

3. Material und Methoden

Methodenübersicht

Zur Analyse der Chemotaxis von T-Zellsubpopulationen wurden mononukleäre Zellen, nach ihrer Präparation aus der unbehandelten oder immunisierten Maus und humanem peripheren Blut durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen und weiteren Zellanreicherungsverfahren wie Panning oder MACS[®] (magnetic cell sorting, magnetische Zellsortierung) unterzogen.

Chemotaxis von frisch isolierten T-Zellen wurde im Chemotaxisassay getestet, im FACS (fluorescence-activated cell sorter) quantifiziert und analysiert. Zur Charakterisierung und Phänotypisierung wurden die Zellen für intrazelluläre Zytokine oder Oberflächen- gefärbt. Um *in vitro* differenzierte Th1- und Th2-Zellen zu erzeugen (um sie im Chemotaxis- oder Homing-Assay einzusetzen), wurden naive T-Zellen polyklonal oder TCR-transgene (tg) T-Zellen Ag-spezifisch mittels APC und Peptid stimuliert und unter polarisierendem Zytokineinsatz kultiviert. Zur Gewinnung von rekombinantem Chemokin wurde eine stabil-transfizierte permanente Insektenzelllinie kultiviert. Der Homing-Assay wurde zur Testung des Wanderungsverhaltens von T-Zellpopulationen *in vivo* benutzt.

3.1. Material

3.1.1. Antikörper

3.1.1.1. Antikörper in Zellkultur bzw. Zellisolation

In der Zellkultur wurden folgende, vom Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ) zur Verfügung gestellte Antikörper verwendet: anti-Maus-IL-4, Klon 11B11, anti-Maus-IL-12, Klon C15.6.1 anti-Maus-IFN- γ , Klon AN18.17.24. In der Arbeitsgruppe wurden anti-Maus-CD28, Klon 37.51, von E. Schmitt aus Mainz, anti-Maus-CD3, Klon 145-2C11 von der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, hergestellt.

Zur Zellseparation (Panning) wurden folgende Ak benutzt: polyklonal Kaninchen-anti Ratte-Ig (kreuzreaktiv zu Maus-Ig), DAKO, Glostrup, Dänemark; Ratte-anti-Maus-CD8, Klon 53-

6.72, ATCC, ; Ratte-anti-Maus-CD11b, Klon M1/70, ATCC; Ratte-anti-Maus-CD25, Klon PC6.1, ATCC; Ratte-anti-Maus-CD16/CD32, Klon 2.4G2, ATCC; Ratte-anti-Maus-CD62L, Klon Mel-14, E. Butcher, Stanford University, USA.

Für die magnetische Zellseparation (MACS) wurden folgende, an Magnetpartikel gebundene Ak benutzt: anti-Maus-CD62L, anti-Maus-CD90, anti-Maus-CD4, anti-human-CD4 von Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach.

3.1.1.2. Färbeantikörper für die Durchflusszytometrie (FACS)

Oberflächenfärbungen

Zur Färbung von Zelloberflächenantigenen wurden Ak verwendet, an die Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Indodicarbocyanin (Cy5), CyChrome oder Biotin gekoppelt war. Ungekoppelte Ak wurden mit polyklonalen anti-Ig-Ak detektiert. Biotinierte Ak wurden durch Peridinin-Chlorophyll-Protein konjugiertes Streptavidin (BD Pharmingen, Hamburg) als Sekundärreagenz sichtbar gemacht.

Folgende Ak wurden verwendet:

Ratte-anti-Maus

Spezifität, Klon, Quelle

CD4, GK1.5, DRFZ

CD62L, Mel-14, BD Pharmingen oder DRFZ

CD25, 7B11, BD Pharmingen

CD69, H1.2F3, BD Pharmingen

CD16/CD32, 2.4G2, DRFZ

CD45RB, 23G2, BD Pharmingen

CXCR5 (ungekoppelt), 2G8, M. Lipp, MDC

CCR5, C34-3448, BD Pharmingen

Maus-anti-Human

Spezifität, Klon, Quelle

CD3, UCHT1, DRFZ

CD4, TT1, DRFZ

CD45RA, 4G11, DRFZ

Ratte-anti-Human

CCR7, 3D12, M.Lipp, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin (MDC)

Andere Färbe-Ak und -reagenzien:

Hamster-anti-maus-CD3, 145-2C11, BD Pharmingen, Hamburg
polyklonal, Maus IgG, aufgereinigt, Jackson, über Dianova, Hamburg
polyklonal, Ratten IgG, aufgereinigt, Jackson
polyklonal humanes IgG, Beriglobin[®], Chiron, Marburg
polyklonal-Ziege-anti-Ratte-IgG-FITC, Jackson
polyklonal-Esel-anti-human-IgG-PE, Jackson
murines CCL19-Fc (CCL19 fusioniert mit humanem Fc γ), J. Cyster, San Francisco, USA

Intrazelluläre Cytokindetektion

Hier wurden folgende, FITC, PE oder Allophycocyanin konjugierte Ak benutzt:

