zuvor nach Herstelleranweisungen mit Sulfosuccinimidyl-6-Biotinamido-Hexanoat (Pierce) biotinyliert worden. Die biotinylierten Antikörper wurden mit dem Sekundärreagenz Streptavidin-Allophycocyanin (BD Pharmingen) im Durchflusszytometer detektierbar gemacht. Ovalbumin war für die antigenspezifischen Färbungen nach Anweisungen des Herstellers Roche mit Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) konjugiert worden. Tote Zellen wurden über ihre Aufnahme von Propidiumiodid (PI, Sigma-Aldrich) im FACS von der Analyse ausgeschlossen.

Im Einzelnen wurden die folgenden monoklonalen Ratte-Anti-Maus Antikörper eingesetzt:

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
CD138	281-2	PE	BD Pharmingen
CXCR4	1D9	Biotin bzw. ungekoppelt	Prof. R. Förster, Immunologie MH Hannover)
IL-12 (Isotypkontrolle)	C17.8	Biotin	DRFZ

Intrazelluläre Färbung

Hierfür wurden Antikörper verwendet, die an Digoxygenin (DIG) gekoppelt waren. Als Sekundärreagenz wurde Anti-DIG-Indodicarbocyanin (Cy5) eingesetzt.

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
IgG1	X56	DIG	Miltenyi Biotec
IFN? (Isotypkontrolle)	R4.6A2	DIG	DRFZ
Anti-DIG	Fab- Fragmente	Cy5	Roche

4.1.7 Material für molekularbiologisches Arbeiten

Bezeichnung	Herkunft
Rotor-Stator Homogenisator	Janke& Kunkel
DEPC	Sigma-Aldrich
dNTPs	Peqlab
RNeasy™ Midi Kit	Qiagen
Oligotex™ mRNA Midi Kit	Qiagen
Transkriptionspuffer, Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen
Taq Polymerase	DRFZ

Oligonukleotide und Lightcycler®-Sonden

Alle verwendeten Oligonukleotide und Sonden wurden von der Firma Tibmolbiol synthetisiert. Die verwendeten Sequenzen orientierten sich an veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen (113).

Bezeichnung des Gens und der Oligonukleotide	Sequenz
β-Actin <i>LC-Primer:</i> Murines β-Actin sense Murines β-Actin antisense <i>LC-Sonden:</i> Murines β-Actin FL Murines β-Actin 640	5'-CCgTgAAAAGATgACCCAATgAT 5'-CTCAgCTgTggTggTgAAgC 5'-TCT CCC TCA CgC CAT CCT gCg TCT X 5'-LC Red640-ACC Tgg CTg gCC ggg ACC TgA p
CXCL10 <i>LC-Primer:</i> IP10 forward IP10 reverse <i>LC-Sonden:</i> IP10 FL IP10 LC	5'-CCCACgTgTTgAgATCATTgC 5'-CTCTgCTgTCCATCCATCgC 5'-TCCTTAACTggAgTgAAgCCACgC X 5'-LC Red640-CACACCCCggTgCTgCg p

4.2 Mäuse und Immunisierungen

4.2.1 Mäuse des Stammes BALB/c

Für die Immunisierungsversuche wurden weibliche BALB/c Mäuse verwendet, die in der Versuchstierzuchtanlage des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) in Berlin unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen gezüchtet wurden. Zum Zeitpunkt der Primärimmunisierung waren die Tiere zwischen 6 und 8 Wochen alt. Jede Maus erhielt intraperitoneal eine Dosis von 100 µg Ovalbumin (OVA) in PBS injiziert. Das Proteinantigen war zuvor in dem Adjuvans Aluminium-Magnesium-Hydroxid gelöst worden, so dass eine Konzentration von 500 µg OVA pro ml Injektionslösung erreicht wurde. Nach 3 bis 6 Wochen erfolgte die sekundäre Immunisierung (Boost) mit 100 µg OVA in PBS (1 mg/ml, also 100 µl) intravenös in die laterale Schwanzvene.

4.2.2 Mäuse des Stammes NZBxNZW-F1 (NZB/W)

Die NZB/W-Mäuse wurden in der Versuchstierzuchtanlage des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) in Berlin unter spezifisch-pathogen-freien Bedingungen gezüchtet. Es wurden ausschließlich weibliche Mäuse im Alter von 4-6 Monaten verwendet. Im Alter von etwa 5 Monaten entwickeln diese Tiere eine dem humanen Systemischen Lupus Erythematoses ähnliche Erkrankung.

4.3 Vorbereitung der Zellen

4.3.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Zunächst wurden aus den Milzen und dem Knochenmark der zu untersuchenden Mäuse Einzelzellsuspensionen hergestellt. Hierfür wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und von außen zur Vermeidung von Kontamination mit 70 % Ethanol eingesprüht, unmittelbar darauf wurden die Milzen sowie beide Oberschenkelknochen entnommen und in Petrischalen mit 30 ml RPMI 1640-Medium überführt. Das Milzgewebe wurde mit einem Skalpell grob zerkleinert und dann mittels eines Spritzenstempels mehrfach durch ein Zellsieb von 70 µm Maschengröße gedrückt, bis in der Suspension keine Klümpchen mehr zu sehen waren. Durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) wurden die Zellen gewaschen und in RPMI-1640-Medium resuspendiert. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurde jeder der beiden Femuren eines Tieres unter Zuhilfenahme einer Pinzette erfasst, mittels Skalpell von anhängenden Muskel- und Sehnenanteilen befreit und der Femurkopf sowie das Kniegelenk abgetrennt. Mit einer 5 ml Spritze, die zuvor mit RPMI-

1640-Medium gefüllt und mit 25-Gauge Kanüle bestückt worden war, wurde von einer Seite in den somit eröffneten Röhrenknochen eingegangen, der Knochenmarkspopf sorgfältig herausgespült und in einer Petrischale aufgefangen. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei der Milz. Es ist zu beachten, dass in beiden Femuren 12,6 % des gesamten Knochenmarks enthalten sind (17), zur Ermittlung der Zahl der Plasmazellen im gesamten Knochenmark wurde daher die in den Experimenten erhaltene Zellzahl mit dem Faktor 7,94 multipliziert.

