

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Ch. P. Speer**

**Nachweis von Blimp-1 mRNA und Protein in humanen T-Zell-
Subpopulationen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von
Stephan Christian Rauthe
aus Giessen / Lahn**

Würzburg, März 2008

Referent: Professor Dr. med. H. W. Kreth

Korreferent: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 2008

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Fragestellung	1
1.1.	Ziele der vorliegenden Dissertation	3
2.	Material und Methoden	5
2.1.	Zellen	5
2.1.1.	Humane Lymphozyten	5
2.1.2.	Humane Zelllinien	5
2.2.	Labormaterialien und Geräte	5
2.2.1.	Antibiotika	5
2.2.2.	Antikörper für Durchflusszytometrie	6
2.2.3.	Antikörper für Immunzytochemie und Blocking-Polymere	6
2.2.4.	Antikörper für Magnetische Zellsortierung (MACS)	7
2.2.5.	Immunzytochemie-Färbung	7
2.2.6.	Medien und Puffer	7
2.2.7.	Mitogene und zellaktivierende Substanzen	8
2.2.8.	Nukleotide und Primer	9
2.2.9.	Seren	9
2.2.10.	Sonstiges	9
2.2.11.	Geräte und Software	10
2.3.	Methoden	11
2.3.1.	Lymphozytenisolierung aus Heparinblut	11
2.3.2.	Ermittlung der Zellzahl	12
2.3.3.	Anreicherung von Lymphozytensubpopulationen durch MACS	12
2.3.4.	Zellkultur und Stimulation	13
2.3.4.1.	Zellen für Molekularbiologie	13
2.3.4.2.	Zellen für Immunzytochemie	14
2.3.5.	Analysen und Zellseparierung mittels Durchflusszytometrie	14
2.3.5.1.	Prinzip der Durchflusszytometrie	15
2.3.5.2.	Zellfärbungen für qualitative Analyse	16
2.3.5.3.	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)	16
2.3.6.	Molekularbiologische Methoden	17
2.3.6.1.	RNA-Isolierung	17
2.3.6.2.	cDNA-Synthese und PCR	18

2.3.6.3.	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.3.6.4.	Kapillarsequenzierung der PCR-Produkte	19
2.3.7.	Herstellung der Cytospin-Präparate	21
2.3.8.	Immunzytochemische Färbung	22
2.3.8.1.	Referenzfärbungen	23
2.3.8.2.	Färbungen zum Nachweis von Blimp-1 Protein	23
2.3.8.3.	Färbeprozess	24
2.3.9.	Betrachtung der Färbungen mittels Phasenkontrastmikroskopie	25
2.3.10.	Digitale Mikrophotographie	25
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Methoden zu Anreicherung von T- und B-Zellen	27
3.2.	Reinheitsgrad der mittels MACS angereicherten Zellen	28
3.3.	Reinheitsgrad der CD45RA-positiven und -negativen T-Zellen nach FACS-Sorting	29
3.4.	Expression von Blimp-1 mRNA in humanen B- und T-Lymphozyten und in Jurkat-Zellen	30
3.5.	Kapillarsequenzierung der PCR-Produkte	31
3.6.	Expression von Blimp-1 in T-Zell-Subpopulationen	33
3.7.	Beurteilung der immunzytochemischen Färbungen	35
3.7.1.	Referenzfärbungen	35
3.7.2.	Färbungen zum Nachweis von Blimp-1 Protein	36
4.	Diskussion	38
5.	Zusammenfassung	44
6.	Anhang: Mikrofotographien	46
7.	Abkürzungsverzeichnis	53
8.	Literaturverzeichnis	55

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Ursprünglich wurde der Transkriptions-Repressor „B lymphocyte induced maturation protein-1“ (Blimp-1) des Mausgenoms oder das menschliche Ortholog PRDI-BF1 (positive regulatory domain binding factor -1; Huang 1994) als charakteristisch für gut differenzierte B- und Plasmazellen beschrieben (Turner et al. 1994). PRDI-BF1 wurde auch als Antwort auf eine virale Infektion angesehen, als Repressor des IFNB1 (interferon beta -1) - Gens, welches für Interferon- β kodiert (Keller and Maniatis 1992). Es folgten nach Erstbeschreibung genauere Untersuchungen an verschiedenen murinen und humanen Zellarten auf Blimp-1 - Expression, in der Hoffnung, mehr über die Funktion zu erfahren. Man beobachtete, dass retrovirale Expression von Blimp-1 in reifen B-Zell-Linien Phänotypänderungen hervorruft, die als Differenzierung zur Plasmazelle mit Sekretion von Immunglobulin M und Heraufregulation der J-Kette einhergehen (Turner et al. 1994; Messika et al. 1998). Die Expression von Blimp-1 in unreifen B-Zellen und prä-B-Zellen kann zur Apoptose führen (Messika et al. 1998; Lin et al. 1997). Alle humanen und murinen Plasmazellen und eine Untergruppe von B-Zellen des lymphozytären Keimzentrums exprimieren Blimp-1, Memory-B-Zellen hingegen nie (Angelin-Duclos et al. 2000; Nagy et al. 2002). Ferner wurde Blimp-1 in myeloiden Zelllinien (U-937, HL-60) unter dem Einfluss von GM-CSF (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor) und in Monozyten und Granulozyten des peripheren Blutes nachgewiesen (Chang et al. 2000).

