

4 Material und Methoden

Zur besseren Übersicht werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien tabellarisch der Beschreibung der einzelnen Methoden vorangestellt. Sie werden in den entsprechenden Methoden jedoch nochmals aufgegriffen.

4.1 Übersicht über die verwendeten Materialien

4.1.1 Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Herkunft
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	137 mM NaCl	Roth, Karlsruhe, D
	2,7 mM KCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	8,1 mM Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PBS mit Bovinem Serum-Albumin (PBS/BSA)	PBS	
	0,5 % BSA	Biomol, Hamburg, D
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium 1640	Life Technologies, Paisley, GB
RPMI Plus	RPMI	
	10 mM L-Glutamat	Invitrogen, Carlsbad, USA
	10 % Fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
	20 µM β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Carlsbad, USA
	100 U/l Penicillin	Invitrogen, Carlsbad, USA
	100 µg/ml Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
RPMI Plus + Gentamicin	RPMI Plus	
	100 µg/ml Gentamicin	PAA Biomedicals, Linz, A
Chemotaxismedium	RPMI	
	0,5 % BSA (endotoxinarm)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
ELISPOT Blockierungspuffer	PBS	
	3 % BSA	Biomol, Hamburg, D
ELISPOT Waschpuffer	PBS	
	3 % BSA	Biomol, Hamburg, D
	0,01 % Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

AMP-Puffer	95 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	0,1 ml Triton X-405	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	150 mg/ml MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
	900 ml Wasser	
	pH 10,25 eingestellt mit HCl	

4.1.2 Material für zellbiologisches Arbeiten

Bezeichnung	Herkunft
Glasflaschen 0,2 l, 0,5 l, 1,0 l	Schott, Mainz, D
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Zellröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, A
FACS Röhrchen	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Pipetten	Corning Costar, Corning, NY
Spritzen	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, D
heparinisierte Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kanülen	Braun, Melsungen, D
Pipettenspitzen	Corning Costar, Corning, NY
Rotilabo [®] -Spritzenfilter (0,2 µm)	Roth, Karlsruhe, D
Zellsiebe (70 µm)	BD, Le Point De Claix, F
Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner bio-one, Kremsmünster, A
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Corning Costar, Corning, NY
Zellkulturplatte 6-, 12-, 24-, 48-, 96-er Platten	Greiner bio-one, Kremsmünster, A
96-er Mikrotiterplatten (flachbodig und hochbindend)	Corning Costar, Corning, NY

4.1.3 Reagenzien für die Zellisolierung

Bezeichnung	Herkunft
Ficoll-Hypaque TM PLUS	Amersham Biosciences, Uppsala, S
Kollagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Collagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
DNase I	Roche Diagnostics, Mannheim, D

4.1.4 Reagenzien für die durchflusszytometrische Analyse

Bezeichnung (Klon)	Gebrauchsverdünnung	Herkunft
CD19-Biotin (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, Heidelberg (HD), D
CD19-APC (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
CD19-PE (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
CD19-FITC (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
CD19-FITC (BU 12) (anti- Mensch) (0,54 mg/ml)	1:20	Deutsches Rheumaforschungszentrum (DRFZ), Berlin, D
CXCR3-PE (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
CXCR3-APC (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
CXCR4-PE (anti- Mensch) ^q	1:50	BD Pharmingen, HD, D
CXCR4-APC (anti- Mensch) ^q	1:50	BD Pharmingen, HD, D
CD20-FITC (anti- Mensch) ^q	1:50	BD Pharmingen, HD, D
CD27-FITC (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
CD27-PE (2 E 4) (anti- Mensch) (0,83 mg/ml)	1:100	DRFZ, Berlin, D
CD38-APC (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
IgD-FITC (anti- Mensch) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
IgG1-FITC (IDC-1) (anti- Mensch) (0,44 mg/ml)	1:20	DRFZ, Berlin, D
IgG1-Biotin (IDC-1) (anti- Mensch) (0,48mg/ml)	1:20	DRFZ, Berlin, D
IgG2-Biotin (G18-21) (anti- Mensch) (0,62 mg/ml)	1:20	DRFZ, Berlin, D
IgG3-Biotin (G18-3) (anti-Mensch) (0,59 mg/ml)	1:20	DRFZ, Berlin, D
IgA-FITC (anti-Mensch) ^q	1:50	Cymbus Biotechnology, Hampshire, UK
IgM-FITC (anti-Mensch) ^q	1:50	BD Pharmingen, HD, D
CD40L-PE (anti-Maus) ^q	1:20	BD Pharmingen, HD, D
Streptavidin-PerCP (SA-PerCP) (0,2 mg/ml)	1:200	BD Pharmingen, HD, D

4', 6-diamino-2-phenylindole, ~ 0,22 µM dilactate (DAPI)		Molecular Probes, Eugene, USA
Propidiumjodid (PJ)	0,6 ng/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
5-(and-6)- carboxyfluoresceindiacetate, succinimidyl ester (5(6)- CFDA,SE;CFSE) (CFDA-SE)	5 mmol/ml	Molecular Probes, Eugene, USA

^a über die Konzentrationen der kommerziell erworbenen Antikörper kann keine Aussage gemacht werden, da diese in der Packungsbeilage nicht angegeben wurde.