4.3.2 Gewinnung von mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Bei einem Teil der Experimente wurden zunächst Gradientenzentrifugationen durchgeführt, um ausschließlich lebende, mononukleäre Zellen zu analysieren. Die Zellen aus einer Milz oder zwei Femuren wurden in 7 ml RPMI-1640-Medium resuspendiert und damit 3 ml Histopaque 1083 in einem 15 ml-Röhrchen überschichtet, so dass sich beide Phasen nicht mischen konnten. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 2000 rpm ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die als weißlicher Ring erkennbare Lymphozytenfraktion wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, zweimal durch Zentrifugation in großem Volumen (30 ml) RPMI-1640-Medium gewaschen, resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der vorverdünnten Zellsuspension in ein Neubauer-Hämozytometer einpipettiert, die Zellen unter dem Invertmikroskop ausgezählt und nach folgender Formel die Gesamtzellzahl berechnet:

$$\boxed{\text{Gesamtzellzahl} = n \times V_f \times V_{ol} \times 10^4}$$

n = Durchschnittliche Zellzahl aus den 4 Großquadranten der Zählkammer

V_f = Faktor der Vorverdünnung

V_{ol} = Volumen, in dem die Zellen resuspendiert wurden

Zum Einstellen der gewünschten Zellkonzentration wurde das jeweilige Volumen des RPMI-1640-Mediums, in dem sich die Zellen befanden, angeglichen. Sofern in einem Experiment nur die Gesamtzahl Antikörper sezernierender Zellen ohne vorangegangene Chemotaxis untersucht wurde, folgte das zweimalige Waschen und Zählen der Zellen direkt auf die Herstellung der Zellsuspension, die Gradientenzentrifugation entfiel.

4.3.3 Zelltransfer-Experimente

Für die Zelltransfer-Experimente wurde eine Einzelzellsuspension von BALB/c-Milzzellen in PBS/0,1 % BSA auf eine Konzentration von 2×10^8 kernhaltigen Zellen pro ml eingestellt. Die Donoren waren 8 Wochen zuvor mit OVA primärimmunisiert worden. Von dieser Zellsuspension wurden dann 200 μ l in die laterale Schwanzvene eines jeden Rezipienten gespritzt. Zusammen mit der Zellsuspension wurden 100 μ g OVA und 100 μ g BSA (low endotoxin, Sigma) appliziert. Ein Teil der Rezipienten war 8 Wochen zuvor mit BSA in Aluminium-Magnesium-Hydroxid primärimmunisiert worden.

4.4 *Quantifizierung der Ovalbumin-spezifischen Antikörper-sezernierenden Zellen*

4.4.1 Prinzip der enzymgekoppelten Immunospot Methode

Die Quantifizierung der Ovalbumin-spezifischen Antikörper sezernierenden Zellen erfolgte mittels enzymgekoppeltem Immunospot (ELISPOT-Methode). Der Test basiert darauf, dass man ein Antigen oder einen Antikörper gegen ein Sekretionsprodukt auf einer Platte immobilisiert und dann eine zu testende Zellsuspension darauf gibt. Durch die Verwendung von Mikrotiterplatten ist es möglich, mehrere Verdünnungsstufen der Ausgangszellsuspension zu untersuchen. Während der Inkubationszeit sinken die Zellen auf den Plattenboden und beginnen, ihre Produkte zu sezernieren, im Falle von Plasmazellen beispielsweise Antikörper. Die Sekretionsprodukte werden von dem Antigen bzw. den Antikörpern auf der Platte gebunden. Daher entsteht an den Stellen, wo sich die Zellen auf der Platte befinden, eine Art „Fußabdruck“ aus dem jeweiligen Produkt. Dieser läßt sich nach Entfernung der Zellen nachweisen, indem man zunächst Biotin-gekoppelte Detektionsantikörper daraufgibt und im nächsten Schritt ein Konjugat von Streptavidin und alkalischer Phosphatase daraufgibt. Da Streptavidin mit hoher Affinität an Biotin bindet, resultiert hieraus eine Verbindung des Streptavidin- Alkalische Phosphatase-Komplexes an die Detektionsantikörper. Fügt man nun ein Substrat der alkalischen Phosphatase hinzu, welches die Eigenschaft hat, den enzymatischen Umsatz durch einen Farbumschlag anzuzeigen, so kann man die Stellen, an denen sich zuvor die entsprechenden Zellen befunden haben, als farbige Punkte sichtbar machen. Es ist hierbei zu beachten, dass man das Substrat in einer Trägersubstanz gelöst aufbringt, die die Eigenschaft hat, nach Abkühlung auf Raumtemperatur in einen festen Zustand überzugehen (zum Beispiel Agarose), damit eine

Diffusion des Farbstoffes auf der Platte verhindert wird und die Farbreaktionen auf der Mikrotiterplatte lokal punktförmig beschränkt bleiben. Diese so genannten Spots lassen sich dann mit Hilfe eines Invertmikroskopes auszählen.