Ratte-anti-Maus

Spezifität, Klon, Quelle

IL-4, 11B11, DRFZ

IL-10, JES5-16E3, BD Pharmingen

IFN- γ , AN18.17.24, DRFZ

Isotypkontroll-Ak (alle von BD Pharmingen):

Maus-IgG1 PE, Ratte IgG1 FITC, Ratte IgG2b PE

Maus-anti-Human

Spezifität, Klon, Quelle

IL-4, 4D9, Hölzel, Köln

IFN- γ , 4SB3, DRFZ

3.1.2. Rekombinante Cytokine und Chemokine

von der Firma R&D Systems, Wiesbaden:

murines CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL19, CCL20, CXCL9, CXCL12, CXCL13, XCL1, IL-4, IL-12, IFN- γ , humanes CCL19.

Murines CCL17 wurde aus dem Kulturüberstand stabil transfizierter Insektenzellen (Schneider-2-TARC, Geschenk von I. Förster, München) gewonnen.

3.1.3. Material für zellbiologische Arbeiten

Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640 mit 25mM HEPES)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Fötale Kälberserum (FCS), inaktiviert für 30 min bei 56°C	(Linaris, Wertheim - Bettingen)
Mercaptoethanol	(Invitrogen)
Na-Pyruvat	(Invitrogen)
Penicillin-Streptomycin	(Invitrogen)
Geneticin (G418)	(Invitrogen)
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V, endotoxinarm, Zellkultur getestet	(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
Schneiders Drosophila Medium	(Invitrogen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(Merck, Darmstadt)
Ficoll (LSM [®])	(Organon Teknika, Durham, NC)
Histopaque-1083	(Sigma-Aldrich)
Murines und humanes Fibronectin	(Invitrogen)
Ovalbuminpeptid Ova ₃₂₃₋₃₃₉ (Sequenz: ³²³ ISQAVHAAHAEINEAGR ³³⁹)	Institut für Biochemie, Humboldt-Universität zu Berlin
Plastikkulturgefäße	Nunc oder Corning Costar, über WCP, Berlin
Mini-MACS-Säulen VS, BS, CS und passende Magneten	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach
CuSO ₄	Merck
PMA	Sigma-Aldrich
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Brefeldin A	Sigma-Aldrich

3.1.4. Material für Färbungen, Immunisierungen, Chemotaxisassay, etc.

Paraformaldehyd	Merck
Ovalbumin (Huhn)	(Sigma-Aldrich)
Alum [®] (Aluminium-Magnesiumhydroxid)	(Pierce, über Perbio Science, Bonn)
Spritzen, Kanülen	(Braun, Melsungen)
Transwell [®] -Einsätze für 24-Loch-Platten (5 µm Porendurchmesser)	Corning Costar über WCP, Berlin
TruCount [®] -Röhrchen	Becton Dickinson
Heparinröhrchen zur Blutentnahme	Becton Dickinson
2,4-Dinitrofluorobenzol (DNFB)	Sigma-Aldrich
Radioisotop ⁵¹ Cr	Amersham, Braunschweig

3.1.5. Medien und Puffer

Komplettes Medium:	Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) mit 25 mM HEPES, 10 % FCS, 50 µM Mercaptoethanol, 1 mM Na-Pyruvat, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin
„phosphate buffered saline“-Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):	8 g/l, 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 1,4 g/l Na ₂ HPO ₄ •H ₂ O
Assaymedium	RPMI1640, 5 g/l BSA
Medium für die Insektenzellkultur:	Schneiders Drosophila Medium, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 2 µg/ml Geneticin
Einfriermedium	40 % Kulturmedium, 50 % FCS, 10 % DMSO
PBS/BSA	PBS, 2 g/l BSA

PBA	PBS, 2 g/l BSA, 1 g/l AZID (NaN ₃)
Saponin-Puffer	PBS, 2 g/l BSA, 5 g/l Saponin von Quillaja Bark (SigmaAldrich)
Nycodenz-Lösung	17g Nycodenz [®] (Nycomed, Oslo, Norwegen), 26 ml RPMI1640, 10 ml FCS, ad 100 ml mit H ₂ O _{dest}

3.1.6. Versuchstiere

Es wurden ausschließlich Mäuse als Versuchstiere bzw. zur Organentnahme verwendet.

Folgende Mausinzuchtstämme wurden eingesetzt:

BALB/c, entweder vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), Berlin oder von Charles River, Sulzfeld bezogen.

129Sv, Iffa Credo, Frankreich, über Charles River, Sulzfeld (D)

DO11.10, auf BALB/c-Hintergrund, DRFZ, Berlin

129SvEv x BALB/c (defizient für CCR7, bzw Wildtyp), M. Lipp, MDC Berlin

Alle Tiere wurden unter SPF-Bedingungen gehalten.