Als direkte Auswirkung von Blimp-1 hat sich eine Repression diverser proliferationssteigernder Faktoren herausgestellt. Zu nennen sind neben dem schon erwähnten humanen Beta-Interferon (Keller and Maniatis 1992) die entscheidenden Transkriptionfaktoren, die normalerweise in B-Zellen das Zellschicksal bestimmen, wie c-Myc (Lin et al. 1997), welches in Verbindung mit Mad/Max für die Regulation von Zellzyklus und Differenzierung mitbestimmend ist (Nasi et al. 2001). Außerdem gehören dazu CIITA (MHC II transactivator), Pax5, Spi-B und Id3 (Piskurich et al. 2000; Lin et al. 2002; Shaffer et al. 2002; Calame 2003). Das antiapoptotisch wirkende A1, ein Mitglied der Bcl-2- Genfamilie, wird herunterreguliert, dagegen wird Mad-4 gleichzeitig verstärkt exprimiert. (Knödel et al. 1999). Blimp-1 koordiniert also das

„Silencing“ vieler Gene, deren Expression mit dem B-Zell-Phänotyp und zellulärer Proliferation einhergeht (Shaffer et al. 2002).

Wie Blimp-1 als Transkriptions-Repressor funktioniert, könnte man sich folgendermaßen am Modell der IFNB-Genexpression vorstellen (**Abb. 1**). Erstens könnte das Blimp-1 Protein mit Interferon regulierenden Faktoren (IFRs) um die Bindung am Promotor konkurrieren. Dadurch würde die Transkription des IFNB-Gens wenige Stunden nach Aktivierung (im Rahmen einer Virusinfektion) abgeschaltet. Zweitens könnte das am Promotor gebundene Blimp-1 mit Corepressoren der Groucho-Familie und Histon-Deazetylasen (HDAC) interagieren und dieser Komplex die Histon H3-Methyltransferase rekrutieren. Durch die Methylierung von Histon H3 an der Stelle Lysin 9 (K9) würde es zu einer Veränderung der Chromatinstruktur kommen, was zu einem „Gene-Silencing“ führt.

Den letztgenannten Mechanismus könnte man sich auch für weitere Gene, wie z.B. c-Myc, CIITA, Pax5, Spi-B und andere vorstellen, deren Transkription im Rahmen der terminalen B-Zell-Differenzierung durch Blimp-1 herunterreguliert wird.

Blimp-1 kodiert für ein 98-kD großes Zinkfingerprotein vom Typ Drosophila-Krüppel. Die fünf Zink-Finger-Domänen besitzen die Fähigkeit, direkt an bestimmte DNA-Sequenzen zu binden. An dem N-terminalen Ende des Blimp-1 Proteins befindet sich eine positive regulatorische Domäne. Diese ist eine Unterklasse der SET-Domäne (SU-VAR enhancer of zeste and tri-thorax (trx)), welche als katalytisches Zentrum mit der Methylierung von Lysinresten an Histonen in Verbindung gebracht wird (Lachner and Jenuwein 2002; Kouzarides 2002). Ferner werden dazu die Histon-Deazetylase HDAC2, das Protein hGroucho und die Methyltransferase G9a benötigt (Yu et al. 2000; Ren et al. 1999; Györy et al. 2004).

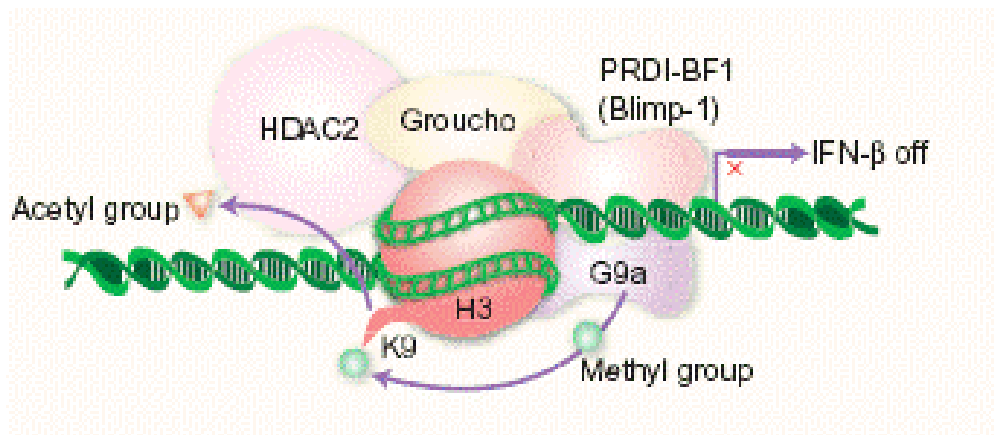


Abb. 1: Modellvorstellung zur Interaktion von Blimp-1 mit weiteren Effektorproteinen, um die Transkription des IFN β 1-Gens abzuschalten.
 HDAC2 = Histon-Deazetylase 2; H3 = Histon H3; K9 = Lysin 9 von Histon H3; G9a = Histon-Methyltransferase G9a (Makar and Wilson 2004, Györy et al. 2004).