4.4.2 Durchführung eines ELISPOTs zum Nachweis und zur Quantifizierung Ovalbumin-spezifischer IgG-sezernierender Zellen

In Abb. 2 sind zum besseren Verständnis die einzelnen Schritte des hier angewandten ELISPOTs dargestellt. Es wurden zunächst flachbodige, hochbindende Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen über Nacht bei 4 °C mit Ovalbumin in PBS (5 µg/ ml) beschichtet (Bild 1). Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur mit PBS, das 3 % BSA enthielt, inkubiert (Bild 2), bevor die Zellsuspension aufgebracht wurde (Bild 3). Bei einem Teil der ELISPOTs, namentlich bei der Analyse der Zelltransferexperimente, wurde Magermilchpulver anstelle von 3 % BSA verwendet, um eine Kreuzreaktivität mit BSA-spezifischen ASC zu vermeiden. Die Sekretion der Antikörper erfolgte für 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C unter Zusatz von 5 % CO₂ (Bild 4). Anschließend wurden die Zellen durch gründliches Waschen mittels PBS/3 % BSA/0,01 % Tween20 (Waschpuffer) vollständig entfernt (Bild 5). Dieser Puffer wurde auch zum Waschen zwischen allen nachfolgenden Arbeitsschritten sowie zur Herstellung der Gebrauchslösungen für die Reagenzien verwendet. Zur Detektion wurde ein polyklonaler Ratte-anti-Maus-IgG Antikörper, der an Biotin gekoppelt war, in der Konzentration von 1 µg/ ml eingesetzt und die Platten damit für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Bild 6). Danach wurden die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugat inkubiert (Bild 7) und dann das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat hinzugefügt (Bild 8). Dieses war zuvor in einer Konzentration von 1 mg/ ml in 2-AMP-Puffer gelöst worden. Die Lösung wurde dann mit geschmolzener Agarose vermischt, so dass die Gebrauchskonzentration der Agarose 0,6 % betrug, und für 30 Minuten bei 65 °C im Wasserbad erwärmt. Die Verfestigung der Agarose geschah für 10 Minuten bei 4 °C, nach weiteren 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion für 2 Stunden bei 37 °C entwickelt (Bild 9). Die ELISPOTs ließen sich dann unter einem Invertmikroskop (Olympus CK30) auszählen (Bild 10). Alle Proben wurden mindestens in Doppelansätzen analysiert, nach einem Chemotaxisversuch wurden Triplets angesetzt.

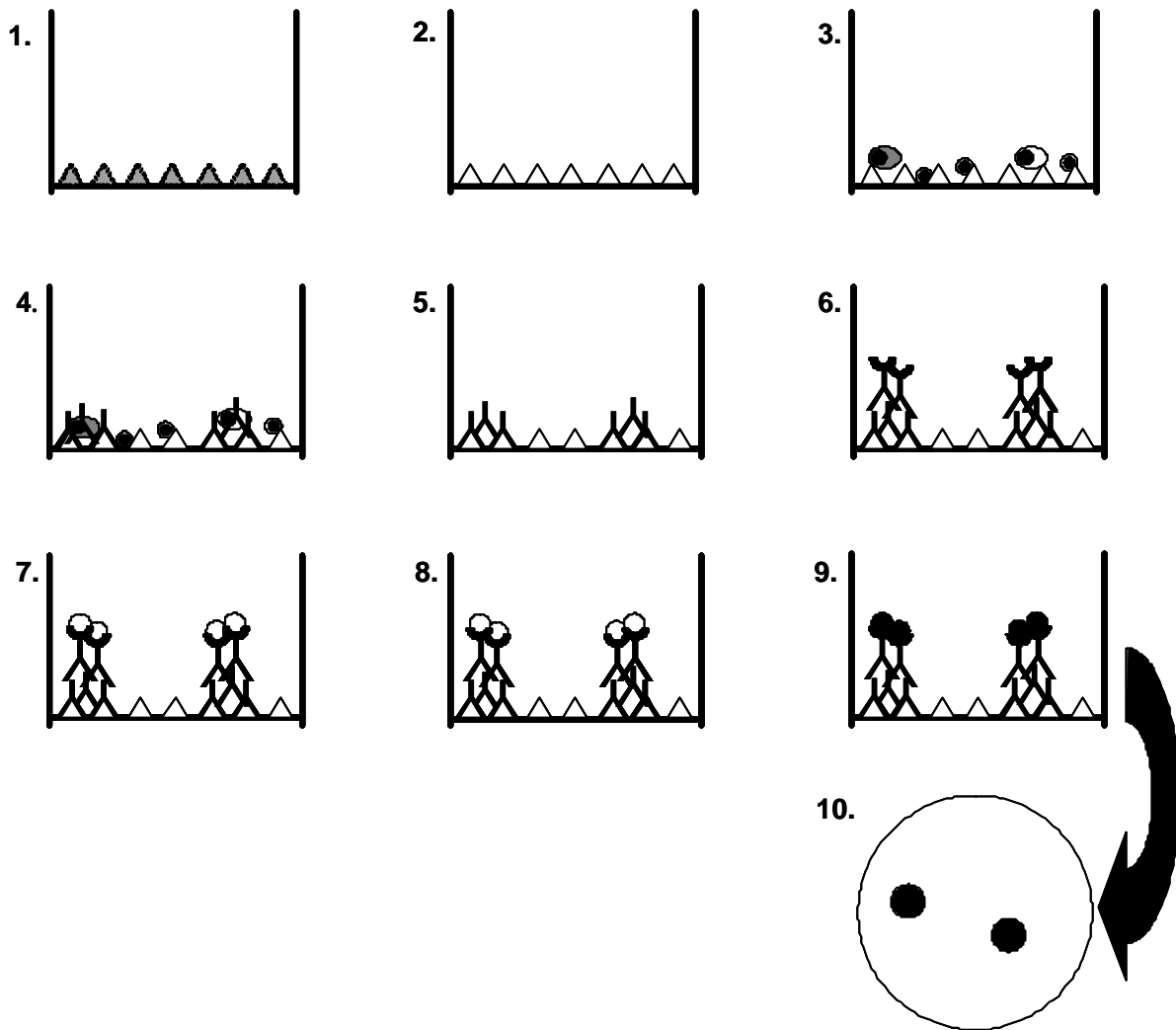


Abbildung 2: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte bei einem ELISPOT.