4.1.5 Reagenzien für die B-Zellstimulation

Bezeichnung	Herkunft
CD19 Multisort Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
FITC Multisort Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Pan T Zell Isolations Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Monozyten Isolations Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Preseparations Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
BS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Midi MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Vario MACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Rekombinantes IL-1β	R&D Minneapolis, MN
Rekombinantes IL-2	AMS Biotechnology GmbH; Wiesbaden, D
Rekombinantes IL-3	R&D Minneapolis, MN
Rekombinantes IL-4	AMS Biotechnology GmbH; Wiesbaden, D
Rekombinantes IL-6	R&D Minneapolis, MN
Rekombinantes IL-10	AMS Biotechnology GmbH; Wiesbaden, D
Rekombinantes TNF-α	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Rekombinantes IFN-γ	R&D Minneapolis, MN
Rekombinantes IFN-αA	PBL Piscataway, NJ
Rekombinantes IFN-β1a	PBL Piscataway, NJ

Rekombinantes TGF- β	R&D Minneapolis, MN
CpG 2006	TibmolBiol, Berlin, D
PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PHA-L (Lektin von <i>Phaseolus vulgaris</i> (Leukoagglutinin))	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tetanus-Toxoid	Chiron Behring, Marburg, D
<i>Staphylococcus aureus</i> Cowan I, Pansorbin	Calbiochem, San Diego, CA
Cells	

Die konstitutiv CD40-Ligand ausprägende T-Zelllinie EL4B5 wurde freundlicherweise von R. Zubler, Genf, Schweiz zur Verfügung gestellt. Um die Proliferation zu unterdrücken, wurden die Zellen vor der Stimulation radioaktiv mit einer Dosis von 50 Gy bestrahlt. Hierzu wurde die Gammabestrahlungsanlage Modell Biobeam 2000 (STS Steuerungsschutz & Strahlenschutz GmbH, Braunschweig, D) verwendet.

4.1.6 Reagenzien für die Chemotaxisversuche

Bezeichnung	Herkunft
Rekombinantes CXCL9	R&D Minneapolis, MN
Rekombinantes CXCL12	R&D Minneapolis, MN
Fibronektin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Transwell®-Einsätze und 24-er Zellkulturplatten (5 μ m Porengröße und 6,5 mm Durchmesser)	Corning Costar, Corning, NY

4.1.7 ELISpot-Reagenzien

Bezeichnung	Herkunft
<i>Detektionsantikörper</i>	
Ziege-anti-Human IgG (polyklonal)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ziege-anti-Human IgM (polyklonal)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ziege-anti-Human IgA (polyklonal)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ziege-anti-Human IgG-Biotin (polyklonal)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ziege-anti-Human IgM-Biotin (polyklonal)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

Ziege-anti-Human IgA-Biotin (polyklonal) <i>Sekundärreagenz</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Streptavidin-Alkalische Phosphatase <i>Substrat</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, D
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP) <i>Trägersubstanz für das Substrat</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Agarose (Typ I, geringe Elektroendoosmose)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

4.1.8 Herkunft der Zellen

Die Blutzellen wurden aus Filtern des Blutspendedienstes des Instituts für Transfusionsmedizin der Charité Berlin gewonnen. Mit diesen Filtern werden die weißen Blutzellen aus den Blutkonserven entfernt. Die Abgabe der Filter durch das Institut für Transfusionsmedizin wurde durch eine Entscheidung der Ethikkommission vom 25.05.2001 über das Forschungsvorhaben „Identifizierung von Signalen, die die Differenzierung und das Überleben von humanen Plasmazellen regulieren“ autorisiert.

Tonsillen wurden nach deren operativer Entfernung von der Station für Hals-Nasen-Ohren Erkrankungen des St. Gertraudenkrankenhauses Berlin zur Verfügung gestellt.

Knochenmarkzellen wurden aus Oberschenkelköpfen nach deren Entfernung im Zusammenhang mit dem Ersatz durch ein künstliches Hüftgelenk von der Station für Orthopädie der Charité Berlin isoliert.

Abschnitte des Darms wurden nach Darmresektionen von der Chirurgie des Virchow Klinikums Berlin durch Kooperation mit Prof. Dr. V. Krenn zur Verfügung gestellt.

4.2 Isolation mononukleärer Zellen

4.2.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen aus dem Blut

Zur Gewinnung von Zellen aus den Leukozytenfiltern, mussten diese zunächst mittels einer Schere von dem anhängenden Schlauchsystem getrennt werden. Anschließend wurden sie mit einer 20 ml Spritze und einem Volumen von 50 ml kaltem PBS gegen die auf dem Filter gekennzeichnete Pfeilrichtung kräftig gespült.

Nach Blutabnahme von 30-120 ml aus der Armbeugevene freiwilliger Spender in heparinisierte Röhren, wurde das Blut 1:2 mit PBS verdünnt.

Aus dem Blut-PBS-Gemisch wurden die peripheren mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Dazu wurden 15 ml Ficoll (Raumtemperatur) in

ein 50 ml Röhrchen gefüllt und diese dann mit 25 ml Blut vorsichtig überschichtet, so dass es zu keiner Vermischung der beiden Phasen kam. Die anschließende Zentrifugation bei Raumtemperatur, 1800 rpm über 25 min. ohne Bremse, beschleunigte die Auftrennung der Zellen entlang des Dichtegradienten. Während Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten, fanden sich die mononukleären Zellen, Lymphozyten und Monozyten, als abgesetzter weißer Ring an der Phasengrenze zum Ficoll. Nach Abnahme der mononukleären Zellen mit einer Pipette wurden diese zweimal mit 30-50 ml PBS/BSA gewaschen und bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min. zentrifugiert.

4.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen aus der Tonsille

Zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus der frisch entnommenen Tonsille musste diese zuerst mit einem Skalpell grob zerkleinert werden. Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden die Organstückchen in PBS mit dem Stempel einer 20 ml Spritze durch ein Zellsieb gedrückt und anschließend durch ein weiteres Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde dann bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min. zentrifugiert, in 25 ml PBS resuspendiert und auf 15 ml Ficoll aufgeschichtet. Die Gewinnung mononukleärer Zellen erfolgten wie in Punkt 4.2.1 beschrieben.

4.2.3 Herstellung einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen aus dem Knochen

Zur Gewinnung der Knochenmarkszellen aus dem frisch entnommenen Oberschenkelkopf wurde mit einer Kanüle und einer 20 ml Spritze an der Schnittfläche zum Oberschenkelhals das Knochenmark herausgespült. Zum Spülen wurde ein Volumen von ca. 200-300 ml PBS verwendet. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde dann bei 1200 rpm, 4 °C für 10 min. zentrifugiert, in 25 ml PBS resuspendiert und auf 15 ml Ficoll aufgeschichtet. Die Gewinnung mononukleärer Zellen erfolgten wie in Punkt 4.2.1 beschrieben.