1.1. Ziele der vorliegenden Dissertation

Von unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass B-Zellen von gesunden Probanden und Patienten mit „Common Variable Immundeficiency“, einer relativ häufigen Störung der Antikörperbildung, Blimp-1 mRNA exprimieren. Um ein starkes Signal in der RT-PCR zu erhalten, mussten die Zellen für mindestens drei Tage *in vitro* mit SAC und IL-2 vorstimuliert werden. Dabei korrelierte bei immungesunden Probanden die Blimp-1 Expression mit der Differenzierung der B-Zellen zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen.

Im Laufe der Untersuchungen wurden zufällig Jurkat-Zellen, eine humane T-Leukämie-Zelllinie, als vermeintliche Negativkontrolle für die RT-PCR verwendet. Überraschenderweise zeigten diese Zellen ein positives Signal für Blimp-1. Daraufhin wurden T-Zellen aus venösem Blut hoch aufgereinigt und für drei Tage mit Phytohämagglutinin stimuliert. Auch diese Zellen gaben ein positives Signal in Form einer Bande von 370 bp Länge.

Da nach bisherigen Literaturberichten nur (aktivierte) B-Zellen und myeloische Zellen Blimp-1 mRNA exprimieren, wurde zunächst angenommen, dass die RT-PCR aus Jurkat- und primären T-Zellen unspezifisch wäre.

In dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

Exprimieren B-Zellen, Jurkat-Zellen und primäre T-Zellen ein identisches PCR-Produkt mit Spezifität für Blimp-1?

Wenn ja, exprimieren *alle* T-Zellen Blimp-1 mRNA oder ist die Expression auf bestimmte T-Zellsubpopulationen beschränkt?

Lässt sich Blimp-1 in B- und T-Zellen auch auf Proteinebene nachweisen (im Westernblot oder in der Immunzytochemie)?

2. Material und Methoden

2.1. Zellen

2.1.1. Humane Lymphozyten

Blutspender waren gesunde erwachsenen Personen (3 Frauen, 2 Männer) im Alter von 21 bis 44 Jahren. Bei keinem der Probanden lag eine akute oder chronische Infektionskrankheit, eine Autoimmunopathie oder ein Immundefekt vor. Ihnen wurden einmalig 240 ml Venenblut entnommen, das mit verdünntem Heparin 10 I.E./ml Blut versetzt wurde. Um ein optimales Ergebnis bei der Lymphozytenisolierung zu erreichen, wurde das heparinisierte Blut zu gleichen Teilen mit serumfreiem RPMI 1640 verdünnt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die frisch gewonnenen Zellen wurden nach Isolierung sofort für die Versuche eingesetzt.

2.1.2. Zelllinien

Jurkat (humane T-Zell-Leukämie) - Zellen Immunologisches Forschungslabor,
Kinderklinik der Universität
Würzburg

Die Zellen wurden in RPMI 1640 + 10% FCS kultiviert. Für die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese wurden jeweils 5×10^6 Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase entnommen.

2.2. Labormaterialien und Geräte

2.2.1. Antibiotika

Penicillin 10.000 U/ml + Streptomycin 10.000 µg/ml Invitrogen/Karlsruhe

2.2.2. Antikörper für Durchflusszytometrie

Anti-CD3 APC	(Klon UCHT1)	Dako/Hamburg
Anti-CD4 RPE-Cy5	(Klon MT310)	Dako/Hamburg
Anti-CD8 PE	(Klon DK25)	Dako/Hamburg
Anti-CD19 APC	(Klon HD37)	Dako/Hamburg
Anti-CD20 PE	(Klon B-Ly1)	Dako/Hamburg
Anti-CD45RA FITC	(Klon 2D1)	Becton-Dickinson/Heidelberg

2.2.3. Antikörper für Immunzytochemie und Blocking-Polymere

Primärantikörper:

Anti-Blimp-1 N20 polyclonal goat-anti-human/rat/mouse	sc13203	Santa Cruz/ USA
Anti-Blimp-1 C21 polyclonal goat-anti-human/rat/mouse	sc13206	Santa Cruz/ USA
Anti-CD2 mouse-anti-human (Klon RPA-2.10)		Becton-Dickinson/ USA
Anti-CD23 mouse-anti-human (Klon M-L233)		Becton-Dickinson/ USA

Korrespondierende Blocking-Polymere:

Blocking-Polymer für Anti-Blimp-1 N20 polyclonal goat-anti-human/rat/mouse	Santa Cruz/USA
Blocking-Polymer für Anti-Blimp-1 C21 polyclonal goat-anti-human/rat/mouse	Santa Cruz/USA

Sekundärantikörper:

Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, biotinyliert	Pierce/Bonn
-----------------------------------------------	-------------