Einzelheiten sind im Text erläutert.

4.5 Analyse der Chemotaxis

4.5.1 Prinzip der Chemotaxisversuche im Transwell®-System

Dieses System beruht darauf, dass man in einer Zellkulturplatte mittels siebförmiger Einsätze zwei Kompartimente entstehen lässt, die durch eine Membran mit definierter Porengröße voneinander getrennt sind (Abb. 3). Im unteren Kompartiment befindet sich das zu testende Chemokin, im oberen Teil die Zellsuspension. Das Chemokin kann durch die Membran hindurchdiffundieren, es entsteht ein Konzentrationsgradient von der unteren zur oberen Kammer, der nötig ist, damit die Zellen sich gerichtet von der geringeren zur höheren Konzentration des Chemokins bewegen können. Wirkt die Substanz in der unteren Kammer auf die Zellen chemotaktisch, so können diese durch die Membran hindurch migrieren. Die

Porengröße von 5 μm ist dabei so gewählt, dass dieser aktive Vorgang nicht behindert wird, die Zellen andererseits aber auch nicht passiv in das untere Kompartiment fallen können. Die Einsätze werden zuvor mit Fibronectin, das ein Bestandteil der Interzellulärsubstanz ist, beschichtet, um Bedingungen zu erhalten, die denen im Gewebe ähneln. Nach Beendigung der Migration entfernt man die Einsätze und kann die Zellen zur Quantifizierung aus den Zellkulturplatten herauspülen. Um den Anteil der Zellen zu ermitteln, die gegen eine bestimmtes Chemokin migrieren, werden in einer Kontrolle Zellen direkt in das untere Kompartiment gegeben und die Anzahl dieser Zellen gleich 100 % gesetzt. Eine weitere Kontrolle dient der Ermittlung der Basalmigration, hierbei wird in das untere Kompartiment nur Medium ohne zugesetztes Chemokin gegeben.

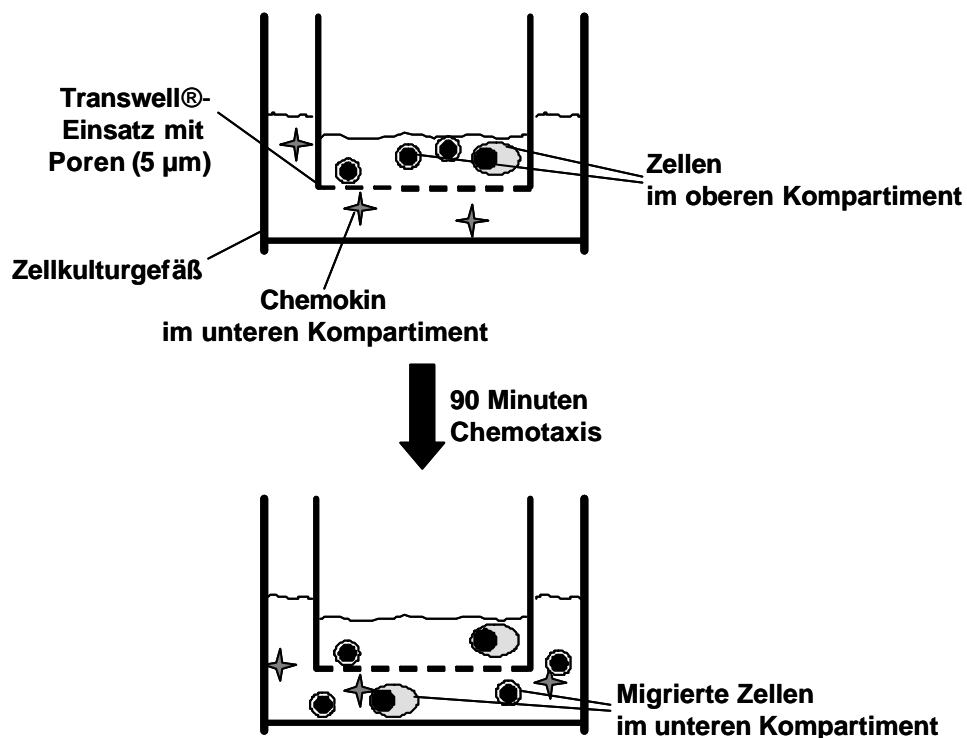


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Chemotaxisversuche im Transwell®-System.

Einzelheiten sind im Text erläutert.