4.2.4 Herstellung einer Einzelzellsuspension mononukleärer Zellen aus dem Darm

Die erhaltenen Teile der frisch entnommenen Darmschleimhaut von Colon oder Appendix wurden vorab mit einem Skalpell grob zerkleinert. Um die mononukleären Zellen aus der Schleimhaut zu gewinnen, musste diese mit Kollagenasen verdaut werden. Die Darmteile wurden dazu in 25 ml RPMI 1460 Plus durch die Zugabe von DNase I (1:1000) und je 0,25 mg/ml Kollagenase D und Collagenase bei 37 °C unter Rühren für 60 min. verdaut. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die

Zellsuspension wurde dann bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min. zentrifugiert in 25 ml PBS resuspendiert und auf 15 ml Ficoll aufgeschichtet. Die Gewinnung mononukleärer Zellen erfolgten wie in Punkt 4.2.1 beschrieben.

4.2.5 Zellzahlbestimmung

Im Falle der Zellzahlbestimmung wurden 10 µl einer vorverdünnten Zellsuspension in ein Neubauer-Hämozytometer pipettiert und unter dem Invertmikroskop ausgezählt und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times Vf \times \text{Vol} \times 10^4$$

n = durchschnittliche Zellzahl aus den 4 Großquadranten der Zählkammer

Vf = Faktor der Vorverdünnung

Vol = Volumen in ml, in dem die Zellen resuspendiert wurden

4.3 Durchflusszytometrische Analyse

4.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können einzelne Zellen anhand von Größe, Granularität, intrazellulärer sowie membranständiger Moleküle charakterisiert werden, u.a. über Oberflächenmoleküle, die in der internationalen Nomenklatur unter der Bezeichnung Cluster of differentiation (CD) zusammengefasst werden.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Oberflächenmoleküle mit fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern angefärbt. Je nach Größe, Granularität und Fluoreszenz emittiert die Zelle nach der Anregung durch verschiedene Laser, Licht, welches für jede einzelne Zelle durch spezielle Filter absorbiert wird. Über das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) können Lymphozyten identifiziert werden. Die weitere Charakterisierung erfolgt je nach Emission von Licht einer betreffenden Wellenlänge im zweidimensionalen Punktdiagramm (dot plot) (Abb.1).

Je nach Durchflusszytometer ist mit der Anzahl der Laser die Zahl der einsetzbaren Fluorochrome limitiert. Bei dem hier verwendeten Durchflusszytometer handelte es sich um den Gerätetyp LSR I der Firma Becton Dickinson (Heidelberg). Die Laser dieses Gerätes, deren Detektionsbereich und die zugehörigen Fluorochrome, sind in der folgenden Tabelle (Tab.1) aufgelistet.

Für die Analyse und Auswertung der hier gezeigten Daten wurde CellQuest™ Research Software (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet.

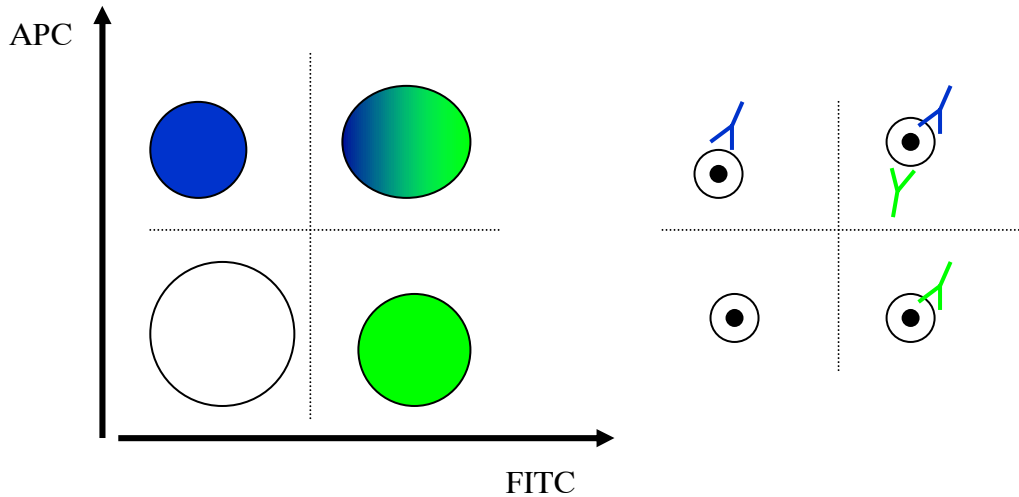


Abb. 1: Schematische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse von Zellen im zweidimensionalen Punktdiagramm (dot plot)

Je nachdem, ob eine Zelle positiv für Parameter 1 (APC), Parameter 2 (FITC), für beide oder für keinen ist, erscheint sie in einem der Quadranten. Mehrere Zellen zusammen ergeben dann sogenannte Punktwolken, man spricht auch von Populationen.