2.2.4. Antikörper für Magnetische Zellsortierung (MACS)

Anti-CD3 mouse-anti-human Micro Beads	Miltenyi Biotech/ Bergisch-Gladbach
Anti-CD4 mouse-anti-human Micro Beads	Miltenyi Biotech/ Bergisch-Gladbach
Anti-CD8 mouse-anti-human Micro Beads	Miltenyi Biotech/ Bergisch-Gladbach
Anti-CD19 mouse-anti-human Micro Beads	Miltenyi Biotech/ Bergisch-Gladbach

2.2.5. Immunzytochemie-Färbung

Ultra Vision Detection System Anti-mouse HRP/AEC	Lab Vision/Fremont/ USA
--------------------------------------------------	----------------------------

2.2.6. Medien und Puffer

PBS (Phosphate buffered saline)

8,00 g NaCl

0,20 g KCl

1,15 g Na₂HPO₄

2,00 g KH₂PO₄

1,67 g CaCl₂

1,00 g MgCl₂

0,10 g BSA

Aqua bidest ad 1000,0 ml

Waschpuffer für Immunzytochemie-Färbung

1 x PBS

0,05 % Tween 20

FACS-Puffer (entspricht Färbemedium)

1 x PBS

0,1% BSA

0,02 % Natriumazid

MACS-Puffer

1 x PBS

0,5% BSA

2,0 mM EDTA pH 8,0

Tris-Acetat-EDTA

40 mM Tris-Acetat

10 mM EDTA

Ladepuffer für DNA-Gelelektrophorese 10x

50% Glycerin

14 mM EDTA pH 8,0; 0,25% (w/v)

Bromphenolblau 0,25% (w/v)

0,25% Xylencyanol

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

Invitrogen/Karlsruhe

Komplettes Medium**RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin**

10 % FCS

1% Penicillin/Streptomycin-Lösungsgemisch 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml

Sortmedium für Zellsortierung

RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin

5% FCS

2% Penicillin/Streptomycin-Lösungsgemisch 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml

2.2.7. Mitogene und zellaktivierende Substanzen**Interleukin 2 (IL-2), human rekombinant**

Sigma/St.Louis/USA

Phytohemagglutinin (PHA-P)	Sigma/St.Louis/USA
Staphylococcus aureus Stamm Cowan (SAC)	Calbiochem/ Darmstadt

2.2.8. Nukleotide und Primer

dNTP Mix-Nukleotidzubereitung	Fermentas/St-Leon-Rot
GAPDH (Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase)	MWG Biotech/Ebersberg
sense: 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3'	
antisense: 5'-CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'	

Blimp-1 (B-lymphocyte induced maturation protein-1)	MWG Biotech/Ebersberg
sense: 5'-TTT GGA CCC CTA ATA GGT GAA ATC-3'	
antisense: 5'-CTA AAG CAA CCG AGC ACT GAG AAA-3'	

2.2.9. Seren

FCS (fötales Kälberserum)	Invitrogen/Karlsruhe
BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)	Sigma/St.Louis/USA
murines Serum	Institut für Immunbiologie und Virologie, Universität Würzburg
humanes Serum	Immunologisches Forschungslabor Kinderklinik der Universität Würzburg

2.1.9. Sonstiges

3-Aminopropylethoxysilane	Sigma/St.Louis/USA
Absolutely RNA RT-PCR Preparation Kit	Stratagene/Amsterdam
Agarose	Sigma/St.Louis/USA

Azetat 99% in 3%iger Lösung	Merck/Darmstadt
Azeton	J.T.Baker/Griesheim
BigDye Terminator Ready Reaction Kit	Applied Biosystems/Foster City, USA
Bromphenolblau	Sigma/St.Louis/USA
DEPC	Sigma/St.Louis/USA
Ethanol in 70%, 95% und 100%iger Konzentration	J.T.Baker/Griesheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma/St.Louis/USA
Ethidiumbromid	Sigma/St.Louis/USA
Ficolite H	Linaris/Wertheim
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas/St-Leon-Rot
Glycerin	Sigma/St.Louis/USA
Heparinnatrium (Liquemin)	Roche/Grenzach-Wyhlen
Kaysers Glyceringelatine Eindeckmedium	Merck/Darmstadt
MACS LS-Trennsäulen	Miltenyi/Bergisch-Gladbach
Na-acetat pH 5,2	Sigma/St.Louis/USA
Na-acetat pH 4,6	Sigma/St.Louis/USA
PANScript DNA Polymerase	PAN/Aidenbach
Trypanblau 0,4%	Sigma/St.Louis/USA
TSR (Template suppression reagent)	Applied Biosystems/Foster City/USA
TWEEN 20	Carl Roth/Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma/St.Louis/USA
Plastikwaren und Objektträger für die Mikroskopie	

2.2.11. Geräte und Software

Immunzytochemie:

Shandon CytoSpin III Zytocentrifuge
 Olympus Optical Olympus U-MD0B Mikroskop
 Sony 3CCD Color Video Digitalkamera
 Imagic Image-Access v.3.02
 Adobe Photoshop CS2

Zellseparation und Analyse:

Becton Dickinson FACSVantage Flow Cytometer

Becton Dickinson Cell-Quest Software

Molekularbiologie:

Gibco BRL Electrophoresis Power Supply PS 3003

Biometra T3 Thermocycler

Eppendorf BioPhotometer

Applied Biosystems ABI Prism 310 Kapillarsequenzierer

GeneScan Analysis Software für ABI Prism 310 Kapillarsequenzierer

2.3. Methoden

2.3.1. Lymphozytenisolierung aus Heparinblut

Je 30 ml des verdünnten Heparinblutes wurden auf je 20 ml Ficolite H in 50-ml Zentrifugationsröhrchen überschichtet. Das Prinzip der Auftrennung der Blutbestandteile über Ficolite H ist das der diskontinuierlichen Gradientenzentrifugation. Das Trennmedium hat im Bereich von 18 bis 22°C eine physikalische Dichte von $\rho = 1,077 \text{ g/cm}^3$. Zelluläre Blutbestandteile von höherer Dichte wie Erythrozyten und Granulozyten wandern durch die Zentrifugalkraft durch den Ficolite H-Gradienten hindurch und sammeln sich am Boden des Zentrifugationsröhrchens. Blutbestandteile wie Lymphozyten mit fast derselben Dichte wie das Trennmedium werden als weißer Ring über der Gradientenschicht zurückgehalten. Bei falscher Wahl der Zentrifugeneinstellung, etwa zu hoher Umdrehungszahl und damit zu hoher Zentrifugalkraft, können die Lymphozyten dennoch in den Gradienten hineingepresst werden. Umgekehrt ist bei zu geringer Umdrehungszahl ein unvollständiges Abscheiden der Erythrozyten und dadurch ein rötlich tingierter Flüssigkeitsüberstand möglich. Das Plasma-Medium-Gemisch kann infolge der geringeren Dichte als der Gradient ebenfalls nicht dessen Barriere überwinden und bleibt als Überstand mit den Thrombozyten über dem Lymphozytenring erhalten. Es entsteht somit eine vierschichtige Auftrennung in: Erythrozytensediment mit aufliegender

Granulozytenschicht, Trennmedium, Lymphozytenring und darüber Überstand aus verdünntem Plasma mit Thrombozyten. Nach der Auftrennung durch Zentrifugation bei 340 x g und 18°C über 35 min wurde der über dem Gradienten stehende weiße Lymphozytenring mit einer Pipette abgehoben und in frische 50 ml Röhrchen überführt. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift durch Verdünnung der Lymphozytensuspension mit RPMI 1640 und Zentrifugation für 10 min bei 200 x g. Dies diente der Reinigung der Zellsuspension von Filcolite H-Rückständen. Im Anschluss wurde das Zellsediment in RPMI 1640 aufgenommen.

2.3.2. Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer mit einem Volumen von 0,1 µl bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10µl Acetat 3% und 10µl Trypanblau gemischt und hiervon 10µl unter das Deckglas der Neubauer-Kammer pipettiert. Azetat lysiert in dieser Konzentration störende Erythrocytencluster und führt so zu einem übersichtlicheren Zellbild für die Auszählung. Das Trypanblau wird nur von avitalen Zellen aufgenommen und dient so zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen. In 2 bis 3 Kammerquadranten wurden unter dem Mikroskop die vitalen Zellen gezählt. Die Errechnung der Zellzahl folgte der Formel:

$[\text{Mittelwert gezählter Zellen/Quadrant}] \times [\text{Verdünnungsfaktor } 3] \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml.}$

Die Ausbeute betrug circa $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml eingesetztes Blut.

2.3.3. Anreicherung von Lymphozytenpopulationen durch MACS

Hierfür wurde das Verfahren der magnetisch assistierten Zellsortierung (MACS) im Sinne einer positiven Selektion angewendet, wobei unter Bindung von Eisenpartikel-konjugierten Antikörpern eine Auftrennung im Magnetfeld erfolgt. Man fügt den Zellen einen nach gewünschter Zellart ausgewählten Antikörper gegen ein Oberflächenmerkmal, z.B. anti-CD19 für B- und anti-CD3 (respektive anti-CD4 oder anti-CD8) für T-Zellen hinzu. Die Antikörper gehen eine Antigen-Bindung mit dem CD-Molekül ein und markieren so die Zellen eines Merkmaltyps. Die Antikörper sind bereits mit Eisenpartikeln konjugiert („Micro-Beads“), so dass die markierten Zellen

mittels eines Magnetfeldes von den unmarkierten Zellen getrennt werden können. Dies geschieht durch einen starken Magneten, der ein magnetisches Feld um eine Trennsäule entstehen lässt. Die Zellsuspension markierter und unmarkierter Zellen wird über die Säulenmatrix gegeben. Nicht- markierte Zellen, also Zellen ohne die gewünschte Oberflächeneigenschaft, werden durch Spülen der Säule ausgewaschen. Antikörperbeladene Zellen verbleiben in der Säule und können nach Ausschalten des Magnetfeldes eluiert werden.

Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Eine Zellsuspension mit 10^7 Zellen wurde durch Zentrifugation in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen pelletiert, das Pellet in 80 μ l MACS-Puffer aufgenommen und 20 μ l Micro-Beads mit Bindungsstellen für CD19 bzw. CD3 oder CD4 oder CD8 hinzugefügt. Nach Inkubation für 15 min bei 4°C und Waschen durch Zugabe eines mehrfachen Volumens MACS-Puffer und erneuter Zentrifugation erfolgte die Trennung über eine Miltenyi MS MACS Trennsäule. Markierte Zellen bleiben bei eingeschaltetem Magnetfeld in der Säulenmatrix. Nach Ausspülen der merkmalnegativen Zellen mit 2 x 5 ml MACS-Puffer wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die merkmalspositiven, antikörperbeladenen Zellen mit 2 x 3 ml Puffer, zuletzt unter Stempeldruck, eluiert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde nochmals bei eingeschaltetem Magnetfeld über dieselbe Säule pipettiert. So erzielte man bei erneutem Eluieren eine höhere Zellreinheit. Die Zentrifugation des Eluats ermöglichte das Abscheiden des MACS-Puffers und das Resuspendieren der Zellen in Kulturmedium für die Zellkultur.

2.3.4. Zellkultur und Stimulation

2.3.4.1. Zellen für Molekularbiologie

Die mittels MACS-sortierten B- und T-Zellen und T-Zell – Subpopulationen ($CD4^+$; $CD8^+$) wurden entsprechend dem nachfolgenden Protokoll jeweils über 3 Tage aktiviert. Für die molekularbiologischen Versuche mit naiven und Memory-/Effector- T-Zellen wurde, um die CD45RA/RO Ratio nicht zu verändern, keine Zellkultur mit Stimulation angesetzt.

2.3.4.2. Zellen für Immunzytochemie

In Vorversuchen zur Immunzytochemie konnte in unstimulierten Lymphozytenpopulationen kein Signal beobachtet werden. Um eine optimale Expression von Blimp-1 für die Immunzytochemie zu erreichen, wurden die durch MACS gewonnenen B-Zellen und die T-Zell-Subpopulationen ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ bzw. $CD3^+CD8^+$) in Kulturmedium aufgenommen und aktiviert. Die Zelldichte für die Kulturansätze betrug 10^6 c/ml. Die Stimulation der B-Zellen erfolgte mit SAC (20 μ g/ml) und IL-2 (500 U/ml), und die der T-Zellen mit PHA (3,0 μ g/ml) und IL-2 (500 U/ml). Die B-Zellen wurden in sterilen 50 ml-Kulturflaschen bei 37°C / 6%CO₂ / 95% Luftfeuchtigkeit für 72 h kultiviert. Für die T-Zellen wurde die Kulturzeit auf 14 h verkürzt, da durch längere Stimulation und Kultur die Vitalität litt und die stark aktivierten Zellen sich zu schwer beurteilbaren Agglomeraten zusammenballten. Abweichend von dem Vorgehen für die Molekularbiologie mussten die mittels FACS sortierten CD45RA positiven und negativen Zellen auch kurzfristig, für wenige Stunden, stimuliert werden, da sich sonst kein positives Färbeergebnis fand.

2.3.5. Analysen und Zellseparierung mittels Durchflusszytometrie

Die MACS-Trennung bietet lediglich die Möglichkeit, die Zellpopulationen nach zwei Parametern aufzutrennen – magnetisch oder nicht-magnetisch. Ein enzymatisches Entfernen der gebundenen Micro-Beads wäre zwar möglich, aber die Auftrennung nach den weiteren Markern mittels MACS wäre als Positivselektion zu aufwendig gewesen. Außerdem entstünde dadurch ein zu hoher Zellverlust. Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (FACS) können bis zu fünf verschiedene Parameter unterschieden werden: Diese Methode bot sich dadurch zur weiteren Auftrennung der $CD3^+$ -Zellen nach den Merkmalen $CD4^+CD45RA^+$, $CD4^+CD45RA^-$, und $CD8^+CD45RA^+$, $CD8^+CD45RA^-$ an.