3.2. Methoden

3.2.1. Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin

Sechs bis acht Wochen alten BALB/c-Weibchen wurden 0,2 ml Ovalbumin (Ova)-Alum[®]-Lösung (=100 µg Ova/Tier) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Die Lösung wurde wie folgt hergestellt: 1mg/ml Ova in PBS wurde in das gleiche Volumen Alum unter ständigem Rühren hineingetropt, anschließend noch für weitere 30 min gerührt und frisch verwendet. Die Sekundärimmunisierung erfolgte drei bis neun Wochen nach der Primärimmunisierung. Hierfür wurden 50 µg Ova in PBS in einem Volumen von 50 µl mit einer 0,4 mm Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene injiziert. Die Zellen wurden stets 4d nach Sekundärimmunisierung isoliert.

3.2.2. Induktion einer Hautentzündung

Um eine DTH-ähnliche Entzündung zu erhalten, wurde das Abdomen von BALB/c-Mäusen rasiert und 25 µl einer 0,5 %-igen DNFB-Lösung, bestehend aus 75 % Aceton und 25 % Olivenöl, aufgetragen. Eine frisch angesetzte Lösung wurde am Folgetag erneut aufgetragen. Drei Wochen später wurden die Flanken der Tiere rasiert und auf einer Seite wurde die DNFB-Lösung aufgetragen. Das betroffene Hautareal entwickelte einige Stunden nach erstmaliger Auftragung Anzeichen einer akuten Entzündung. Einen Tag nach letztem Auftragen wurden die Tiere im Homing-Assay (siehe 3.2.10.) verwendet. Die unbehandelte rasierte Flanke der Gegenseite fungierte als Kontrollhaut.

3.2.3. Isolation mononukleärer Zellen aus der Maus

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und der Tierkörper ausgiebig mit 70 %igem Ethanol besprüht. Zur Lymphozytenisolation aus der Milz wurde nach stumpfer Abhebung der Haut vom darunterliegenden Gewebe die Bauchhöhle in der *Linea alba* geöffnet und die Milz entnommen. Zur Isolation von Zellen aus Lymphknoten wurden vor Eröffnung der Bauchhöhle die unter der Haut befindlichen Lymphknoten (im Folgenden als „periphere Lymphknoten“ bezeichnet) entnommen: Unterkiefer- (*Lnn mandibulares*) und Halslymphknoten (*Lnn cervicales superficiales*), die Lymphknoten des Achsellymphzentrums (*Lnn axillares et cubiti*) und die Kniefaltenlymphknoten (*Lnn subiliaci*).

Aus der Bauchhöhle wurden die Darmlymphknoten präpariert, im folgenden als „mesenteriale Lymphknoten“ bezeichnet: Hüft-, Leer- und Grimmdarmlymphknoten (*Lnn jejuni*, *Lnn iliaci*, *Lnn colici*). Häufig wurden für das Ansetzen von Th1- bzw. Th2-Kulturen zusätzlich aus Bauch- und Beckenhöhle Leber- (*Lnn hepatici*), Pankreas- (*Lnn pancreaticoduodenales*) und mittlere Darmbein- (*Lnn iliaci mediales*), seitliche Darmbein- (*Lnn iliaci laterales*) und die Darmbeinsäulenlymphknoten (*Lnn iliofemorales*) hinzugenommen.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die entnommenen Organe, nach Zerkleinerung mit einer Schere, mittels eines Spritzkolbens durch ein Metallsieb (Porengröße 75 µm) in frisches Medium gerieben.

Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden einmal mit Medium gewaschen und anschließend zur Dichtegradientenzentrifugation auf Histopaque-1083[®] geschichtet und für 20 min bei Raumtemperatur (RT), ohne Bremse bei 840g zentrifugiert. Lebende, mononukleäre Zellen sammeln sich dabei in der Interphase, in der sie abpipettiert und zweimal gewaschen wurden.

3.2.4. Isolation mononukleärer Zellen aus humanem Blut

Gesunde Probanden fungierten als Blutspender, wobei Frau Dr. med. Kaluza (DRFZ) die Blutentnahmen vornahm.

Das periphere venöse Blut wurde bereits bei der Entnahme heparinisiert und anschließend im gleichen Verhältnis mit Medium vermischt und auf eine Ficoll[®]-Lösung geschichtet; die Isolation mononukleärer Zellen erfolgte dann mittels Dichtegradientenzentrifugation, wie unter 3.2.3. letzter Absatz beschrieben.

3.2.5. Isolation mononukleärer Zellen aus murinem Blut

Die Mäuse wurden mittels Äthers in tiefe Narkose versetzt. Der Brustkorb wurde eröffnet und aus der linken Herzkammer so viel Blut wie möglich bis zum Tod des Tieres mit einer heparinisierten Spritze entnommen. Das erhaltene zentrale, arterielle Blut wurde anschließend analog dem humanem aufgearbeitet, allerdings wurde Histopaque[®]-1083 als Isolationsreagenz benutzt.

3.2.6. Anreicherung und Selektion verschiedener Lymphozytenpopulationen

Grundsätzlich unterscheidet man bei Anreicherungsverfahren für Lymphozytenpopulationen die Positivanreicherung (Selektion) und Negativanreicherung (Depletion).

