

3. Angewandte Methoden der B-Zell-Charakterisierung

3.1 4-Farb-Durchflußzytometrie

Grundlage der durchflußzytometrischen Zellanalyse (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist eine Antigen-Antikörperreaktion, die mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Zellen einer Einzelzellsuspension werden durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten monochromatischen Laserstrahl vorbeigeleitet. Durch Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen nachfolgend unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) wieder auf ihr Ursprungsniveau zurück. Das resultierende Fluoreszenz- und Streulicht wird über ein komplexes System von Spiegeln und Filtern auf verschiedene Photodetektoren gelenkt und nach Intensität und Farbe vom Computer getrennt registriert. Jede der aufgezeichneten optischen Eigenschaften (Streu- und Fluoreszenzlicht) steht für eine bestimmte Charakteristik der erfaßten Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), d.h. das in Richtung des Laserstrahls gestreute Licht, korreliert dabei mit der Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), d.h. das in rechtem Winkel zum Laserstrahl gestreute Licht, mit der Binnenstruktur der Zelle, die wiederum u.a. von der Granularität des Zytoplasmas und der Größe des Zellkerns abhängt. Das Fluoreszenzlicht besitzt je nach Art des verwendeten Fluorochroms des jeweiligen Antikörpers eine bestimmte Wellenlänge [Deneys et al. 2001].

In den vorliegenden Untersuchungen wurde für die durchflußzytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen mononukleärer Zellen (*mononuclear cells*, MNC) des peripheren Blutes bzw. des Gewebeeinfiltrates ein Durchflußzytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, USA) verwendet, welches, nach elektronischer Eingrenzung der Lymphozytenpopulation aufgrund ihrer Eigenschaften im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht, eine weitere Charakterisierung in bis zu vier Farbkanälen (d.h. in Kanälen die jeweils eine von vier verschiedenen Wellenlängen detektieren) zuließ [Dörner et al. 2002; Herzenberg et al. 2002]. Die Wahl der Fluorochrom-markierten Antikörper wurde dabei entsprechend der jeweiligen Fragestellung adaptiert.

In der Regel erfolgte eine Ausgrenzung Propidiumidod-positiver, d.h. avitaler Zellen im 1. Kanal, eine Markierung der Gesamt-B-Zellen mit einem Phycoerythrin (PE)-markierten monoklonalen Antikörper gegen den Pan-B-Zellmarker CD19 im 2. Kanal und eine Differenzierung zwischen CD27-negativen und -positiven Zellen anhand ihres Bindungsverhaltens zu einem Cy(Cyanin)5-gekoppelten monoklonalen Antikörpers im 3. Kanal. Der 4. Farbkanal stand damit für die gleichzeitige Detektion eines weiteren Markers

(z.B. Immunglobulin-Isotyps oder Chemokinrezeptors) durch einen Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten Antikörper zur Verfügung. Durch schrittweises Setzen elektronischer Fenster (*gates*) im Rahmen der Rechner-gestützten Auswertung konnten anschließend die entsprechenden B-Zell-Subpopulationen differenziert und analysiert werden.