4.5.2 Analyse der Chemotaxis von Ovalbumin-spezifischen IgG-Antikörper sezernierenden Zellen

In dieser Studie wurden zur Ermittlung der Chemotaxis der Antikörper sezernierenden Zellen Zellkulturplatten mit Transwell-Einsätzen bestückt, die dann mit je 50 μl murinem Fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Aqua dest) beschichtet wurden. Nach 1 Stunde Inkubation im Brutschrank bei 37 $^{\circ}\text{C}$ unter Zusatz von 5 % CO_2 wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die

Einsätze wurden bei 37 °C für 2 Stunden trocknen gelassen. Die Chemokine in 600 µl Chemotaxismedium wurden in das untere Kompartiment gefüllt, während in die obere Kammer 100 µl der Zellsuspension gegeben wurden, die zuvor auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt worden war. Es wurde darauf geachtet, daß die Zellen niemals unter Raumtemperatur abkühlten, da sie sonst durch Kälteerigidität des Zytoskeletts die Fähigkeit zur Migration verlieren konnten. Anschließend hatten die Zellen für 90 Minuten im Inkubator bei 37 °C unter Zusatz von 5 % CO₂ die Gelegenheit, zu migrieren. In Vorversuchen hatte sich erwiesen, dass in diesem Zeitraum die größte Ausbeute an migrierten ASC erhalten wurde. Nach dieser Zeit wurden die Einsätze entfernt, die Platten 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, die Zellen in 400 µl ELISPOT-Medium resuspendiert und daraus 300 µl in die erste Reihe der ELISPOT-Platte überführt.

Alle Proben wurden im Falle der Chemotaxisversuche im dreifachen Ansatz getestet. Bei der Analyse von Zellen aus dem Knochenmark am Tag 12 wurden jeweils drei Transwells pro ELISPOT-Ansatz zusammengenommen.

4.6 Durchflusszytometrische Analyse der Ovalbumin-spezifischen Plasmazellen

4.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung von Einzelzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe, Oberflächenbeschaffenheit sowie der Eigenschaft, bestimmte Oberflächenantigene oder auch intrazelluläre Moleküle zu exprimieren. Meist handelt es sich dabei um Proteine. Für die Bezeichnung von Differenzierungsantigenen (cluster of differentiation, CD) auf der Zelloberfläche von Leukozyten gilt die so genannte CD-Nomenklatur als internationales System (4). Um Zellen durchflusszytometrisch zu analysieren, werden diese zunächst mit Antikörpern, die für die jeweiligen Proteine spezifisch sind, inkubiert. Die Antikörper wurden zuvor an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Die Analyse erfolgt, nachdem diese Zellen über ein Schlauchsystem mit Überdruck in den Messbereich geleitet wurden, in dem sie einzeln zwei Laserstrahlen passieren, die von einem 488 nm Argonlaser und einem 635 nm Diodenlaser erzeugt werden. Durch die unterschiedliche Größe und Oberfläche jedes Zelltyps werden die Laserstrahlen unterschiedlich gestreut. Das in einem Winkel von 3-10° gestreute Licht bezeichnet man als Vorwärtsstreulicht (forward scatter FSC, korreliert mit der Zellgröße), während das um 90° reflektierte Licht als Seitwärtsstreulicht gemessen wird (sideward scatter SSC, korreliert mit der Granularität und der Membranfaltung). Der Laserstrahl regt außerdem die Fluorochrome

auf der Zelloberfläche zur Emission von Licht unterschiedlicher Wellenlängen an. Durch Spiegel- und Filtersysteme werden die Streulicht- und Fluoreszenzsignale auf verschiedene empfindliche Lichtsensoren (Photoverstärkerröhren) geleitet und dadurch nach Winkel und Wellenlänge getrennt. In der Regel stehen Sensoren für 530 nm (Fluoreszenzkanal FL-1, Messung der Emission von Fluoreszeinisothiocyanat [FITC]), 585 nm (Fluoreszenzkanal FL-2, Detektion der Emission von R-Phycoerythrin [PE]), 650 nm (FL-3, Messung der Emission von Propidiumiodid [PI], 7- Amino-actinomycin D [7-AAD] oder Peridin Chlorophyll Protein [PerCP]), sowie 661 nm (Fluoreszenzkanal FL-4, Detektion der Emission von Allophycocyanin [APhC] oder Indodicarbocyanin [Cy5]) zur Verfügung. FSC- und SSC-Signale werden mit linearer und Fluoreszenz-Signale mit logarithmischer Verstärkung detektiert. Die zum Teil überlappenden Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe wurden in den Experimenten dieser Studie mittels Anpassung der Detektoren für Mehrfachfärbungen kompensiert. Die beschriebenen Parameter werden von jeder Zelle gemessen, über einen angeschlossenen Computer verarbeitet und lassen sich mittels spezieller Software auswerten. Dabei werden die Parameter gegeneinander in zweidimensionalen Punktfeld-Analysegraphen aufgetragen. Es ist somit möglich, Aussagen über die Frequenzen zu treffen, mit der die Parameter innerhalb der analysierten Zellen vorkommen. Für die Analyse der hier gezeigten Daten wurde CellQuest™ Research Software (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet, gemessen wurde am FACS-Calibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg).