3.2.5.1. Panning

Die durch Dichtezentrifugation erhaltenen mononukleären Zellen wurden beim Panning durch Depletion unerwünschter Zellen für CD4⁺ T-Zellen bzw. CD4⁺ Subpopulationen angereichert: Petrischalen wurden über Nacht mit 50 µg/ml Kaninchen-anti-Ratte Ig bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS und einmal mit Medium gewaschen. Die Zellsuspension wurde auf diese Platten gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. In diesem Schritt binden Zelloberflächen-exprimierte Ig der B-Zellen an die Maus-kreuzreaktiven anti-Ratte Ig-Ak und verbleiben auf der Platte. Ungebundene Zellen wurden entfernt und mit einer Ak-Mischung Ratte-anti-Maus-CD8 und -CD11b (Panning-Mix) inkubiert. Ak, welche nicht an die Zellen banden, wurden durch Waschen entfernt und die Zellsuspension wurde erneut auf eine solche Platte gegeben und für 15 min inkubiert. Jetzt adhären Zellen, die Ak gebunden hatten, fest an die Platte, und die erhaltene Suspension ungebundener Zellen konnte auf ihre Reinheit überprüft werden. Je nach Zweck wurden zusätzlich auch anti-CD25 (für die Gewinnung naiver T-Zellen durch Depletion aktivierter Zellen), anti-FcγRII+III (Depletion von NK-, B-Zellen und Makrophagen) bzw. anti-CD62L (Anreicherung von Memory T-Zellen durch Depletion naiver Zellen) in den Panning-Mix gegeben.

3.2.6.2. Magnetische Zellsortierung (MACS[®])

Die zu sortierenden Zellen wurden nach Anweisung des Herstellers mit Ak, an die magnetische Mikro-Kügelchen (Beads) gekoppelt sind, inkubiert, mit PBS/BSA gewaschen und auf eine ferromagnetische Säule (LS- bzw. BS- oder CS-, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) in ein Magnetfeld gegeben. Durch Spülen der Säule mit PBS/BSA wurden ungebundene Zellen ausgewaschen, und Beads-tragende Zellen verblieben dort. Jetzt konnte man entweder ungebundene Zellen auffangen, die depletiert von unerwünschten Zellpopulationen sein sollten, oder die Säule nach Entfernung aus dem Magnetfeld, eluieren um gebundene selektionierte Zellen zu erhalten. Mit dieser Methode wurden naive T-Zellen mittels Selektion für CD62L und APC durch CD90-Depletion sortiert. Die Überprüfung der Reinheit von sortierten Zellpopulationen erfolgte im FACS.

3.2.6.3. Zellisolation für Chemotaxisassays

Für die meisten Chemotaxisassays wurden Milzzellen aus BALB/c-Mäusen verwendet. Die Milzzellen wurden durch Panning für CD4⁺ angereichert, wobei B-Zellen, Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen durch Verwendung von anti-CD11b, anti-CD8 und anti-Ratte-Ig depletiert wurden. Wenn die Zytokinproduktion migrierter Zellen analysiert werden sollte, wurde auch anti-CD62L (1,5 µg/ml) hinzugefügt, um einen Teil der naiven Zellen zu depletieren und damit eine höhere Frequenz zytokinproduzierender Effektor/Memory T-Zellen zu erhalten. Die eingesetzte CD4⁺ T-Zellpopulation exprimierte nur noch zu ca. 50 % CD62L.

Kulturzellen wurden vor Einsatz einer Dichtezentrifugation mit Nykodenz-Lösung oder Histopaque-1083 ausgesetzt, um tote Zellen abzutrennen und eine größere Waschwirkung zu erzielen. Nach darauffolgender zweimaliger Waschung mit Medium wurden auch diese Zellen eingesetzt. Humane Zellen aus dem peripheren Blut wurden in gleicher Weise behandelt (Dichtezentrifugation + Waschung).

3.2.7. Zellkultur

3.2.7.1. Th1- und Th2-Kultur

Zur Induktion von Th1- und Th2-polarisierten Zellen fanden zwei Verfahren Anwendung:

1. die polyklonale Aktivierung von T-Zellen mittels anti-CD3- und anti-CD28-Stimulation
2. die Aktivierung TCR-transgener T-Zellen mit APC und dem entsprechendem Peptid

ad 1:

Ak gegen CD3 (3 µg/ml) und CD28 (5 µg/ml) in PBS wurden über Nacht bei 4°C auf 24-Loch-Platten verbracht, am Folgetag benutzt und dafür dreimal mit PBS sowie einmal mit Medium gewaschen.