3.2 Immunglobulingenanalyse mittels genomischer Einzelzell-PCR

Die genomische Einzelzell-Polymerasekettenreaktion (*single-cell polymerase chain reaction*, PCR) hat sich als leistungsstarke Methode zur Analyse rekombinierter Immunglobulingene verschiedener humaner B-Zell-Populationen erwiesen [Brezinschek et al. 1995, 1997; Klein et al. 1998; Dörner et al. 1998]. Ihr besondere Vorteil besteht dabei in der *ex-vivo* Analyse zufällig ausgewählter, unstimulierter individueller B-Zellen einer bestimmten Population bzw. Subpopulation, die eine Methoden-bedingte „Verzerrung“ des erfaßten Repertoires weitestgehend vermeidet. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber der bisherigen Repertoireanalyse von rekombinierten Immunglobulingenen, z.B. in cDNA-Banken oder in mittels Hybridomtechnik oder EBV-Transformation etablierten Zell-Linien, dar. Darüber hinaus bietet diese Methode die Möglichkeit, durch den Vergleich von produktiv und nichtproduktiv rekombinierten Immunglobulingenen Einblicke in den Einfluß von molekularen und nachfolgenden selektiven Prozessen auf die Bildung des Immunglobulingenrepertoires sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen zu erhalten [Dörner et al. 1998] (Abbildung 3). Der Stellenwert dieser Immunglobulingenanalysen für Untersuchungen des physiologischen und pathologischen B-Zell-Repertoires wird nachfolgend in Abschnitt 3.2.1 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse der rekombinierten variablen Abschnitte von Immunglobulin-Schwerketten (IgV_H)-Genen nach einer von Brezinschek et al. [1995, 1997] beschriebenen Methode. Im Wesentlichen war das Vorgehen durch folgende Schritte charakterisiert: In der jeweiligen Einzelzell-Suspension mononukleärer Zellen (aus peripher-venösem Blut bzw. infiltriertem Gewebe) wurden die Zellen der interessierenden Population / Subpopulation (z.B. CD19⁺ Gesamt-B-Zellen, CD19⁺CD27⁻ naive B-Zellen oder CD19⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen) zunächst durchflußzytometrisch selektiert. Über eine an das hierfür verwendete Durchflußzytometer (FACSTAR^{Plus}, Becton Dickinson, Mountain View, USA) angeschlossene Einzelzell-Sortiereinheit wurden nachfolgend individuelle Zellen in jeweils einzelne Vertiefungen (*wells*) von 96-well Mikrotiterplatten sortiert, in denen sich bereits Lysepuffer befand. Nach der Zell-Lyse erfolgte zunächst eine unspezifische Amplifikation der gesamten freigesetzten zellulären

DNA mittels PCR unter Verwendung eines Zufalls-Oligonukleotidgemisches als Startpunkt. Fünf Mikroliter des erhaltenen Amplifikats wurden dann nachfolgend einem spezifischen zweistufigem „nested“ PCR-Protokoll unterzogen, wobei wiederum fünf Mikroliter des Amplifikates der ersten spezifischen Reaktion in der zweiten spezifischen Reaktion als Matrize dienen. Durch dieses Vorgehen wurde die DNA-Zielsequenz so weit amplifiziert, daß sie nachfolgend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht, ausgeschnitten, gereinigt, sequenziert und durch Vergleich mit den Keimbahn V_H - Gensequenzen entsprechender Datenbanken analysiert werden konnte.

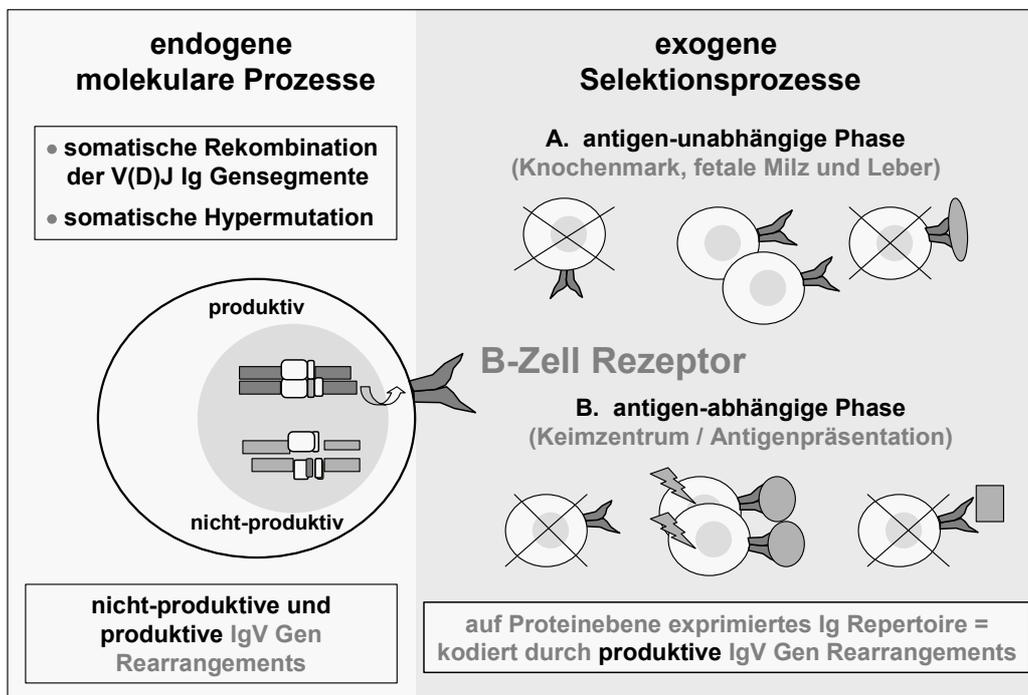


Abbildung 3. Einfluß endogener molekularer Prozesse und exogener Selektionsprozesse auf das B-zelluläre Repertoire der V(D)J Ig Rearrangements. Endogene Prozesse, wie somatische Rekombination und Hypermutation, beeinflussen produktive und nichtproduktive Rearrangements, während die produktiven Rearrangements zusätzlichen Selektionsprozessen über die durch sie kodierten B-Zell-Rezeptoren unterliegen [modifiziert nach Dörner et al. 1998, Hansen et al. 2000].