A

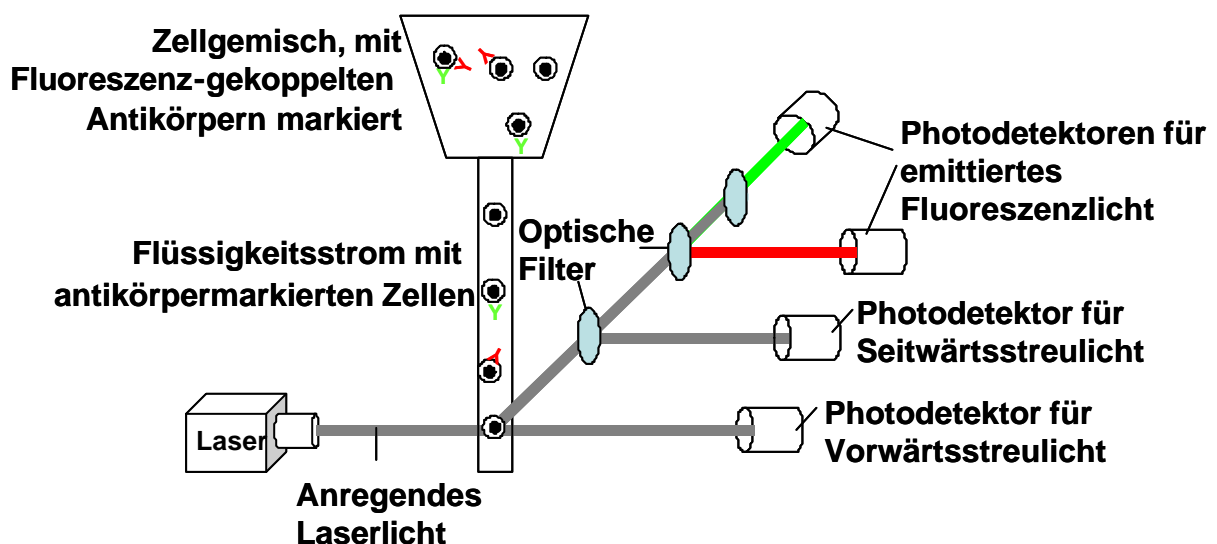


Abbildung 4A: Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Durchflusszytometers (nach (4), verändert)

Einzelheiten sind im Text erläutert.

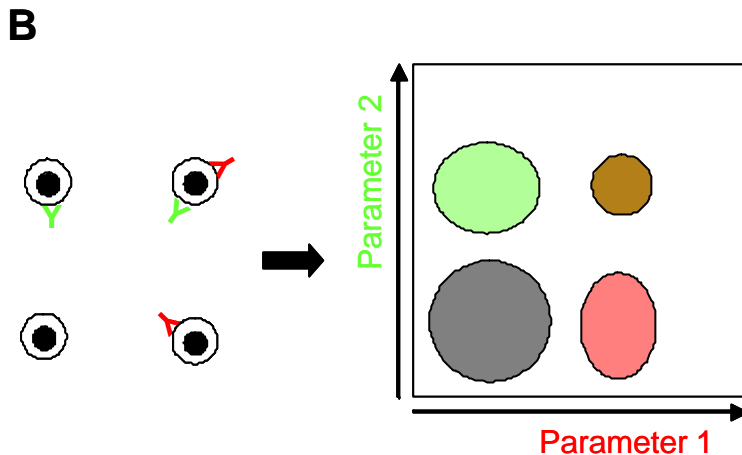


Abbildung 4B: Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse von Zellen im zweidimensionalen Punktfeld-Analysegraphen.

Je nachdem, ob eine Zelle positiv für Parameter 1, Parameter 2 oder für beide ist, erscheint sie als Einzelpunkt im rechten unteren (rot dargestellt), linken oberen (grün dargestellt) oder rechten oberen Bereich (rot-grün) des Graphen. Mehrere Zellen zusammen ergeben dann die hier dargestellten Punktwolken, die auch als Populationen bezeichnet werden. Die Zellen, die die Punktwolke im linken unteren Bereich bilden (grau), sind für keinen der beiden Parameter positiv.

4.6.2 Färbung von Zelloberflächenmolekülen

Diese Färbungen wurden in PBS/BSA durchgeführt. Färbeantikörper können unspezifisch an niedrig affine Fc-Rezeptoren binden, die auf vielen Zellarten vorhanden sind. Zur Erhöhung der Spezifität der Färbung wurden daher die Fc- γ II (CD16)- und III (CD32)-Rezeptoren mit Anti-CD16 bzw. Anti-CD32 Antikörpern (10 μ g/ml) für 10 Minuten auf Eis blockiert. Zugleich wurde mit Ratten IgG (10 μ g/ml) vorinkubiert, um eine unspezifische Bindung der Färbeantikörper zu minimieren, die aus Zellen von Ratten stammten. Die anschließende Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte im Dunkeln und auf Eis im Volumen von 50-100 μ l in Eppendorf-Zellröhrchen. Die adäquate Konzentration für jeden Antikörper war in Vorversuchen ermittelt worden. Nach 10 min. Färbezeit folgte ein Waschschrift (10 min., 4 °C, 2000 rpm) in PBS/BSA (mindestens zehnfache Menge des Färbevolumens). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in PBS/BSA mit dem Sekundärreagenz aufgenommen und wie zuvor gefärbt bzw. gewaschen. Nach der Aufnahme in PBS/BSA wurden die Zellen zügig im FACS analysiert. Tote Zellen ließen sich mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) detektieren und von der Analyse ausschließen. PI kann bei toten Zellen die Plasmamembran passieren und die DNA anfärben.

4.6.3 Intrazelluläre Färbung fixierter Zellen

Durch die Behandlung mit Paraformaldehyd wurden die Zellen fixiert und ließen sich dann mit Hilfe des Detergens Saponin permeabilisieren, so dass intrazelluläre Bestandteile

angefärbt werden konnten. Zur Fixierung wurden die Zellen zweimal in 10 ml PBS/BSA gewaschen (10 min, 4 °C, 1200 rpm), in 5-10 ml PBS/2 % Formaldehyd resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen in PBS und ein weiterer Waschschrift in PBS/BSA. Die Zellen wurden in Saponin-Färbelösung zur Permeabilisierung resuspendiert und darin mit den entsprechenden Antikörpern 10 min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach einmaligem Waschen in Saponin-Waschlösung erfolgte die Färbung mit den Sekundärreagenzien. Darauf wurde wiederum mit der Saponin-Waschlösung und ein zweites Mal mit PBS/BSA gewaschen und die Zellen zur Analyse in PBS/BSA aufgenommen.

