

II. Material und Methoden

II.1. Blutspender

Es wurden 3 Gruppen von Blutspendern untersucht:

9 HLA B27-negative Kontrollpersonen, Durchschnittsalter 36 Jahre, M/F 5/4

7 HLA B27-positive Kontrollpersonen, Durchschnittsalter 46 Jahre, M/F 1/6

13 HLA B27-positive AS- Patienten, Durchschnittsalter 38 Jahre, M/F 9/4

Alle Patienten wurden in der Medizinischen Klinik der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin behandelt und erfüllten die 1984 aufgestellten Krankheitskriterien (71) mit einem BASDAI-Krankheitsaktivitätsindex von >3 (72). Keiner der in die Studie eingeschlossenen Patienten erhielt Immunsuppressiva oder Kortikoide.

II.2. Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut

Periphere mononukleäre Zellen (PBMCs= B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können mit Hilfe von Ficoll-Paque durch eine isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Zur Gewinnung von PBMCs wurden jeweils 50ml peripheres Blut verwendet. Das Blut wurde mit PBS/BSA verdünnt, in 50ml Schraubdeckelröhrchen überführt und 20 Min. bei 800g ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurde die Interphase, in welcher sich die Leukozyten befinden, abgenommen, in ein neues Röhrchen pipettiert, auf ca. 35ml mit PBS/BSA aufgefüllt und auf vorher auf 20°C erwärmten Ficoll geschichtet. Ficoll ist ein ungeladenes Saccharose-polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten sich in der Interphase ansammeln. Nach Zentrifugation (20°C, 800g, 20 Min) wurde die Interphase abgenommen und

dreimal mit PBS/BSA gewaschen. Die Zellen wurden in 950µl PBS/BSA resuspendiert und nach Zugabe von 50µl Beriglobin (=hochkonzentriertes humanes Immunglobulin, zur Absättigung von F_c-Rezeptoren) in 400µl und 600µl zur Separation von CD4⁺ bzw. CD8⁺-Zellen aufgeteilt.

II.3. Isolierung von CD4⁺/ CD8⁺ T-Zellen durch MACS

Zur Isolierung der CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen wurde das magnetische Zelltrennungssystem MACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet (73). Die Zellen werden bei diesem System mit an monoklonalen Antikörpern gebundenen superparamagnetischen Mikropartikeln beladen. Die Aufreinigung erfolgt in einem Hochgradienten-Magnetfeld, das durch Insertion einer aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehenden Säulenmatrix in das Magnetfeld eines Permanentmagneten erzeugt wird. Die Probe wird auf die Säule gegeben, läuft durch das Magnetfeld und dann wird mit PBS/BSA mehrere Male nachgespült. Antikörper-bindende und somit magnetische Zellen werden im Magnetfeld festgehalten und können, nachdem die Säule wieder aus dem Magnetfeld genommen wird, mit Puffer lebend herausgespült werden. Das MACS-System kann zur Anreicherung (Sortierung) oder zum Ausschluss (Depletion) einer Zellpopulation aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Zur Kontrolle der Separation werden Originalfraktion, negative und positive Fraktion anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Folgende Reagenzien und Materialien wurden von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) zur Verfügung gestellt:

CD4 MultiSort MicroBeads, CD8 MultiSort MicroBeads, LS+ Säulen, VS+ Säulen, Release-Reagenz, Stop-Reagenz

II.3.1. Die T-Zell Separation

Die Separation der Zellen wurde folgendermaßen durchgeführt: nach Zugabe der CD4 (50 µl) bzw. CD8 (75 µl) Multisortbeads, folgte eine 20minütige Inkubation im

Kühlschrank. Danach wurde die Zellsuspension einmal in PBS/BSA gewaschen, und dann in 500 μ l PBS/BSA aufgenommen.

Davon wurden zuerst 250 μ l durch eine im Magnetfeld stehende MACS- Säule gegeben, nach 3-maligem Spülen mit 1ml PBS/BSA wurden die restlichen 250 μ l auf die Säule gegeben und wieder 3-mal gespült.

Anschließend wurde die Säule mit 1ml PBS/BSA eluiert, und das Eluat wie oben beschrieben über eine weitere Säule gegeben, um eine größere Reinheit zu erzielen.

Der Erfolg der magnetischen Zellseparation wurde durch die Färbung einer kleinen Probe des Eluats überprüft.

Als Grenze wurde eine Reinheit von mindestens 98% festgelegt, bei Nichterreichen dieses Ziels wurde die Probe entweder über eine weitere Säule gegeben, bei zu vielen CD4/8 doppelpositiven Zellen eine Depletion durchgeführt oder die Probe verworfen.