Tab.1: Laser des LSR I der Firma Becton Dickinson

Laser mit Exzitationsfrequenz	angeregtes Fluorochrom (Fluoreszenzkanal)	Detektionsfrequenz
325 nm Helium-Cadmium 8 mW	DAPI	424 nm (FL-4)
633 nm Helium-Neon, 8 mW	APC (Allophycocyanin)	660 nm (FL-5)
488 nm Argonionenlaser, 15 mW	FITC (Fluoreszein)	530 nm (FL-1)
	PE (R-Phycoerythrin)	575 nm (FL-2)
	PerCP (Peridinin Chlorophylloprotein)	682 nm (FL-3)

4.3.2 Darstellung von Oberflächenmolekülen zur durchflusszytometrischen Untersuchung

Die aus dem Organmaterial isolierten Zellen wurden nach der Dichtegradientenzentrifugation mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA gewaschen und bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min. zentrifugiert. Sollten in RPMI 1640 kultivierte Zellen markiert werden, so wurden diese vorher ebenfalls im 10-fachen Volumen PBS/BSA gewaschen und bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min. zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in PBS/BSA aufgenommen, in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und in einem Volumen von 50-100 µl markiert. Für die Färbung wurden die entsprechenden Antikörper in einem vorher ermittelten Verhältnis hinzugegeben (Punkt 4.1.4). In einer sogenannten Titrationsreihe wurde für jeden verwendeten Antikörper die ideale Konzentration ermittelt. Es handelt sich dabei um die geringste Konzentration, die noch eine klare Abgrenzung zu den ungefärbten Zellen erlaubt. Die Zellen wurden für 10 min. bei 4 °C im Kühlschrank markiert. Anschließend wurde mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA gewaschen und bei 2000 rpm, 4 °C für 10 min. zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 50-100 µl verdünntem (PBS/BSA) Sekundärreagenz aufgenommen und - wie oben beschrieben - markiert und gewaschen. Vor der nun folgenden durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen in 450-600 µl PBS/BSA aufgenommen. Unmittelbar vor jeder Analyse wurden 4', 6-diamino-2-phenylindol, dilactate (DAPI) oder Propidiumjodid (PJ) hinzugegeben, um tote Zellen zu detektieren und auszuschließen. Sowohl DAPI als auch PJ können bei Membranschäden in Zellen eindringen und dort mit DNS interkalieren. Wurde in der Analyse ein PerCP markierter Antikörper verwendet, musste für den Ausschluss toter Zellen DAPI verwendet werden, da PJ im gleichen Fluoreszenzkanal wie PerCP gemessen wird. Die Zellen wurden bis unmittelbar vor ihrer Messung auf Eis aufbewahrt.

4.3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung von Zellzyklen

Um die Anzahl vollständiger Zellzyklen durchflusszytometrisch zu bestimmen, wurden die Zellen mit CFDA-SE markiert. Dieses gelangt in die Zelle und bindet kovalent an die Aminogruppen von Proteinen. Mit jeder durchlaufenen Zellteilung reduziert sich die absolute Menge CFDA-SE je Zelle um die Hälfte, indem sie sich auf die beiden Tochterzellen verteilt. Da CFDA-SE an sämtliche Aminogruppen bindet, müssen die Zellen in PBS, frei von FKS oder BSA, sein. Der magnetisch-assoziierten Anreicherung der B-Zellen in PBS/BSA folgte ein zweimaliges Waschen mit dem zehnfachen Volumen PBS. Das CFDA-SE (5 mmol/ml) wurde dann 1:5000 mit PBS verdünnt. Ein ml dieser Lösung wurde dann bei Raumtemperatur

im Dunklen für 3 min. auf 1×10^7 Zellen gegeben. Anschließend wurde mit 10% FKS-haltigen RPMI 1460 Plus gewaschen, um überschüssiges CFDA-SE zu binden. Die Zellen wurden dann in Kultur genommen.

4.4 Zellsortierung

4.4.1 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Das Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) entspricht dem des Durchflusszytometers. Mittels eines Zellsortierers ist es möglich, Zellpopulationen anhand ihrer Fluoreszenz zu trennen.

Die Zellsortierung mononukleärer Zellen anhand bestimmter Oberflächenmoleküle fand am MoFlow (Cytomation, Fort Collins, CO, USA) statt. Die Markierung der Zellen wurde in diesen Fällen in FACS-Röhrchen durchgeführt. Wurden PE markierte Antikörper verwendet, musste die Konzentration des Antikörpers verdoppelt werden, um positive besser von negativen Zellen abgrenzen zu können. Die Steuerung des Gerätes erfolgte mit der Cytomation Summit Software, V3.1 (Cytomation, Fort Collins, CO, USA). Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen oder 15 ml Zellröhrchen sortiert, in die 0,5-1,0 ml PBS oder PBS/BSA vorgelegt wurde.

4.4.2 Magnetisch-assoziierte Zellsortierung (MACS)

Mit der magnetisch-assoziierten Zellsortierung können Zellen, ähnlich der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung, nach Oberflächenmolekülen getrennt werden.

Oberflächenmoleküle von Zellen der Ausgangspopulation, die angereichert oder entfernt werden sollen, werden mit magnetisch markierten Antikörpern detektiert. Die Zellen werden nach Inkubation mit den markierten Antikörpern in einem starken Magnetfeld über ausgewählte Säulen gegeben.

Für die Durchführung der magnetisch-assoziierten Zellsortierung wurden die isolierten Zellen in einer Konzentration von ca. 5×10^8 Zellen/ml in einem Verhältnis von 1:5 mit den magnetisch markierten Antikörpern für 15 min. bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit dem 10-fachen Volumen PBS/BSA und anschließender Zentrifugation (1200 rpm, 4°C für 10 min.) wurden die Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml über eine vorher mit PBS/BSA äquilibrierte Säule gegeben. Sollten die Zellen angereichert werden, wurden LS-Säulen in einem Midi-MACS-Magneten verwendet. Im Fall der Depletion wurden BS-Säulen in einem Vario-MACS-Magneten eingesetzt. Wenn das Säulenreservoir leer war, wurde die Säule zweimal mit je 4 ml PBS/BSA gespült, um verbleibende, nicht markierte Zellen aus der

Säule zu entfernen. Bei einer Depletion befanden sich die nicht markierten Zellen in dem als Auffanggefäß dienenden 15 ml Zellröhrchen; die Säule konnte mit den in ihr verbliebenen Zellen verworfen werden. Bei der Anreicherung befanden sich die weiter zu verarbeitenden Zellen in der Säule. Zur Gewinnung dieser Zellen wurde die LS-Säule aus dem Magnetfeld entnommen und zweimal mit jeweils 5 ml PBS/BSA gefüllt. Dazu wurde das PBS/BSA mit dem zugehörigen Konus kräftig durch die Säule in ein 15 ml Zellröhrchen gedrückt. Die nach einer Depletion bzw. Anreicherung in dem 15 ml Zellröhrchen aufgefangenen Zellen wurden dann bei 1200 rpm und 4 °C für 10 min. zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Zellen in PBS/BSA, PBS oder RPMI 1640 in gewünschter Konzentration aufgenommen und weiterverarbeitet.

