

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

Wir isolierten IEL und LPL aus makroskopisch blanden Anteilen von chirurgischen Darmresektaten aus Dünndarm ($n = 5$) und Dickdarm ($n = 6$) von zehn Patienten (fünf Frauen, fünf Männer), bei denen keine HIV-Infektion bekannt war. Das Alter der Patienten lag im Median bei 60 Jahren (Spannweite 49-89 Jahre). Indikationen für den chirurgischen Eingriff waren Rektumkarzinom ($n = 3$), Kolonkarzinom ($n = 2$), Morbus Crohn ($n = 2$), Dünndarmkarzinoid ($n = 1$), Dünndarmstenose bei Mammakarzinom ($n = 1$) und Ulcus duodeni ($n = 1$).

Zusätzlich wurden PBL von fünf klinisch gesunden Labormitarbeiterinnen isoliert. (Alter im Median 59 Jahre (58-61 Jahre)).

2.2. Zellisolation

2.2.1. Isolation von IEL und LPL

Die Zellisolation erfolgte nach einem etablierten Protokoll¹⁰¹. Dabei wurden die Operationspräparate zunächst zur Reinigung von Schleim, Blut und Zelldebris in physiologischer Kochsalzlösung gespült und anschließend mit der serosalen Seite nach oben auf einer Silikonplatte aufgespannt. Mit einem Skalpell wurde die Mukosa von der Submukosa abpräpariert. Anschließend wurde die Mukosa mit Hanks Balanced Saline Solution (HBSS, Fa. Gibco, Paisley, Schottland) gespült. Zum Entfernen des Mucus wurde die Mukosa in 100 ml HBSS, welche zusätzlich 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µg/ml Gentamycin, 2,5 µg/ml Amphotericin (Biochrom KG, Berlin), 25 mM HEPES Puffer, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2 mM EDTA und 15 mg Dithiothreitol (DTT, Fa. Sigma) enthielt, auf dem Kreisschüttler bei 37°C inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde das Präparat mit HBSS zum Entfernen der DTT-Reste über einem Sieb gespült und in HBSS mit oben angegebenen Zusätzen, jedoch ohne DTT, bei 37°C auf dem Kreisschüttler dreimal je eine Stunde inkubiert. Nach jeder Stunde wurden die Überstände, welche vorwiegend Epithelzellen und IEL enthielten, aber auch durch einige LPL kontaminiert sein konnten, dekantiert

bzw. abpipettiert. Das Gewebestück wurde danach auf ein steriles Sieb überführt und erneut mit HBSS gespült. Anschließend wurde die Mukosa in RPMI 1640-Medium (Gibco), welches zusätzlich 10% Fetales Kälberserum (FCS), 25 mM HEPES Puffer, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, die o.g. Antibiotika und jeweils 0,001% Kollagenase CLS III (Worthington Diagnostic Systems, Freehold, NJ, USA), 0,001% Desoxyribonuklease I (Boehringer, Mannheim) und 0,001% Trypsin-Inhibitor aus der Soyabohne (Sigma) enthielt, über Nacht bei 37°C auf dem Kreisschüttler inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die entstandene Suspension über einem sterilen Sieb dekantiert. Die Reste des Gewebestücks wurden mit RPMI Medium (mit 10% FCS) gespült. IEL und LPL wurden nun jeweils durch Zentrifugation in einer 30%igen Percoll-Suspension (Percoll™/Redigrad™, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) aufgereinigt: Die gesammelten Überstände wurden hierzu bei 600g über 10 Minuten abzentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden mit RPMI-Medium resuspendiert und im Verhältnis 2:1 mit 90% Percoll Lösung aufgefüllt. Erneut wurde die entstandene Suspension zentrifugiert (10 Minuten, 600g). Das Pellet wurde mit RPMI-Medium resuspendiert und die Zentrifugation ein drittes Mal wiederholt. Anschließend erfolgte eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) zur Lymphozytenisolation. Hierzu wurde das Pellet erneut mit Medium resuspendiert und im Volumenverhältnis von 2:1 auf eine Ficoll-Lösung pipettiert. Bei 1200g wurde 25 Minuten zentrifugiert, die dabei entstandene Zwischenphase wurde abpipettiert. Der oben geschilderte Wasch-Schritt wurde zwei weitere Male wiederholt.

Das zum Schluß gewonnene Pellet wurde mit RPMI-Medium zu einem Gesamtvolumen von 1000 µl resuspendiert. Um die zelluläre Ausbeute zu bestimmen, wurden 10 µl der Zellsuspension mit einer sterilen Pipette abgenommen und zu gleichen Teilen mit Trypanblau gemischt. Die gefärbten Zellen wurden in einer Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt.