II.3.2. Depletion

Die Bindung der CD4 bzw. CD8 Antikörper an die ferromagnetischen Partikel wurde durch Zugabe von Release-Reagenz enzymatisch gespalten. Nach 10min wurde durch Zugabe eines Überschusses an Substrat für das Release-Reagenz dessen enzymatische Aktivität gestoppt. Anschließend konnten bei Sortierung von z. B. CD4 Zellen CD8 ferromagnetische Partikel zugegeben werden. Nach den üblichen Waschsritten wurde die Probe ein weiteres mal über eine Säule gegeben, um CD4/CD8 doppelpositive oder unspezifisch gebundene Zellen in der Säule zu halten. Bei der Depletion wurden dann im Gegensatz zur Separation nicht die in der Säulenmatrix gefangenen Zellen weiterverwendet, sondern jene, die mit dem Spülpuffer eluiert werden.

Anschließend wurde die Reinheit durch eine weitere Färbung überprüft.

Die Zellen wurden anschliessend in einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ pro ml Medium in 24 Lochplattenkulturschalen überführt und über Nacht im Brutschrank aufbewahrt damit sie darauffolgenden Tag polyklonal stimuliert werden konnten (s.u.).

II.4. Zellkulturmedien und -bedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (Gibco BRL, Grand Island, USA), ergänzt durch Zugabe von 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 0,3mg/ml Glutamin und 10 % fötalem Kälberserum (FCS) (PAA, Linz, Österreich).

Alle Zellen wurden mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ pro ml in 24-Loch Zellkulturplatten bei 37°C und 5,5% CO₂ in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Berlin, Deutschland) kultiviert.

II.5. Polyklonale *in vitro* Th- Zell-Stimulation

Zur Stimulation wurden die sortierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 5ng/ml und Ionomycin, 1µg/ml (Sigma, Deisenhofen) über einen Zeitraum von 6h stimuliert. Während der letzten zwei Stunden wurde der Sekretionsinhibitor Brefeldin A, 5µg/ml (Sigma, Deisenhofen) zugegeben, um damit eine Sekretion der Zytokine zu verhindern. PMA simuliert dabei durch eine Aktivierung der Proteinkinase C ein Triggern des T-Zell Rezeptors, während Ionomycin gleichzeitig für einen Calziumeinstrom in die T-Zelle sorgt. Dadurch wird eine maximale Aktivierung jeder T Zelle bewirkt und deren Zytokinprogramm abgerufen. Die Akkumulation der Zytokine im Golgi Vesikel ermöglicht eine spätere Färbung mittels Antikörpern. Anschliessend wurden die Zellen fixiert (s.u.).

II.6. Fixierung von Zellen in Suspension

Die Zellen wurden aus der Zellkulturschale in ein 15ml Röhrchen pipettiert, welches mit PBS aufgefüllt wurde. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 2% Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgenommen und anschliessend 20min bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zuletzt in PBS/BSA/NaN₃ resuspendiert. Bis zur Färbung wurden die Zellen bei 4°C aufbewahrt.

II.7. Durchflußzytometrie

Bei der durchflußzytometrischen Analyse werden Zellen anhand ihrer gegebenen Lichtstreuungseigenschaften und emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert. Die Fluoreszenz der Zellen stammt von einer Bindung von Antikörpern, an die vorher ein fluoreszierendes Molekül gebunden wurde, an extra- aber auch intrazellulär exprimierte Antigene. Durch eine Kombination von an verschiedene Fluorochrome gekoppelten Antikörpern können mehrere Parameter analysiert werden. Diese Fluorochrome werden so gewählt, dass sie nach Anregung durch einen Laserstrahl in verschiedenen Wellenlängen Licht emittieren und dadurch detektiert werden kann, ob an die analysierte Zelle ein oder mehrere Antikörper gebunden haben. Als Fluorochrome wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC, FL1), Phycoerythrin (PE, FL2), (PerCP, FL3) und (Cy5, FL4) verwendet.

Die gefärbten Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert einzeln nacheinander einen oder in neueren Geräten auch mehrere Laserstrahlen. Das in einem geringen Winkel (3-10°) gestreute Licht wird als „Vorwärtsstreulicht“ FSC bezeichnet und korreliert mit der Zellgröße. Das um 90° reflektierte Licht wird als „Seitwärtsstreulicht“ (SSC) bezeichnet und hängt ab von der Granularität und der Membranfaltung der Zelle. Neben diesen beiden Parametern stehen für die Messung der emittierten Fluoreszenz in dem hier verwendeten Gerät drei Systeme aus Bandpassfiltern und Photoröhren zur Verfügung für eine emittierte Wellenlänge von 530nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585nm (FL2) und >650nm (FL3). Über einen zweiten Dioden-Laser kann ein weiteres Fluorochrom mit einer anderen Wellenlänge angeregt werden (FL4, 670nm Filter). Hiermit ist trotz einer großen Zellzahl eine schnelle, sowohl quantitativ als auch qualitativ 6 Parameter umfassende Analyse auf Einzelzellebene möglich. Diese ermöglicht, im Gegensatz zum ELISA, Koproduktion von Zytokinen einzelnen Zellen zuzuordnen.