4.5 Aktivierung von B-Zellen

4.5.1 Aktivierung von PBMC mit Tetanus-Toxoid

Aus dem Blut bzw. einem Leukozytenfilter isolierte PBMC wurden gezählt und darauf in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 Plus aufgenommen. Das Gesamtvolumen von 10 ml wurde anschließend in zwei Vertiefungen einer 6-Lochplatte verteilt. Zur Aktivierung wurde Tetanus-Toxoid (4300 Letalfaktoren (LF)/ml) in einer Konzentration von 20 LF/ml hinzugegeben. Am dritten sowie am sechsten Tag der Kultur wurden die Zellen aus jeweils einer der Kulturen durch sorgfältiges Spülen mit kaltem PBS/BSA in ein 50 ml Zellröhrchen überführt, mit RPMI 1460 Plus gewaschen und bei 1200 rpm, 4 °C für 10 min. zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl RPMI 1640 Plus aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden dann entsprechend verdünnt und die Zahl der Antikörper-sezernierenden Zellen im ELISpot quantifiziert. Ein Teil der Zellen wurde erneut mit PBS/BSA gewaschen, zentrifugiert und für die durchflusszytometrische Analyse Fluorochrom-markiert.

4.5.2 Aktivierung von B-Zellen mit CD40L-exprimierenden Zellen

4.5.2.1 Aktivierung von B-Zellen

Zur Aktivierung von B-Zellen über CD40 wurde die konstitutiv CD40L-ausprägende T-Zelllinie EL4B5 verwendet. Zunächst wurden PBMC über Dichtegradientenzentrifugation aus Leukozytenfiltern isoliert. Die B-Zellen wurden anschließend über magnetisch-assoziierte Zellsortierung aufgereinigt; verwendet wurden CD19-Multisort-Microbeads. Nach der oben beschriebenen Präparation der Zellen wurden sie, um die Reinheit zu erhöhen, nachfolgend

über zwei LS-Säulen gegeben. Darauf folgend wurde die Zellzahl der zu >98 % angereicherten B-Zellen bestimmt.

Die konstitutiv CD40L-ausprägende Zelllinie EL4B5 wurde in RPMI 1640 Plus kultiviert und bis zur gewünschten Zellzahl expandiert. Es handelt sich bei den EL4B5-Zellen um eine T-Zelllinie, die nicht adhären ist. Zum Mediumwechsel wurden einmal in der Woche 90 vol.% Medium entnommen und ein entsprechendes Volumen RPMI 1640 Plus ersetzt.

Vor der Stimulation wurden die EL4B5-Zellen radioaktiv bestrahlt, um die Proliferation zu inhibieren. Dazu wurde die benötigte Zellzahl aus den Zellkulturflaschen entnommen, bei 200 g, 4 °C für 15 min. zentrifugiert und in einem Volumen von 15 ml RPMI 1640 Plus in einem 50 ml Zellröhrchen aufgenommen. Die Zellen wurden nun in einer Gammabestrahlungsanlage bei 50 Gray bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit RPMI 1640 Plus gewaschen - um freigewordene Radikale zu entfernen - und zentrifugiert (200 g, 15 min, 4 °C). Die Zellen wurden dann in 500 µl RPMI 1640 Plus resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Für die Co-Kultur wurden 1×10^6 B-Zellen/ml und 5×10^6 EL4B5-Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml RPMI 1640 Plus aufgenommen und jeweils in eine Vertiefung einer 24-Lochplatte gegeben.

Nach einer Co-Kultur von drei Tagen wurden die EL4B5-Zellen aus der Kultur entfernt, indem die B-Zellen erneut mit magnetisch-assoziiertes Zellsortierung über eine LS-Säule angereichert wurden. Die B-Zellen wurden dann in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml RPMI 1640 Plus in je 250 µl einer flachbodigen 96-Lochplatte für fünf Tage weiter kultiviert (Abb.2). Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am dritten und achten Tag der Stimulation.

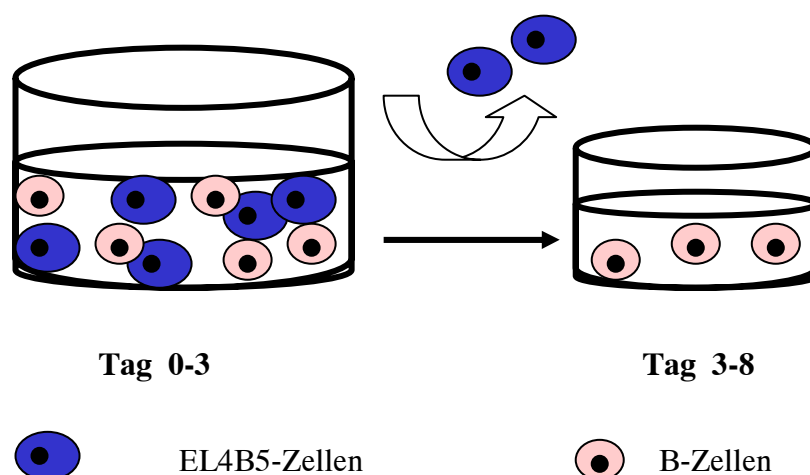


Abb. 2: Schematische Darstellung der B-Zellstimulation mit CD40L exprimierenden EL4B5-Zellen

Einzelheiten sind im Text erläutert.