3.2.1 Analyse von Immunglobulinen-Rearrangements von Normalpersonen und Patienten mit systemischem Lupus erythematodes [Übersicht]

Publikation:

Use of immunoglobulin variable-region genes by normal subjects and patients with systemic lupus erythematosus. Hansen A, Dörner T, Lipsky PE.

Int Arch Allergy Immunol 2000; 123: 36-45.

**auf den Seiten 28 – 37
der Original-Druckversion**

3.3 Einzelzell-Reverse Transkriptase-PCR

Nach durchflußzytometrischer Analyse und Sortierung von Einzelzellen in separate Vertiefungen von 96-well Mikrotiterplatten wurden, im Gegensatz zur Analyse von Immunglobulin-DNA-Sequenzen mittels oben genannter genomischer Einzelzell-Analyse, in der Einzelzell-Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) verschiedene spezifische mRNA Transkripte analysiert. Dabei gilt es zu berücksichtigen, daß durch diese Methode insbesondere „aktivierte“ Zellen erfaßt werden [Wang & Stollar 1999, 2000], die eine suffiziente Menge der zu untersuchenden Target-mRNA exprimieren. Zellen mit fehlender bzw. sehr geringer Expression der betreffenden spezifischen mRNA werden hingegen nicht erfaßt. Anhand von Grenzverdünnungsexperimenten konnte aber diesbezüglich gezeigt werden, daß die jeweiligen angewandten Einzelzell-RT-PCR Protokolle die Detektion der entsprechenden Zielsequenzen mit hoher Sensitivität, d.h. den Nachweis von bereits ≤ 10 Kopien, ermöglichten. Voraussetzung einer erfolgreichen RT-PCR ist dabei generell, daß vorab ein adäquates Umschreiben der mRNA in komplementäre Erst-Strang-DNA mittels reverser Transkription erfolgt ist. Als interne Kontrolle der RT-PCR erfolgte daher in allen Versuchsansätzen der Nachweis von mRNA-Transkripten für ein sogenanntes „house-keeping“ Gen, d.h. für ein Gen das von allen vitalen Zellen essentiell exprimiert wird. In vorliegenden Untersuchungen wurden diesbezüglich Transkripte für Glycerolaldehyd-3-phosphodehydrogenase (GAPDH), ein mit der Atmungskette assoziiertes Enzym der mitochondrialen Membran, analysiert.

Ein potentieller Nutzen der Einzelzell-RT-PCR besteht in der Möglichkeit der Analyse verschiedener spezifischer mRNA-Transkripte in einer individuellen Zelle, und damit darin, ein bestimmtes „Muster“ der mRNA-Expression der untersuchten Zellen zu erfassen. Weiterhin besteht mit dieser Methode die Möglichkeit, den Anteil / die Frequenz stark exprimierender Zellen innerhalb einer untersuchten Population bzw. Subpopulation zu bestimmen. Möglichkeiten, die in der Analyse von RNA/cDNA aus Zellgemischen nicht gegeben sind, da in diesen wenige „aktivierte“ Zellen große Mengen von mRNA produzieren können, die dann ein positives Gesamtergebnis zeigen. Als Nachteil der Methode muß allerdings der derzeit relative hohe Kosten- und Arbeitsaufwand angesehen werden, der die Zahl entsprechender detaillierte Analysen limitiert. Insgesamt kann die Einzelzell-RT-PCR aber als eine wesentliche methodische Ergänzung der molekularen Zellanalyse bei entsprechender Fragestellung angesehen werden.