Für die durchflußzytometrische Analyse wurde ein FACS-Calibur (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit einem luftgekühlten Argonlaser und einem zweiten, roten Dioden-Laser verwendet. FSC- und SSC-Signale wurden mit linearer, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Von jeder Probe wurden die Daten von mindestens 100000 Zellen aufgenommen und die Analyse erfolgte mit CellQuest Research Software (Becton-Dickinson,

Heidelberg, Deutschland). Die Daten wurden entweder als eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale "Punkt-Bilder" (dot-plots) dargestellt und analysiert. Durch das Setzen von Analysefenstern konnten funktionell unterscheidbare Zellpopulationen aufgrund ihrer spezifischen Expression von Oberflächenmarkern unterschieden und ihre Zytokinproduktion selektiv analysiert werden.

II.8. Antikörperfärbungen

Für die Färbung der Oberflächenmoleküle CD27 und CD45RA wurden die Zellen mit Phycoerythrin (PE) oder Cy5 gekoppeltem anti-huCD27 und Biotin-gekoppeltem anti-huCD45RA für 10min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit an PerCP gekoppeltem Streptavidin, das an Biotin bindet, inkubiert, in 0.5%igem Saponin (Sigma, St Louis, MO) gewaschen und dadurch permeabilisiert, was nötig ist, um eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchzuführen. Jetzt wurden die Zellen mit anti-Zytokinantikörpern, IFN γ zusammen mit IL-4, bzw. TNF α mit IL-10, für 10min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Antikörper-Überschuss wieder mit Saponin herausgewaschen, die Zellen wurden herunterzentrifugiert, in ca. 400 μ l PBS/BSA/Azid resuspendiert und an einem FACS-Calibur Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen. Die folgenden monoklonalen Antikörper wurden benutzt: anti-huCD27-PE bzw.-Cy5 (Klon 2E4, eine Gabe von R. van Lier, Amsterdam, Niederlande), anti-huCD45RA-Biotin (Klon L48, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), anti-huIFN γ -Cy5 bzw. -FITC (Klon4SB3, Institutseigen), anti-huIL-4-PE (Klon 4D9, Hölzel Diagnostica, Köln, Deutschland), anti-huIL-10-PE bzw. -Cy5 (Klon JES3-19F1, Pharmingen, San Diego, USA) und anti-huTNF α -FITC (Klon 1D12, Hölzel Diagnostica, Köln, Deutschland). Anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD27 und CD45RA wurden CD4 $^+$ T-Zellen in CD45RA $^+$ CD27 $^+$ "naive CD4 $^+$ ", CD45RA $^-$ CD27 $^+$ "Gedächtnis CD4 $^+$ " und CD45RA $^-$ CD27 $^-$ "differenzierte Gedächtnis CD4 $^+$ " T-Zellen eingeteilt. Dementsprechend wurden bei CD8 $^+$ T-Zellen CD45RA $^+$ CD27 $^+$ "naive CD8 $^+$ ", CD45RA $^-$ CD27 $^+$ "Gedächtnis CD8 $^+$ " und CD45RA $^+$ CD27 $^-$ "Effektor CD8 $^+$ " T-Zellen unterschieden, und diese Subpopulationen werden weiterhin so benannt werden.

II.9. Statistische Analysen

Zum Vergleich der Zytokinproduktion HLA B27-positiver und -negativer Personen wurde der Mann Whitney U Test für unverbundene Stichproben angewandt. Dieser nicht-parametrische Test wurde benutzt, da die Zahl der Stichproben nicht die Annahme einer Normalverteilung erlaubt.

Zur Berechnung der Korrelationskoeffizienten wurde der ermittelte Prozentsatz an IFN γ and IL-4 koexprimierenden Zellen mit dem für ein zufälliges Zusammentreffen von 2 unabhängigen Variablen errechneten Wert verglichen. Die eigentliche Korrelation der Zytokinkoexpression wurde anhand des Tests für ϕ -Korrelationskoeffizienten berechnet (74).

Die ϕ -Korrelationskoeffizienten in den Gedächtnis CD4⁺ T Zell Untergruppen und Zytokinexpression in den CD4⁺ und CD8⁺ T Zell Subpopulationen wurden durch den Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verglichen.

Als statistisches Analyseprogramm wurde SPSS- Software benutzt (SPSS Inc, Chicago Illinois). Als statistisch signifikant wurden p-Werte von $p \leq 0,05$ angesehen.