Um die B-Zellen ausreichend stimulieren zu können, waren sowohl zur Induktion der Proliferation als auch zur Differenzierung über die gesamte Dauer der Stimulation Zytokine notwendig. Diese wurden entweder in Form eines Überstands aus einer PHA/PMA-stimulierten T-Zell- und Monozytenkultur oder als rekombinante Zytokine zugesetzt.

Zur Gewinnung des Überstandes wurden PBMC präpariert und in zwei Fraktionen geteilt. Die T-Zellen und Monozyten wurden jeweils aus einer Fraktion mit dem Pan-T-Zell-Isolations Kit und dem Monozyten-Isolations-Kit separiert. Die Aufreinigung der T-Zellen wie auch der Monozyten erfolgte indirekt über die Entfernung aller anderen Zellen aus den PBMC. Dazu befand sich in dem Isolationskit ein Cocktail hapten-konjugierter Antikörper gegen sämtliche Nicht-T-Zellen bzw. Nicht-Monozyten. Mit Hilfe magnetisch-markierter Antikörper gegen das Hapten konnten diese Zellen über eine Depletionssäule (BS-Säule) entfernt werden. Die isolierten T-Zellen respektive Monozyten wurden anschließend in 10 ml Zellkulturflaschen in einer Konzentration von 1×10^6 T-Zellen/ml bzw. 3×10^5 Monozyten/ml für 48 Stunden getrennt in Kultur (RPMI 1640 Plus) genommen. Nach 48 Stunden wurden die T-Zellen zu den adhären wachsenden Monozyten gegeben, nachdem deren Medium entfernt wurde. Die T-Zellen/Monozytenkultur wurde dann mit $5 \mu\text{g/ml}$ PHA und 10 ng/ml PMA für weitere 36 Stunden kultiviert. Der Überstand konnte durch Abzentrifugieren (1200 rpm , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min.) und Sterilfiltration gewonnen werden. Zur Aufbewahrung wurde der Überstand in sterile $1,5 \text{ ml}$ Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Der Überstand wurde zu der B-/EL4B5-Zellen-Kultur zu $5 \text{ Vol. } \%$ hinzugegeben. Alternativ wurden die rekombinanten Zytokine IL-2 und IL-10 in einer Konzentration von jeweils 50 U/ml ergänzt.

Abweichungen des Ablaufs, sowohl im Verhältnis der B-Zellen zu den EL4B5-Zellen als auch der Art der zugegebenen Zytokine, die während der Entwicklung dieses Stimulationssystems entstanden, sind im Ergebnisteil festgehalten.

Für die getrennte Stimulation von CXCR3- respektive CXCR4-negativen und -positiven B-Zellen, wurden die B-Zellen, wie oben beschrieben, mittels magnetisch-assoziiertes Zellsortierung aus PBMC aufgereinigt. Um mehr Zellen zu erhalten wurden die PBMC von 4-10 Spendern nach deren Isolation vereint. Die Zellen wurden dann mit CXCR3- bzw. CXCR4-PE markiert und mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung in CXCR3- respektive CXCR4-ausprägende und –nicht-ausprägende Zellen sortiert. Anschließend wurden sie, wie oben beschrieben, mit EL4B5-Zellen aktiviert. Durchlaufen Zellen vor der Aktivierung den Zellsortierer, wurde die Stimulation zum Schutz vor Kontamination in RPMI 1640 Plus +

Gentamicin durchgeführt. Da nicht kontaminierten Kulturen ohne Gentamicin vergleichbare Ergebnisse zeigten, kann ein Effekt durch dieses Antibiotikum ausgeschlossen werden.

4.5.2.2 Aktivierung naiver und Gedächtnis-B-Zellen

Für die getrennte Aktivierung naiver und Gedächtnis-B-Zellen wurden diese vor der Stimulation aus den PBMC eines Spenders in zwei gleiche Teile getrennt.

Zur Isolierung naiver B-Zellen wurden zuerst CD27-tragende Zellen über eine BS-Säule entfernt. Die Zellen wurden mit anti-CD27-FITC gefärbt, die magnetische Markierung erfolgte über anti-FITC-Multisort-Microbeads.

Der Depletion folgte für den Fall des Verbleibs einiger magnetischer Partikel zunächst ein Entfernen der magnetischen Markierung mit 20 µl Release-Reagent auf 500 µl Zellsuspension für 10 min. bei 4 °C. Nach Waschschrift und folgender Zentrifugation erfolgte die Anreicherung von B-Zellen mit CD19-Multisort-Microbeads über eine LS-Säule, wie oben beschrieben.

Zur Gewinnung von Gedächtnis-B-Zellen erfolgte vor der Anreicherung von B-Zellen die Entfernung IgD-ausprägender naiver B-Zellen. Verwendet wurden anti-IgD-FITC und anti-FITC-Multisort-Microbeads. Die Depletion erfolgte wie bei den naiven B-Zellen beschrieben.

4.5.3 Aktivierung über Toll-like-receptor (TLR)-9 mit CpG 2006

Für die Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen mit CpG 2006 wurden die B-Zellen wie beschrieben aus PBMC aufgereinigt. CpG ist ein Oligonukleotid, das Gedächtnis-B-Zellen über TLR-9 aktiviert. Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von 1×10^6 B-Zellen/ml in RPMI 1640 Plus aufgenommen. Die Konzentration von IL-2 und IL-10 betrug 50 U/ml, die von CpG 2006 war 0,3 nmol/ml. Wurden die B-Zellen zuvor nach CXCR3- respektive CXCR4-Expression sortiert, fand die Stimulation in RPMI 1460 Plus + Gentamicin statt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am dritten und achten Tag der Stimulation.