Die naiv- (MACS) und CD4⁺ (Panning) -sortierten T-Zellen aus Milz und/oder Lnn wurden in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml auf die Platte gegeben, am Tag 3 der Kultur von der Platte in eine 6-Loch-Platte überführt und dabei im Verhältnis 1:3-4 gesplittet.

ad 2:

Als TCR-tg Tiere fanden DO11.10-Mäuse Anwendung. Ca. 50 % der CD4⁺ T-Zellen dieser Tiere tragen zusätzlich einen TCR, der Ova₃₂₃₋₃₃₉ auf MHCII (I-A^d) präsentiert erkennt. Die T-Zellen aus diesen Mäusen wurden aus den Lnn präpariert, während die APC den Milzen dieser Tiere und weiterer BALB/c-Mäuse entnommen wurden. Naive T-Zellen wurden wie für 1. aufgereinigt (CD4-Panning und anschließende Selektion für CD62L^{high} (high = hoch-exprimierend für CD62L, im Gegensatz zu low = niedrig-exprimierend, mittels MACS). Zur Gewinnung von APC wurden die Milzzellen mittels MACS, CD90 depletiert und anschließend mit 30 Gy in einer Bestrahlungsanlage (γ-Strahler) bestrahlt. Die Bestrahlung verhindert, dass sich die Zellen weiter teilen. Die APC wurden im Anschluss noch einmal mit Medium gewaschen, um die Konzentration freier Radikale, welche im Bestrahlungsprozess entstehen, zu minimieren. Zu einer T-Zelle gesellten sich zwei bis drei APC. Diese Zellmischung wurde in einer Gesamtzellkonzentration von 2x10⁶/ml auf 24-Loch-Platten verteilt. Splitten fand analog der polyklonalen Aktivierung Anwendung.

Polarisierende Medien:

Th1

IFN-γ, 20 ng/ml

IL-12, 5 ng/ml

anti-IL-4, 5 µg/ml

Th2

IL-4, 20 ng/ml

anti-IL-12, 5 µg/ml

anti-IFN-γ, 5 µg/ml

Im TCR-tg-System wurden noch jeweils 0,5 µM Ova₃₂₃₋₃₃₉ hinzugefügt. Die Kultivierung der T-Zellkulturen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂, in feuchter Atmosphäre im Inkubator (Heraeus, Hanau).

3.2.7.2 Kultivierung von Schneider-2-TARC Insektenzellen

Zur Gewinnung von rekombinantem murinen CCL17 (TARC) wurde eine transfizierte Insektenzelllinie kultiviert.

Die semiadhärente Zelllinie Schneider-2-TARC stammt von der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und ist unter dem Metalloproteasen-Promoter stabil mit murinem CCL17-Flag-Konstrukt transfiziert (134). Die Kultivierung fand in oberflächenbehandelten Zellkulturflaschen in einem Inkubator bei 27°C statt. Bis zum ersten Splitten wuchs die Linie adhärent, nach erster Ablösung mittels Zellschabers erfolgte das Wachstum in Suspension, wo die Zelldichte 1×10^6 /ml nicht überschritten wurde. Auch musste der pH-Wert des Insektenzellmediums (Schneider's Drosophila Medium, Zusätze) regelmäßig geprüft und ggf. das Medium gewechselt werden, da das Wachstum der Zelllinie bei $\text{pH} < 7$ eingestellt wird. Zur Induktion von CCL17 wurden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 /ml in Insektenzellmedium mit 1 % FCS und 1mM CuSO_4 für 4 Tage kultiviert. Danach wurde der Überstand abzentrifugiert, filtriert und im DRFZ von Frau Dr. Hecker-Kia mittels einer Flag-Säule (Sigma-Aldrich) aufgereinigt, auf Reinheit geprüft und erneut filtriert.

3.2.7.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese zu 1×10^7 /ml in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert und zu 1-1,5 ml in Cryo-Röhrchen für 24h bei -80°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen zur Daueraufbewahrung in flüssigen N_2 verbracht.

3.2.8. FACS-Färbung und -Analyse

3.2.8.1 Oberflächenfärbung

Mit der Oberflächenfärbung werden Moleküle auf der Zelle angefärbt, die unterschiedliche Entwicklungsstadien/-linien von Leukozyten repräsentieren oder distinkte Funktionen haben, weshalb sie ursprünglich als Differenzierungs-Ag bezeichnet wurden. Gruppen von Ak, die das gleiche Differenzierungs-Ag erkennen, definieren ein „cluster of differentiation“ („CD“).

Für die Färbung wurden die Zellen zu ca. 1×10^6 /Probe in FACS-Röhrchen oder Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und herunterzentrifugiert (300g). Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden Mauszellen mit blockierendem anti-Fc γ RII/III (1 μ g/Probe) und Ratten-IgG in 10 μ l PBA 5 min vorinkubiert. Humane Zellen wurden mit humanem IgG

(Beriglobin[®]) und murinem IgG in 10 µl l PBA ebenfalls 5 min vorinkubiert. Anschließend wurden zu den Zellen 90 ml Färbelösung gegeben, die Suspension 15 min auf Eis inkubiert, danach mit PBA gewaschen und darin aufgenommen. Wenn ein Sekundärreagenz bzw. -Ak Anwendung fand, so wurde dies nach gleichem Protokoll durchgeführt. Die ideale Konzentration der Farbe-Ak wurde in Vorversuchen durch Titration bestimmt.