4.7 Analyse der Chemokinexpression im Gewebe mittels quantitativer Polymerase-Kettenreaktion

4.7.1 Prinzip der quantitativen Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion mit Hybridisierungssonden

Die Echtzeit (Real-Time, RT)-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein hochempfindliches System zur quantitativen Analyse der Expression von Genen. Sie beruht auf dem Prinzip einer klassischen PCR, bei der selektiv bestimmte DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Dabei erfolgt die Neusynthese der zwischen zwei synthetischen Oligonukleotiden gelegenen DNA-Sequenzen mittels DNA-Polymerase. Durch die exponentielle Anreicherung der DNA-Abschnitte können sie nach mehrmaliger, zyklischer Wiederholung des Vorgangs sichtbar gemacht werden. Die Reaktion geschieht temperaturabhängig und mit thermostabilen Enzymen. Im Falle des hier verwendeten Lightcyclers® (Roche, Mannheim) läuft sie in Borosilikat-Glaskapillaren ab, die sehr schnell erwärmt und abgekühlt werden können (20 °C/Sekunde). Daher kann ein Lightcycler® (LC)-Lauf mit 30-40 Zyklen innerhalb von 20-30 Minuten durchgeführt werden. Die Amplifikation des PCR-Produktes kann in Echtzeit vom Experimentator über einen angeschlossenen Computer verfolgt werden, da während jedem Zyklus Informationen über den Amplifikationsgrad aufgenommen werden. Zu dem Reaktionsgemisch werden modifizierte Oligonukleotide, so genannte Hybridisierungssonden, gegeben, die spezifisch für das Amplikon sind. Während ihrer Hybridisierung an die Ziel-Sequenz werden sie in räumliche Nähe gebracht, wodurch fluoreszentes Licht einer bestimmten Wellenlänge nach folgendem Prinzip emittiert wird: eine der Sonden ist an ihrem 3'-Ende mit dem Donorfarbstoff Fluoreszein markiert, welcher durch blaues Licht angeregt wird und grünes Licht emittiert. Hybridisiert die zweite Sonde nahe der ersten auf dem Amplikon (mit 1-5 Nukleotiden Abstand), so wird an ihrem 5'-Ende das Akzeptorfluorophor

LC Red 640 angeregt und emittiert rot fluoreszierendes Licht. Eine optische Einheit im LC misst dessen Intensität bei 640 nm. Der Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren wird Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) genannt und beruht auf einer hochspezifischen Bindung der Sonden an die Zielsequenz. Während der Denaturierungsphase der PCR befinden sich die Sonden frei in der Lösung, es ist keine Fluoreszenz bei 640 nm messbar. In der Annealing-Phase hybridisieren die Sonden an die DNA, und die Fluoreszenz erreicht im Bereich von 640 nm ihr Maximum, wobei sie von einer optischen Einheit gemessen wird (Abb. 5B). Die gemessene Fluoreszenz verhält sich direkt proportional zur Menge des während der PCR entstandenen Amplikons. In der nun folgenden Elongationsphase steigt die Temperatur, was eine Ablösung der Hybridisierungssonden bewirkt. Am Ende dieser Phase ist das PCR-Produkt doppelsträngig und die Sonden befinden sich frei in Lösung, so dass sie zu weit voneinander entfernt sind, um den Energietransfer (FRET) aufrechtzuerhalten (Abb. 5A). Die während eines jeden Zyklus detektierte Fluoreszenz wird mit der LC-Software ausgewertet und gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die Stärke der Fluoreszenz verhält sich dabei direkt proportional zur Menge des während der PCR entstandenen Produkts. Anfangs sind die Fluoreszenzsignale schwach und können nicht von der Hintergrundfluoreszenz unterschieden werden. Mittels einer solchen Darstellung ist es möglich zu verfolgen, in welchem Zyklus die Fluoreszenz detektierbar wird und die PCR-Reaktion in die Phase der logarithmischen Vermehrung der Amplikons tritt. Die Lightcycler®-Software gibt diesen Zeitpunkt als Crossing Point (cp) an, er dient als Grundlage zum relativen Vergleich der Proben: Enthält eine Probe verhältnismäßig viel spezifische cDNA eines analysierten Zielgenes, so tritt sie schon in einem früheren Zyklus in die logarithmische Phase ein als bei einer Probe mit wenig Ausgangsmaterial.

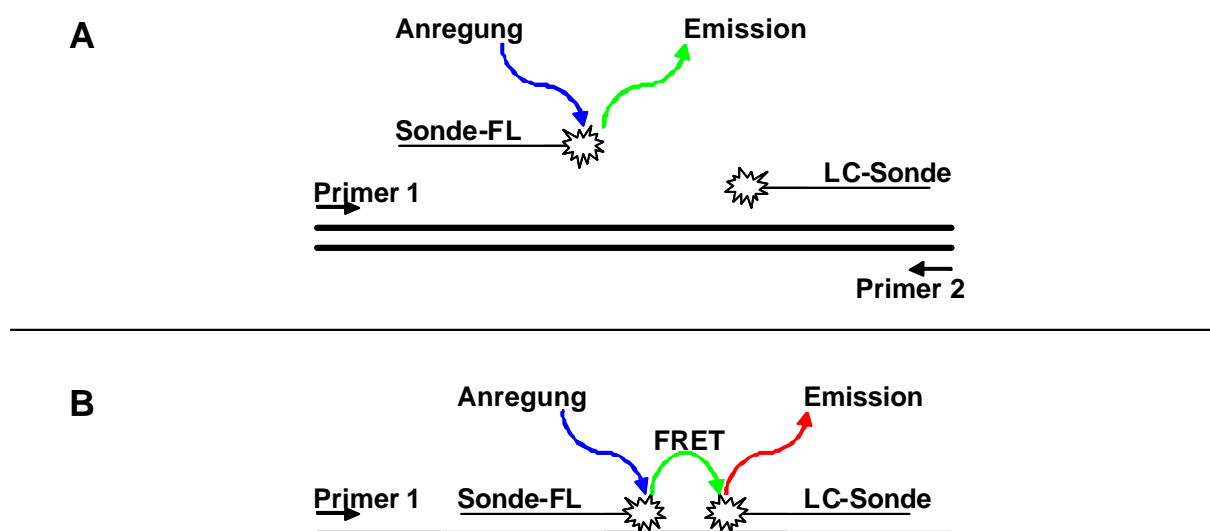


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prinzips der Hybridisierungssonden bei der LC-PCR
Einzelheiten sind im Text erläutert.