4.5.4 Aktivierung über den B-Zellrezeptor mit *Staphylococcus aureus* Cowan I

Nach magnetisch- und Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung der CXCR4(-)-B-Zellen erfolgte die Stimulation mit *Staphylococcus aureus* Cowan I über den B-Zellrezeptor in einer Konzentration von 50 ng/ml. IL-2 und IL-10 wurden in einer Konzentration von 50 U/ml ergänzt. Es wurden 1×10^6 Zellen/ml in RPMI 1460 Plus + Gentamicin aufgenommen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte am dritten und achten Tag der Stimulation.

4.6 Quantifizierung Antikörper-sezernierender Zellen mittels ELISpot

4.6.1 Prinzip der Enzym-gekoppelten Immunospot Methode

Mit dem Enzyme-linked immuno spot assay (ELISpot) können Sekretionsprodukte von Zellen nachgewiesen und die Zahl der sezernierenden Zellen quantifiziert werden.

Werden die Sekretionsprodukte von auf hochbindenden Mikrotiterplatten gebundenem Antigen bzw. Antikörper erkannt, können diese genau an der Stelle, an der die entsprechende Zelle lokalisiert war, nachgewiesen werden. Über Detektionsantikörper sowie Sekundärreagenzien und Substrate wird das Sekretionsprodukt sichtbar gemacht (Abb.3). Die Zellen, die das zu analysierende Produkt sezernieren, sind zu quantifizieren, indem die lokal begrenzten punktförmigen Farbreaktionen mit dem Invertmikroskop ausgezählt werden.

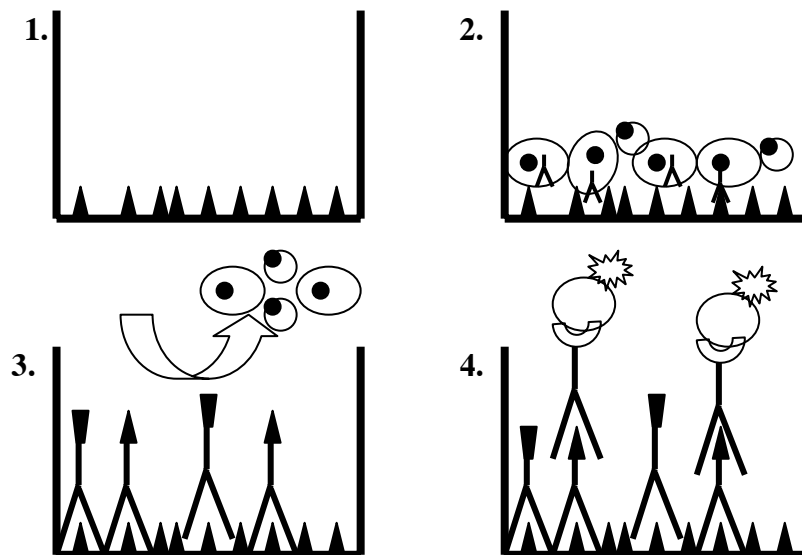


Abb. 3: Schematische Darstellung des ELISpots

Einzelheiten sind im Text erläutert.

4.6.2 Durchführung des ELISpots

Das Antigen bzw. der Antikörper gegen das zu bestimmende Sekretionsprodukt wurde in einem ersten Schritt auf einer flachbodigen, hochbindenden Mikrotiterplatte gebunden. Verwendet wurden 50 µl des Antigens Tetanus-Toxoid in einer Konzentration von 20 LF/ml in PBS bzw. anti-IgG, anti-IgA oder anti-IgM in einer Konzentration von 5 µg/ml in PBS. Nach einer Inkubation von 60 min. bei 37 °C wurde das ungebundene Antigen bzw. der Antikörper entfernt und die unspezifischen Bindungen mit Blockierungspuffer über eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Für die Sekretionsphase wurden die Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen auf die Platte aufgetragen und über zwei Stunden im

Brutschrank bei 37 °C in 5 %-iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Durch kräftiges Waschen mit dem Detergenzien-haltigen Waschpuffer konnten die Zellen vollständig entfernt werden. Zur Detektion wurde biotinyliertes anti-IgG, biotinyliertes anti-IgA oder biotinyliertes anti-IgM in einer Konzentration von 1 µg/ml, verdünnt im Waschpuffer, verwendet. Nach 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur und Herauswaschen mit dem Waschpuffer wurde für 30 min. das Streptavidin-Alkalische Phosphatase Konjugat (1:3000 in Waschpuffer) hinzugegeben. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte die Zugabe des Substrats 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP). Dieses ist zuvor in einer Konzentration von 1 mg/ml in 2-AMP-Puffer gelöst worden. Die Lösung ist anschließend bei 65 °C für 30 min. im Wasserbad mit geschmolzener Agarose so vermischt worden, dass die Konzentration der Agarose 0,6 % betrug. Diese warme Lösung wurde dann in die Mikrotiterplatte gegeben. Zum Aushärten der Agarose wurde die Platte erst 10 min. bei 4 °C und anschließend 10 min. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Entwicklung der Spots erfolgte über zwei Stunden bei 37 °C. Die Auszählung erfolgte im Anschluss mit dem Invertmikroskop (Olympus, CK 30, Hamburg, D).

4.7 Analyse der Chemotaxis

4.7.1 Prinzip der Chemotaxis-Versuche im Transwell®-System

Das Prinzip des Chemotaxis-Assays besteht darin, dass die Zahl der migrierenden Zellen von einem Kompartiment in ein anderes entlang eines Konzentrationsgradienten quantifiziert wird. Verwendet werden hierzu Zellkulturplatten, in die siebförmige Einsätze, die sogenannten Transwells®, eingesetzt werden. Auf diese Weise entstehen zwei Kompartimente, die durch eine Membran mit einer Porengröße von 5 µm voneinander getrennt sind. In das untere Kompartiment wird nun das in Medium verdünnte Chemokin eingebracht, in dem oberen Kompartiment werden die Zellen platziert. Da das Chemokin von dem unteren Kompartiment durch die Membran diffundieren kann, entsteht ein Konzentrationsgradient, gegen den sich die Zellen gerichtet bewegen können, wenn das Chemokin auf die zu untersuchenden Zellen chemotaktisch wirkt (Abb.4). Die Porengröße der Membran erlaubt Zellen ein aktives Durchwandern in das untere Kompartiment, ein passives Herunterfallen ist nicht möglich. Um den Zellen die Migration zu ermöglichen, werden die Einsätze vor Zugabe der Zellen mit Fibronectin beschichtet; es handelt sich dabei um einen Bestandteil der Interzellularsubstanz, die den Zellen das Adhärieren gestattet. Im Anschluss an die Migration werden die chemotaktisch aktiven Zellen des unteren Kompartiments mit ELISpot quantifiziert und in Bezug zur Ausgangszahl gesetzt. Diese sogenannte 100 %-Kontrolle entspricht der Zellzahl, die zu Beginn des Versuches direkt in das untere