3.2.8.2. Stimulation mit PMA/Ionomycin und intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Die intrazelluläre Färbung fand Anwendung, um von der Zelle produzierte Zytokine detektieren zu können. Da fast keine T-Zelle spontan *ex vivo* Zytokine exprimiert, müssen die Zellen zuvor stimuliert werden.

Hiefür wurden die Zellen zu 2×10^6 /ml in Medium aufgenommen, das zuvor mit 10 ng/ml Phorbol-myristat-Azetat (PMA) und 500 ng/ml Ionomycin angereichert wurde. Für 4h wurden die Zellen damit bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert und nach 2h Brefeldin A (10 µg/ml) hinzugegeben. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal gewaschen, Oberflächen-gefärbt und anschließend für 20 min mit 2 % Paraformaldehyd/PBS fixiert. Nach der Fixierung konnten die Zellen abzentrifugiert und in PBA resuspendiert werden. Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen wieder abzentrifugiert und zur Reduktion unspezifischer Bindungen mit 10 µl Ratten-IgG (murine Zellen) bzw. Maus-IgG (humane Zellen) in Saponin-Puffer 5 min vorinkubiert, bevor die Färbelösung in Saponin-Puffer hinzugegeben wurde. Das Waschen der Zellen erfolgte ebenfalls mit Saponinpuffer. Nach Beendigung der Färbeprozedur wurden die Zellen in PBA aufgenommen.

Als Kontrolle wurden Ak aus der entsprechenden Spezies und des gleichen Isotyps wie die Farbe-Ak verwendet (Isotypkontrolle). Die Spezifität der Färbungen des humanen IFN-γ und des murinen IL-4 wurden durch einen 100-fachen Überschuss an ungekoppelten Ak kontrolliert.

3.2.8.3. Detektion von Oberflächen-CCR7 kombiniert mit intrazellulärer Zytokinfärbung

Für die simultane Bestimmung von Oberflächen-CCR7 und intrazellulärer Zytokinexpression wurden entweder T-Zellen aus humanem Blut oder murine Milzzellen positiv für CD4-

mittels MACS[®] -Technologie aufgereinigt. Die erhaltenen Populationen waren $\geq 98\%$ CD4⁺. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin wurden humane T-Zellen mit monoklonalem anti-CCR7-Ak und murine T-Zellen mit an humanes Fc γ -gekoppeltes murines CCL19 zur Detektion von Oberflächen-CCR7 gefärbt. Danach erfolgte Färbung mit anti-Ratte-IgG (humane Zellen) bzw. anti-human-IgG (murine Zellen). Zur Überprüfung der Spezifität der CCL19-Fc-Bindung wurden analog CCR7-defiziente Zellen gefärbt oder die Färbung durch Vorinkubation mit 5 $\mu\text{g/ml}$ rekombinantes CCL19 blockiert. Nach erfolgter Oberflächenfärbung wurden die Zellen fixiert und, wie oben beschrieben, intrazellulär für Zytokine angefärbt.

verwendetes Konjugat	Anregung bei Wellenlänge λ (nm)	Emission bei λ (nm)
FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat)	495	519
PE (R-Phycoerythrin)	498, 565	578
PerCP (Perindin-Chlorophyll - Protein)	488	695
Cychrome	498	670
APC (Allophycocyanin)	650	660
Cy5 (Indodicarbocyanin)	650	670

Tabelle 3: Verwendete Fluoreszenzkonjugate und ihre Anregungs- und Emissionsspektren.

3.2.8.4. Messung und Analyse

Für die Messung wurde ein FACS-Calibur[®] (Becton Dickinson) und CellQuest[®] (Becton Dickinson) -software zur Analyse benutzt. Bei jeder Messung wurden mindestens 3×10^4 der

Zielzellen (in der Regel CD4⁺) gespeichert. Bei Messung unfixierter Zellen wurden tote Zellen durch Propidium-Jodid- (PI) Anfärbung von der Analyse ausgeschlossen. Lebende Lymphozyten wurden durch ihre Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtintensitäten im Zweiparameter-Punktdiagramm (Dot Plot) erkannt. Zur Bestimmung der Ak-positiven Zellen wurde die Fluoreszenzintensitätsverteilung der Negativkontrollen als Dot Plot aufgetragen. Mit Hilfe eines Quadrantenkreuzes wurde der Bereich festgelegt, in dem negative Zellen liegen. Alle Zellen mit höherer Fluoreszenzintensität galten als positiv für das gefärbte Ag. Die in Tabelle 3 aufgelisteten Fluoreszenzkonjugate kamen in der Arbeit zur Anwendung.