3.3.1 Analyse von Immunglobulin-mRNA-Transkripten

In vorliegenden Untersuchungen konnte durch den Einsatz der Einzelzell-RT-PCR die Analyse der Immunglobulin-Rearrangements in individuellen *ex-vivo* sortierten B-Zellen auf eine Immunglobulinisotyp-spezifische Untersuchung erweitert werden. So ist, im Gegensatz zur Analyse genomischer DNA, auf mRNA/cDNA-Ebene eine Amplifikation der die jeweilige Immunglobulinkette kodierenden Sequenz bis in den konstanten, d.h. den den Ig-Isotypen determinierenden Teil, hinein möglich, da die langen, nichtkodierenden Intronsequenzen zwischen variablem und konstantem Abschnitt nach dem physiologischen Vorgang des Spleißens auf mRNA-Ebene nicht mehr vorliegen [Gellert 1997]. Die zu analysierenden Nukleotidsequenzen besitzen somit eine Länge von weniger als 1000 Basenpaaren und lassen sich mittels PCR sicher amplifizieren [Wang & Stollar 1999, 2000; Yavuz et al. 2001].

Es wurden isotypspezifische IgV_H mRNA Transkripte von CD27⁻ und CD27⁺ B-Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten mit SS und gesunden Kontrollpersonen analysiert. In der externen PCR wurde hierfür ein alle V_H-Familien-erfassendes Gemisch von 5' Primern mit jeweils einem spezifischen Primer für den konstanten Teils eines Schwerekettenisotyps (d.h. für μ , γ und α) als 3'-Primer kombiniert. In der internen PCR wurde dann jeweils ein V_H-familienspezifischer (interner) 5'-Primer mit einer Kombination J_H-spezifischer 3'-Primern kombiniert. Die weitere Analyse erfolgte mittels direkter DNA-Sequenzierung und Sequenzvergleich mit Immunglobulin-Datenbanken analog zu der nach genomischer Einzelzell-PCR.

3.3.2 Analyse von Chemokinrezeptor-mRNA-Transkripten

Es wurden CD27⁻ naive und CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen aus dem peripheren Blut von Sjögren-Patienten und gesunden Kontrollpersonen untersucht. Die spezifische Amplifikation der CXCR-mRNA erfolgte analog der Amplifikation der IgV_H-mRNA mittels „nested“ PCR. So konnten, nach der cDNA-Synthese und zwei nachgeschalteten spezifischen Amplifikationsschritten, mRNA-Transkripte für GAPDH, CXCR3, CXCR4, die beiden möglichen Spleißvarianten von CXCR5 (CXCR5/V1, CXCR5/V2) sowie für das intrazelluläre inhibitorische Regulatorprotein RGS13 in den *ex-vivo* sortierten Einzelzellen nachgewiesen werden. Die Etablierung der verschiedenen Primerkombinationen erfolgte nach Analyse der aus Datenbanken (Genbank, NCBI) bekannten jeweiligen Zielsequenz in entsprechenden Vorversuchen.

3.4 Migrationsassays

Um die Funktionalität der exprimierten (und durchflußzytometrisch analysierten) Chemokinrezeptoren zirkulierender B-Lymphozyten zu testen, wurde die migratorische Kapazität von peripheren CD19⁺ B-Zellen von Patienten mit primärem SS und gesunden Kontrollpersonen in *in-vitro* Assays untersucht. Dabei wurden bereits in der Literatur beschriebene Testansätze [Brandes et al. 2000, Hauser et al. 2000] nur geringfügig modifiziert. So wurden B-Zellen aus dem venösen Blut nach Markierung mit einem anti-CD19-Antikörper magnetisch positiv angereichert und über Nacht im Brutschrank (bei 37°C und 5% CO₂) unter Zusatz von Lipopolysacharid (LPS, *Escherichia coli*) zum Kulturmedium inkubiert. Nachfolgend wurden jeweils cirka 500.000 Zellen in Fibronectin-beschichtete Einsätze von Migrationskammern (mit 5µm Porengröße) gegeben und für 90 Minuten gegen einen Gradienten von CXCL13 bzw. CXCL12 inkubiert. Jede Bestimmung erfolgte dabei als Dreifachansatz. Migrierte und nichtmigrierte Zellen wurden anschließend durchflußzytometrisch analysiert und der Prozentsatz der migrierten Zellen kalkuliert. Ein weiterer Ansatz erfolgte jeweils ohne B-Zell-Anreicherung und LPS-Stimulation. Die optimalen Konzentrationen der eingesetzten Chemokine (CXCL12, 50nM; CXCL13, 250 nM) waren jeweils in entsprechenden Vorversuchen durch Titration ermittelt worden. Wie bereits in der Literatur beschrieben [Brandes et al. 2000], zeigte sich unter unspezifischer Stimulation mit LPS eine deutliche Zunahme der migratorischen Kapazität der B-Zellen.