Kompartiment gegeben wurde. Um eine unspezifische Migration zu ermitteln und gegebenenfalls von der Frequenz der migrierten Zellen abzuziehen, wurde eine weitere Kontrolle eingesetzt. Es handelt sich hierbei um die Basalmigration, bei der in das untere Kompartiment nur Medium gegeben wurde, im Idealfall finden sich bei dieser Kontrolle nach der Migration keine Zellen im unteren Kompartiment.

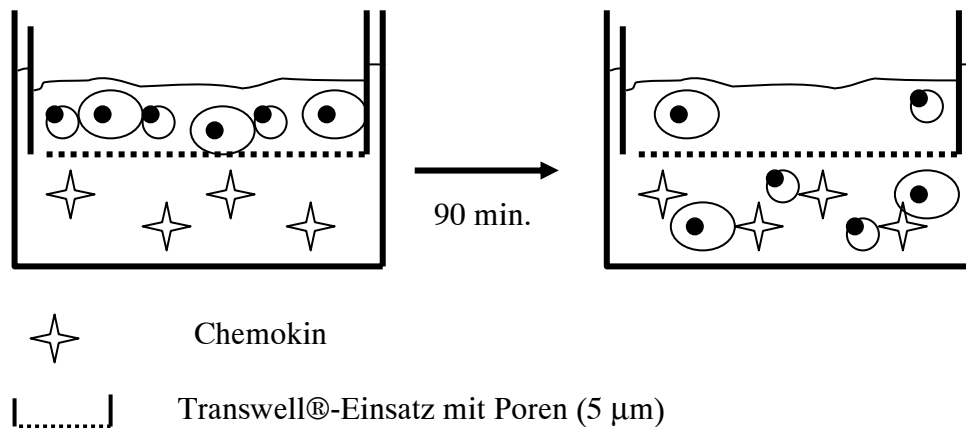


Abb. 4: Schematische Darstellung der Chemotaxisversuche im Transwell®-System
 Einzelheiten sind im Text erläutert.

4.7.2 Analyse der Chemotaxis IgG-sezernierender Zellen

Zu Beginn dieser Experimente wurden die Transwell®-Einsätze in die Zellkulturplatten eingehängt und mit je 50 µl Fibronectin (10 mg/ml in Aqua dest.) beschichtet. Nach einer Inkubation von 60 min. im Brutschrank bei 37 °C in 5 %-iger CO₂ Atmosphäre wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Einsätze für 2 Stunden bei 37 °C getrocknet. Die Chemokine wurden in Chemotaxismedium verdünnt und in einem Totalvolumen von 600 µl in das untere Kompartiment gefüllt; für die Ermittlung der Basalmigration wurde reines Chemotaxismedium verwendet. Auf die Membran in der oberen Kammer wurden je 100 µl Zellsuspension einer Konzentration von 2-5 x 10⁶ Zellen/ml gegeben. Die verwendeten Zellen wurden entweder einer mit Tetanus-Toxoid oder einer mit CD40L (EL4B5-Zellen) stimulierten Kultur entnommen. Die Zellen wurden vor der Zugabe in die obere Kammer des Transwells® mit Chemotaxismedium gewaschen und bei Raumtemperatur, 1200 rpm für 10 min. zentrifugiert. Ein Abkühlen der Zellen unter Raumtemperatur wurde dringend vermieden, da durch die Kälteempfindlichkeit des Zytoskeletts die Fähigkeit der Migration verloren gehen kann. Nach einer Migrationsdauer von 90 min. im Brutschrank bei 37 °C in einer 5 %-

igen CO₂ Atmosphäre wurden die Einsätze entnommen und die Platten 10 min. bei Raumtemperatur und 1200 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 400 µl RPMI 1460 Plus resuspendiert. Je 300 µl wurden zur Quantifizierung IgG-sezernierender Zellen in die oberste Reihe einer ELISpot-Platte überführt und verdünnt.

4.8 Graphische Darstellung und Statistik

Die in dieser Arbeit enthaltenen Graphen wurden mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) erstellt. Die statistische Auswertung sowie die Wahl der Darstellung wurde von Frau Dörte Huscher (DRFZ) unterstützt.

Die Analyse der Co-Expression verschiedener Antikörpersubklassen und CXCR3 bzw. CXCR4 sowie die Analyse der Expression von CXCR3 nach Stimulation mit der Basiskultur bzw. zusätzlich mit IFN- γ wurde statistisch ausgewertet. Auch die Migrationsassays wurden statistisch ausgewertet. Die Aussage über Signifikanzen wurde mit dem Programm Prism 3.0 nach Durchführung eines Man-Whitney-Tests bzw. des Wilcoxon matched pairs tests getroffen. Bei dem Vergleich der CXCR3-Expression IgG1- bzw. IgA-ausprägender Zellen handelte es sich um unverbundene Werte. In diesem Fall wurde der Man-Whitney-Test verwendet. In den anderen Experimenten wurde der Wilcoxon matched pairs test für verbundene Werte durchgeführt. Als signifikant galt, wenn $p < 0,05$ war.