3.2.9. Chemotaxisassay

Zur Bestimmung des chemotaktischen Verhaltens von T-Zellsubpopulationen zu verschiedenen Chemokinen wurde das Transwell[®]-System von Corning Costar gewählt. Hier wird eine normale 24-Loch-Platte durch einen Einsatz in eine obere und eine untere Kammer über eine Membran getrennt. Die Membran der Einsätze verfügt über Poren von 5 µm Durchmesser. Die Einsätze wurden beschichtet, indem 10 µg/ml Fibronectin in destilliertem Wasser aufgebracht wurden. Die Platten wurden 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die Fibronectinlösung wieder abgesaugt. Zum Trocknen wurden die Platten für 2h bei 27°C in einen Inkubator ohne Begasung oder Wasserdampf verbracht. Parallel dazu wurden die Zellen aufbereitet.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 5x10⁶/ml in Assaymedium resuspendiert und 100 µl der Suspension (5x10⁵) in die obere Kammer des Transwells[®] pipettiert, nachdem in die untere 600 µl Assaymedium oder mit Chemokin-supplementiertes Assaymedium gegeben worden war. Für die Bestimmung der Zahl eingesetzter Zellen (Input) wurden 100 µl der Ausgangssuspension direkt in ein mit 500 µl Assaymedium gefülltes Loch auf der 24-Loch-Platte ohne Transwell[®]-Einsatz überführt. Während einer 90 minütigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ konnten reaktive Zellen durch die Membran in die untere Kammer migrieren. Für Assays, in denen der Zytokinphänotyp der Zellen bestimmt wurde, kamen die Chemokine in folgenden Konzentrationen zur Anwendung: murines CCL19, 10 nM; murines CCL21, 100 nM; murines CCL17, 100 nM; murines CXCL9, 100 nM; murines CXCL12, 10 nM; murines CXCL13, 300 nM; humanes CCL19, 300 nM.

3.2.9.1 Quantifizierung

Zur Quantifizierung wurden aus der unteren Kammer 5/6 der Zellsuspension nach sorgfältiger Resuspendierung entnommen und in ein TruCount[®]-Röhrchen überführt. Analog wurde mit den Zellen für die Bestimmung des Inputs (Input = Anzahl der eingesetzten Zellen) verfahren. Je drei Ansätze pro Chemokin bzw. Chemokinkonzentration und Input wurden in folgendem Verfahren ausgezählt: Zu der in TruCount[®]-Röhrchen überführten Zellsuspension wurden nach Anweisung des Herstellers Ak gegen CD4, teilweise auch gleichzeitig gegen CD62L oder CD3 hinzugegeben. Ohne Waschen erfolgte anschließend die Zählung im FACS. Die TruCount[®]-Röhrchen enthalten eine vom Hersteller angegebene Anzahl an Zählbeads, die sich im FACS durch ihre starke Fluoreszenzintensität in FL1-3 (FL, Fluoreszenz-Detektionskanal eines bestimmten Wellenlängenbereiches) auszeichnen. Im FACS lassen sich so eindeutig Beads und Zielzellen identifizieren (Abb. 3). Durch Auszählung von mindestens 3 000 Zielzellen und 5 000 Beads pro Probe konnte die absolute Zahl der Zielzellen bestimmt werden (Anzahl CD4^+ der Probe = Ereignisse in G3/ Ereignisse in G2 x Gesamtzahl der Beads; $G3=R3$, $G2=R1+R2$). Die Anzahl der in den Regionen (R bzw. G) vorhandenen Ereignisse wurde durch das Programm CellQuest[®] (Becton Dickinson) bestimmt. Für die Bestimmung der Migration von Zytokinproduzenten wurden 5-36 Löcher migrierter Zellen zusammengeführt, mit PMA/Ionomycin stimuliert und durch intrazelluläre Färbung von IL-4, IL-10 und IFN- γ die Frequenzen positiver Zellen ermittelt. Gleichzeitig wurde jeweils ein Aliquot Input-Zellen analysiert. Die erhaltenen Frequenzen wurden in absolute Zahlen umgerechnet und im weiteren als % von Input der entsprechenden Zytokinsubpopulation ausgedrückt. Sämtliche Rechenschritte erfolgten mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft).