2.3.5.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) ermöglicht die Analyse von einzelnen Zellen nach Größe und Granularität mittels eines Lasers und einer Sensoreinheit. Eine vibrierende Flusskammer unterteilt den Zellstrom durch das Analysegerät in feine Tröpfchen. Die Zellen werden einzeln vom Laser abgetastet. Der Sensor misst die von der Zellgröße abhängige Beugung des Laserlichts als Vorwärtsstreulicht („forward scatter“). Die von der Zellgranularität abhängige Brechung wird als Seitwärtsstreulicht („sideward scatter“) bezeichnet. Beide Merkmale werden quantitativ erfasst und pro einzelne Zelle als Messwertpaar in einem Punktdiagramm dargestellt. In dem Diagramm bilden sich charakteristische Punktgruppen, die den einzelnen Zellpopulationen zugeordnet werden können. Um die weiteren Messungen zu vereinfachen, kann für die zu untersuchende Zellart, in diesem Fall die Lymphozyten, das „Lymphozytengate“ ausgewählt werden. Nachfolgend untersuchte Zellen, die nicht in dieses „Gate“ fallen, werden in weiteren Messungen nicht mehr berücksichtigt. Um Oberflächenantigene zu markieren, werden entsprechende monoklonale Antikörper verwendet. Diese sind mit einem von bis zu drei durch das Gerät gleichzeitig erfassbaren Farbstoffen konjugiert. Die Fluoreszenzfarbstoffe reagieren auf Anregung durch Laserlicht mit typischen, nach dem Emissionsspektrum klar einzuordnenden Lichtemissionen. Detektoren empfangen quantitativ das charakteristische Licht und machen somit die Unterscheidung der Fluorochrome untereinander möglich. Die Einzelmesswerte werden als Zelleigenschaft im Punktdiagramm dargestellt. Zusätzlich können durch das Einsetzen von Quadranten-Analysen Aussagen über die Menge der unterschiedlichen Merkmale im Bezug zur untersuchten Gesamt-Zellmenge gemacht werden.

Zum fluoreszenzaktivierten Zellsortieren wurde ein FACSVantage-Gerät von Becton Dickinson (Pharmingen, Heidelberg) verwendet. Die Daten wurden mittels Cell-Quest Software für Apple-MacIntosh Computer ausgewertet.

2.3.5.2. Zellfärbungen für qualitative Analyse

Um die An- und Abreicherung von Zellen zu überprüfen, wurden Aliquots durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden hochangereicherte B-Zellpopulationen mit Anti-CD20 PE und Anti-CD3 APC gefärbt, hochangereicherte T-Zellpopulationen mit Anti-CD4 PE oder Anti-CD8 FITC und Anti-CD19 FITC oder Anti-CD20 PE.

Zellfärbung: 2×10^5 Zellen wurden in Färbemedium gewaschen und bei $340 \times g$ und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in Färbemedium in eine 96-well Rundboden-Mikrotiterplatte pipettiert, und die Überstände erneut verworfen. Zu den Sedimenten wurden $100 \mu\text{l}$ Antikörperverdünnung (Konzentration: $100 \mu\text{g/ml}$) hinzupipettiert, die Zellen resuspendiert, 30 min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert und dann erneut zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen wurden die Zellen in $200 \mu\text{l}$ Färbemedium in FACS-Polystyrol-Messröhrchen pipettiert und anschließend gemessen.

2.3.5.3. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Bei der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung wird ein Sortingmodul benötigt, welches die in der Flusskammer entstehenden feinen Tröpfchen elektrisch aufladen kann. Darauf werden diese computergesteuert mittels Kondensatorplatten nach den in der Durchflusszytometrie gemessenen Eigenschaften auf drei sterile Sammelgefäße sortiert. Um die Eigenschaften zu definieren, wird dem Gerät anhand der Punktdiagramme genau das erwünschte Muster von Zellmerkmalen mitgeteilt, d.h. es werden entsprechende „Gates“ gesetzt. Zellen, die in diesen Merkmalsrahmen oder „Gate“ passen, werden entsprechend gesammelt. In den insgesamt vier Separierungsversuchen wurde von einer Gesamtzellzahl von $2,35 \times 10^8$ CD3^+ -Zellen ausgegangen. Zum Zweck der FACS-Sortierung wurden die T-Zellen mit Anti-CD4 RPE-Cy5 (Konzentration $100 \mu\text{g/ml}$), Anti-CD8 PE ($100 \mu\text{g/ml}$) und Anti-CD45RA FITC ($50 \mu\text{g/ml}$) gefärbt. Dies geschah durch Zugabe aller drei Antikörperlösungen zur Zellsuspension. Nach gründlicher Durchmischung wurde diese 20 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit 20 ml FACS-Puffer entfernt. Die

Zellen wurden erneut zentrifugiert (10 min, bei 340 x g, 4°C) und durch Zugabe von Sortmedium auf eine Zelldichte von 5×10^6 c/ml eingestellt und auf schmelzendem Eis gekühlt. Darauf wurde das Sorting bei einer durchschnittlichen Flußrate von 8000 c/s durchgeführt. Es entstanden in separaten Durchläufen Zellpräparationen mit den Eigenschaften $CD4^+CD45RA^+$, $CD4^+CD45RA^-$ bzw. $CD8^+CD45RA^+$ und $CD8^+CD45RA^-$.

Die derart sortierten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Um die Qualität des Sortingergebnisses zu überprüfen, wurden Aliquots von 2×10^5 c durchflusszytometrisch re-analysiert.