4.7.2 Durchführung einer quantitativen PCR zum relativen Vergleich der Expression von CXCL10

Präparation der mRNA

Ist ein bestimmtes Gen aktiv, so ist seine Transkription verstärkt und es kann eine erhöhte Menge der spezifischen messenger RNA (mRNA) nachgewiesen werden. Um quantitative Aussagen über die Chemokinexpression in verschiedenen Gewebeproben treffen zu können, musste zunächst die Gesamt-RNA präpariert werden. Anschließend wurde daraus die mRNA isoliert. Diese Schritte wurden unter Verwendung von RNeasy Midi Kits™ und Oligotex™-Kits durchgeführt, die alle benötigten Reagenzien enthielten. Zuvor war das Gewebe mit Hilfe eines Rotor-Stator-Homogenisators in Lysis-Puffer homogenisiert worden. Dieser besitzt denaturierende Eigenschaften zur Inaktivierung der RNAsen. Alle weiteren Schritte wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

Präparation der cDNA

Für die PCR wurde cDNA eingesetzt, die aus der isolierten mRNA mittels reverser Transkription präpariert wurde. Dieser Vorgang wurde mit der reversen Transkriptase SuperScript II (Gibco BRL) unter Verwendung des mitgelieferten Transkriptionspuffers (5x First Strand Buffer) und DTT nach Herstellerangaben durchgeführt.

Detektion des Referenzgens

Die Detektion der Expression des Haushaltsgens β -Actin diente dazu, die einzelnen Proben auf eine gemeinsame Referenzgröße zu normalisieren. Hierfür wurde folgender PCR-Ansatz gewählt:

Einfacher Ansatz:

5 μ l cDNA (1:10 vorverdünnt)

2 μ l 10x PCR-Puffer

3,6 μ l $MgCl_2$

1 μ l Primer up (Sequenz siehe unter 4.1.7)

1 μ l Primer down (Sequenz siehe unter 4.1.7)

1 μ l Sonde FL (Sequenz siehe unter 4.1.7)

1 μ l Sonde LC (Sequenz siehe unter 4.1.7)

1 μ l dNTPs

0,4 μ l BSA

0,5 μ l Taq Polymerase

ad 15 μ l Aqua bidest

Das PCR-Programm für den LC wurde folgendermaßen eingestellt:

95 °C für 60 Sekunden (Denaturierung)
95 °C für 1 Sekunde (Denaturierung)
60 °C für 10 Sekunden (Annealing)
72 °C für 15 Sekunden (Elongation)
40 °C für 30 Sekunden (Abkühlung)

} 35 Zyklen

Detektion des Zielgens

Der PCR-Ansatz zu Analyse von CXCL10 im LC wurde folgendermaßen gewählt:

Einfacher Ansatz:

2 µl 10x PCR-Puffer

4 µl MgCl₂

1 µl Primer up (Sequenz siehe unter 4.1.7)

1 µl Primer down (Sequenz siehe unter 4.1.7)

1 µl Sonde FL (Sequenz siehe unter 4.1.7)

1 µl Sonde LC (Sequenz siehe unter 4.1.7)

1 µl dNTPs

0,4 µl BSA

0,5 µl Taq Polymerase

ad 20 µl zu unterschiedlichen Anteilen cDNA und Aqua bidest, um eine adäquate Verdünnung der einzelnen Proben zu erhalten.

Das PCR-Programm für den LC wurde folgendermaßen eingestellt:

95 °C für 60 Sekunden (Denaturierung)
95 °C für 1 Sekunde (Denaturierung)
62 °C für 10 Sekunden (Annealing)
72 °C für 15 Sekunden (Elongation)
40 °C für 30 Sekunden (Abkühlung)

} 50 Zyklen

Bestimmung der Amplifikationseffizienz

Zur relativen Quantifizierung war in Vorversuchen die Amplifikationseffizienz für CXCL10 bestimmt worden. Dieser Wert gibt an, wie stark ein Amplikon innerhalb eines Zyklus vermehrt wird. Man kann ihn ermitteln, indem man die Expression des Gens in definierten Verdünnungsstufen derselben Probe misst. Er lag für CXCL10 bei 2,18. Potenziert man die Amplifikationseffizienz E mit den Differenzen der Crossing Points (Δcp) eines Gens in verschiedenen Proben, so kann man daraus die relativen Unterschiede in der Expression berechnen.

4.8 Graphische Darstellung und Statistik

Die in dieser Arbeit enthaltenen Graphen wurden mit dem Programm GraphPad Prism erstellt. Bei der statistischen Analyse wirkte Frau Dörte Huscher (DRFZ) mit, die auch die Beratung für die Darstellung der Ergebnisse übernahm. Bei der Auswertung der Transfer-Experimente wurde mit Hilfe des Programmes SPSS 11.0 ein Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Wenn $p < 0,05$ war, wurden Unterschiede als signifikant angesehen.