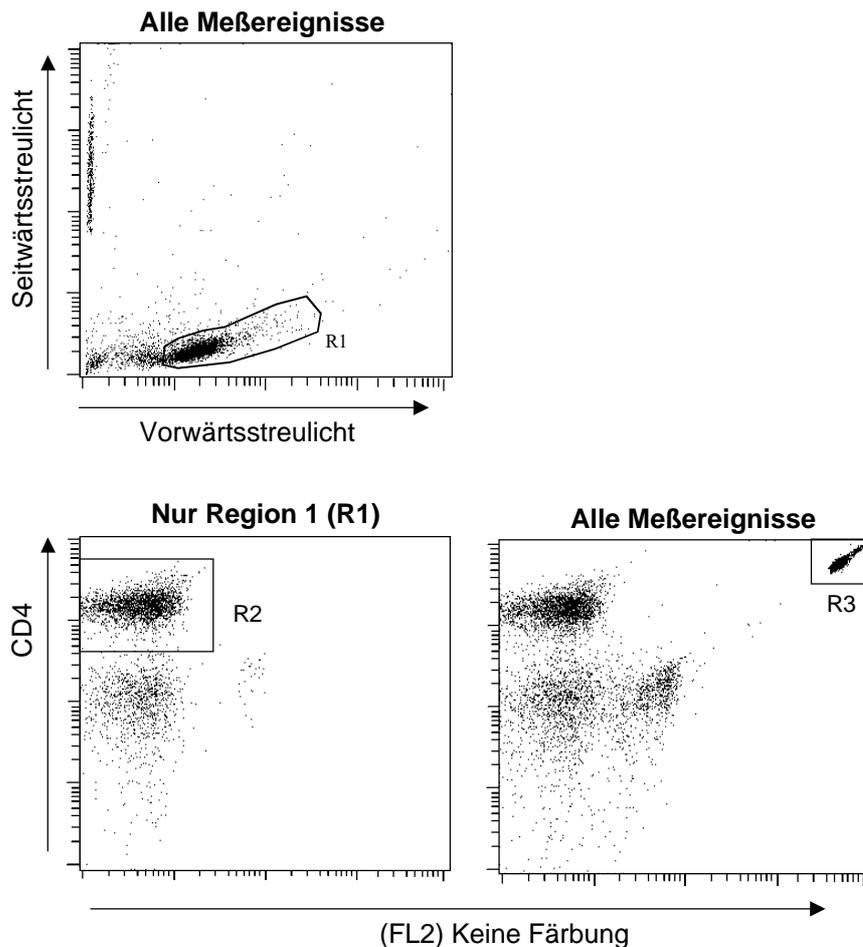


Abbildung 3: Quantifizierung einer Probe mittels Zählbeads und CD4-Färbung im FACS.

Das obere Zweiparameter-Punktdiagramm (Dot Plot) zeigt die Vorwärts- gegen Seitwärts - Streulichteigenschaften aller Messereignisse einer Probe. Auf Grund der typischen Streulichteigenschaften von Lymphozyten wurde die Region 1 (R1) festgelegt, welche somit auch alle CD4⁺ T-Zellen enthalten sollte. Die unteren Dot Plots zeigen die Fluoreszenzintensitäten in FL2 (X-Achse) und FL3 (Y-Achse) der gleichen Probe. Hier wurde ein in FL3 leuchtender CD4-Ak verwendet (Cychrome). Im linken unteren Dot Plot ist nur R1 dargestellt. Es lassen sich eindeutig die CD4-positiven Lymphozyten aus R1 erkennen, die mit R2 festgelegt wurden. Der rechte untere Dot plot zeigt alle Messereignisse, wobei sich hier die in FL2 und FL3 hochpositiven Zählbeads eindeutig erkennen lassen (R3), die auf Grund ihrer zu Lymphozyten stark unterschiedlichen Vorwärts- und Seitwärtsstreulichteigenschaften nicht in R1 befinden und deshalb nur im rechten Dot Plot zu finden sind.

3.2.10. Homing-Assay

Hier wurden Th1-Zellen an Tag 6 der Kultur mit 20 µCi ⁵¹Cr-chromat für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend mit Medium gewaschen. Danach wurden über einen

Nykodenzgradienten tote Zellen abgetrennt. Die erhaltenen Zellen wurden in PBS resuspendiert und ca. 1×10^6 Zellen pro Tier in die laterale Schwanzvene injiziert. Nach 3h wurden die Tiere mit Äther betäubt und durch Blutentzug aus der *Arteria carotis* getötet. Im Anschluss wurden folgende Organe präpariert: periphere Lnn, mesenteriale Lnn, Peyer'sche Plaques, Darm, Milz, Leber, Lunge, je ein 2,5 cm²-großes Stück entzündetes und nicht-entzündetes Hautareal. Das Blut, alle präparierten Organe und der „Restkörper“, ohne den Schwanz (Injektionsstelle!), wurden zur Bestimmung ihres Gehaltes an Radioaktivität in einem Gammastrahlenmessgerät (gammaCounter, Packard, Wallac) analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Excel, wobei die Radioaktivität der Einzelorgane in Bezug zur gemessenen Gesamtradioaktivität (100 %) pro Tier gesetzt wurde. Pro Gruppe wurden jeweils sechs Tiere pro Versuch analysiert.

3.2.11. Grafische Darstellung und Statistik

Alle Graphen wurden mit den Programmen GraphPadPrism und S-Plus erstellt. Die Arbeit mit S-Plus fand unter Mitarbeit von Frau Dörte Huscher (DRFZ) statt. Ergebnisse, die nicht als Einzelwerte, sondern als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) abgebildet sind, finden sich im Tabellenanhang als Einzelwerte. Um Unterschiede zwischen Gruppen im Homing-Assay zu detektieren, wurde unter Anleitung von Frau D. Huscher, der Mann-Whitney-U Test verwendet. Wenn $p < 0,05$, wurden Unterschiede als signifikant angesehen.