2.2.2. Isolation von PBL

Jeweils 10-20 ml heparinisierten Vollblutes wurde zentrifugiert, der Serumüberstand wurde abpipettiert. Die sedimentierten zellulären Bestandteile wurden in HBSS resuspendiert (Volumenverhältnis 1:1). Die lympho-monozytären Zellen wurden aus der Suspension durch Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Hypaque-

Gradienten (s.o.) gewonnen. Abschließend wurde ein Teil der isolierten Zellen gefärbt und gezählt (s.o.).

2.3. Zellanalyse

2.3.1. Das Prinzip der Fluoreszenzzytometrie

Die Fluoreszenzzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen anhand von Streulichteigenschaften und Fluoreszenz. Voraussetzung ist das Vorliegen einer Einzelzellsuspension in einer Konzentration von ca. 10^6 Partikeln/ml. Zur Analyse wird die Suspension unter Druckluft über eine Stahlkapillare in eine Messkammer hineingepumpt. Bei Eintreten in die Messkammer werden die Zellen stark beschleunigt, Zellaggregate werden dabei aufgetrennt, sodaß die Zellen sequentiell den Analysepunkt erreichen, wo sie von einem Laserstrahl klassifiziert werden¹⁰². Die Analyse beruht auf zwei physikalischen Prinzipien: der Lichtstreuung und der Fluoreszenz. Bei der Lichtstreuung interagiert die Zelle mit einem Lichtstrahl, indem es dessen Richtung verändert. Die Wellenlänge des Lichts bleibt konstant. Die Lichtstreuung wird durch die Zellgröße und die Struktur der Zellmembran und der intrazellulären Bestandteile beeinflusst.

Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut: der größte Teil der Streuung erfolgt entlang des einfallenden Lichtstrahls nach vorne, es wird daher als sog. Vorwärtsstreulicht bezeichnet (engl: „forward light scatter“, FSC) und dient zur Analyse der Zellgröße (große Zellen streuen mehr Licht als kleine). Das Seitwärtsstreulicht (engl: „side scatter“, SSC) wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut, es gibt Auskunft über die intrazelluläre Granularität der Zelle. Neben Größe und intrazellulärer Beschaffenheit der zu analysierenden Zellen interessieren auch Eigenschaften der Zelloberfläche. Diese werden durchflusszytometrisch anhand von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern sichtbar gemacht. Zugrunde liegt das physikalische Prinzip der Fluoreszenz, dem durch Strahlung angeregten Leuchten eines Stoffes. Fluoreszierende Verbindungen absorbieren Lichtenergie über einen charakteristischen Wellenlängenbereich, das Absorptionsspektrum. Diesen Prozess bezeichnet man als Absorptionsübergang¹⁰².

Durch die Lichtenergie werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Mit dem Rückgang zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Diesen Strahlungsübergang bezeichnet man als Fluoreszenz. Das bei der Emission abgestrahlte Licht ist langwelliger als das Anregungslicht, es bildet das Emissionsspektrum¹⁰². In der Fluoreszenzzytometrie werden vorwiegend Argon-Ionen-Laser verwendet. Sie generieren Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm. Zur Fluoreszenzmarkierung werden daher Farbstoffe verwendet, die ihr Absorptionsmaximum in diesem Wellenlängenbereich haben. Werden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe parallel verwendet, wie bei der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse, so sollten Farbstoffe gewählt werden, die sich hinsichtlich ihres Emissionsspektrums deutlich voneinander unterscheiden.

Passiert eine Zelle den Analysepunkt, so sendet sie Signale aus, die von Detektoren empfangen und über elektronische Schaltungen quantifiziert werden. Die digitalisierten Daten werden von einer angeschlossenen Rechereinheit ausgewertet und verstärkt¹⁰². Bei der Datenauswertung können Zellen, die bei einer Parameterkombination in einem definierten Wertebereich liegen, durch Setzen eines Filters („Gate“) selektiv zur Auswertung kommen. So werden z.B. Lymphozyten anhand ihrer Eigenschaften im Vorwärts-Seitwärts-Streulicht anhand ihrer charakteristischen Größe und Granularität erkannt und elektronisch ausgefiltert. Eine genauere Diskriminierung wird möglich, wenn mehrere Filter gleichzeitig zur Anwendung kommen und so z.B. Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften miteinander korreliert werden¹⁰².

2.3.2. Zellfärbung

Zur Durchführung einer Dreikanal-Fluoreszenzzytometrie wurden IEL, LPL und PBL mit Fluorescein-Isothiocyanat- (FITC), R-Phycoerythrin- (R-PE) bzw. Cyanin-5- (Cy-5) markierten monoklonalen Antikörpern (mAbs) gefärbt. Verwendet wurden FITC-markierte Antikörper anti-CCR5 (Klon 2D7, PharMingen, USA), anti-CD4 (MT310, DAKO, Glostrup, Dänemark), anti-CD8 (DK25, DAKO), anti-CD25 (ACT-1, DAKO), anti-CD45R0 (UCHL-1, DAKO), anti-CD69 (FN 50, PharMingen), anti-CD103 (Ber-ACTS DAKO), anti-TCR $\gamma\delta$ (5A6.E9, T-Cell Diagnostics, Woburn, USA), anti-HLA-DR (G46-6, PharMingen) und anti-CD68 (KP1, DAKO), R-PE-markierte mAbs anti-CCR5 (2D7, 45531.111, R&D Systems, Abingdon, UK), anti-CXCR4 (12G5, PharMingen, USA), anti-CD4 (MT310, DAKO) anti-CD8 (DK25, DAKO), anti-CD25 (ACT-1, DAKO), anti-CD45R0 (UCHL-1, DAKO), anti-CD69 (FN 50, PharMingen), anti-CD103 (Ber-ACT8,

DAKO), anti-TCR $\gamma\delta$ (B1.1, PharMingen), anti-HLA-DR (G46-6, PharMingen) und RPE-Cy-5 markierte mAbs anti-CD3 (UCHT1) und anti-CD13 (WM47), jeweils DAKO. Des Weiteren wurden FITC-, R-PE und Cy-5- markierte Kontrollantikörper (anti-Maus-IgG, DAKO) verwendet.

In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden die oben angegebenen Antikörper in Sättigungskonzentrationen zugegeben. Die Sättigungskonzentrationen waren im Rahmen von Vor-Experimenten ermittelt worden (Daten nicht gezeigt). Pro Loch der Mikrotiterplatte wurden jeweils 10 μ l der folgenden Antikörper einpipettiert: anti-CCR5, anti-CD45R0, anti-CD103 (FITC), sowie anti-CD69 und anti-CD103 (PE). Für anti-CD69 (FITC) wurden 20 μ l benötigt. Die übrigen verwendeten Antikörper wurden in einer Menge von 3 μ l pro Loch hinzugegeben. Um unspezifische Bindungen zu detektieren, wurden jeweils 3 μ l Kontrollantikörper in das erste Loch der Platte einpipettiert. Nach Zugabe der Antikörper wurde die Mikrotiterplatte bei 4°C zentrifugiert (600g, 1 Minute). Anschließend wurden jeweils 100 μ l Zellsuspension hinzugegeben. Die Verdünnung der Zellsuspension war so berechnet worden, dass sich eine Zellzahl von ca. 10^5 - 10^6 pro Loch ergab. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte über 30 Minuten bei 4°C inkubiert und danach zentrifugiert (5 Minuten, 600g). Die Überstände wurden dekantiert und das Zentrifugat mit 100 μ l Pufferlösung (BD FACS Flow) resuspendiert. Die Suspension wurde von der Mikrotiterplatte in Analyseröhrchen überführt, welche jeweils 200 μ l Pufferlösung enthielten.

2.3.3. Fluoreszenzzytometrische Analyse der isolierten Zellen

Mindestens 15000 Zellen wurden jeweils fluoreszenzzytometrisch analysiert. (FACScan, Becton Dickinson Heidelberg). Die Analyse erfolgte mit dem Softwareprogramm CELLQuest (Becton Dickinson). Anhand charakteristischer Eigenschaften im Vorwärts-/Seitwärts-Streulicht wurde zunächst das Lymphozyten-Gate definiert. Anhand der Negativ-Kontrolle wurde dann ein Gate gesetzt, welches mehr als 98% der Zellen ausschließen sollte, die mit den Kontrollantikörpern unspezifisch angefärbt worden waren. Anschließend wurde anhand der Fluoreszenzeigenschaften ein weiteres Gate so gesetzt, dass nur die CD3-positiven Lymphozyten eingeschlossen wurden.

2.4. Statistik

Angewandt wurden der Mann-Whitney U-Test für ungepaarte Daten und der Wilcoxon Rang-Summen-Test für gepaarte Daten. Als statistisch signifikant wurde ein Wert von $p < 0,05$ angesehen. Als Analysesoftware wurde StatView[®] in der Version 5.0.1 verwendet.