2.3.6. Molekularbiologische Methoden

2.3.6.1. RNA-Isolierung

Als Ausgangsmaterial wurden $7,6$ bis $8,7 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Alle Aufreinigungsschritte wurden unter Verwendung von Handschuhen und mit als RNase-frei gekennzeichneten Laborprodukten und Reagenzien durchgeführt. Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellen wurde der Absolutely RNA RT-PCR Preparation Kit der Firma Stratagene verwendet. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Das Zellpellet wurde in $600 \mu\text{l}$ Lysepuffer (Herstellerezubereitung) und $4,2 \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol-Lösung (14,2 M) vollständig gelöst. Nach Abfiltrierung der zellulären Restbestandteile wurde die Lösung nach mehrmaligen Waschschritten mit Fertigpuffern und Digestion störender DNA-Moleküle durch DNase auf die Fibermatrix-Trennsäule gegeben. Es folgte das Auswaschen der RNA aus der Säulenmatrix mit Elutionspuffer. Danach wurde die RNA durch Zugabe von 1/10 des Eluatvolumens von 3M Na-acetat pH 5,2 und entsprechend 2,5fachem Volumen Ethanol 100% ausgefällt. Um die so gewonnene RNA konservieren und weiterverarbeiten zu können, wurde Ethanol 75% zum Waschen verwendet und nach Entfernen des Überstandes das RNA-Sediment lufttrocknen gelassen. Daraufhin wurde die RNA wieder in $20 \mu\text{l}$ (deionisiertem nucleasemfreiem) DEPC- H_2O resuspendiert. Die photometrisch bestimmte Absorption

dieser Lösung bei 230/260/280nm Lichtwellenlänge ergab eine RNA-Ausbeute von 27 bis 31 μg pro 7,6 bis 8,7 $\times 10^6$ Zellen.

2.3.6.2. cDNA-Synthese und PCR

Um DNA als Ausgangsmaterial für die Amplifizierung mittels PCR zu erhalten, wurde 1 μg gelöste RNA in komplementäre cDNA revers transkribiert. Dafür wurde ein First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) verwendet. Die genannte RNA-Menge wurde 1:1 mit 1 μg Oligo(dT)₁₈ Primern (500ng/ml) versetzt, gemischt und für 5 min bei 70°C inkubiert und sofort auf schmelzendem Eis gekühlt. Anschließend wurden 4 μl First Strand Synthesis-Puffer, 2 μl dNTP-Gemisch (200 μM) und, zur Inaktivierung von eventuell vorhandenen RNAsen, 1 μl RNase-Inhibitor 20U/ μl erst untereinander gemischt und dann zupipettiert. Zusammen mit 2 μl Reverse Transcriptase 20 U/ μl wurde das Gemisch 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das anschließende Erhitzen für 10 min auf 70°C beendete die Reaktion durch Denaturierung der Transcriptase. Die fertige cDNA konnte nun mittels PCR amplifiziert werden.

Hierzu wurde 1 μl des Produktes als Template verwendet und je nach Ansatz mit Mastermix für Blimp-1 oder das House-Keeping Gen GAPDH (Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase) angesetzt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 25 μl pro Reaktionsgefäß ergab. Je Probe wurden verwendet:

Mastermix	GAPDH	Blimp-1
10 mM dNTP	0,5 μl	0,5 μl
10x PCR-Puffer	2,5 μl	2,5 μl
MgCl ₂ 25mM	1,5 μl	1,5 μl
PANscript® DNA Polymerase	0,2 μl	0,2 μl
Sense-Primer 10mM	0,625 μl	1,25 μl
Antisense-Primer 10mM	0,625 μl	1,25 μl
AmPuWa	16,8 μl	18,05 μl

Die Ansätze wurden in Row-Tips gemischt, je ein Ansatz pro Gen wurde lediglich mit Mastermix durchgeführt, um eine Negativprobe zur Kontrolle unspezifischer Primerbindung und Amplifizierung zu erhalten. Es folgten die PCR-Schritte mit folgenden Thermocycler-Programmen:

	GAPDH (Zyklen 24)		Blimp-1 (Zyklen 35)	
	t[s]	T[°C]	t[s]	T[°C]
Aufwärmen	90	94	90	94
Zyklen	30	94	30	94
	30	63	30	58
	40	72	45	72
Kühlen/Ende	∞	4	∞	4

2.3.6.3. Agarose-Gelelektrophorese

Nach der PCR wurden die Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurde 100 ml Tris-Azetat-Puffer nach Zuwaage von 1% Volumen Agarose erhitzt und 1µl Ethidiumbromid zum Sichtbarmachen der DNA-Stränge eingerührt und daraufhin das Gel auf den Trägerschlitten gegossen. Ethidiumbromid fungiert hier als Markierungsstoff, indem es zwischen den Basen der DNA interkaliert und dort unter UV-Bestrahlung fluoreszierend sichtbar gemacht werden kann. Es wurden Proben von jeweils 4µl der Amplifizierungsprodukte und Referenzgemische mit definierten Elektrophoreseeigenschaften in das Gel eingebracht, in einer TAE-gefüllten Laufkammer unter Anlegen des Spannungsfeldes von 120 V über circa 30 min aufgetrennt und die resultierenden Fluoreszenzbanden digital unter UV-Licht fotografiert.

2.3.6.4. Kapillarsequenzierung der PCR-Produkte

Um die Identität der so gewonnenen RT-PCR-Produkte mit Blimp-1 unzweifelhaft nachzuweisen, wurden je 1 µg der aus Jurkat-, B- und T-Zellen gewonnenen DNA und je 30 ng des Forward- und Reverse-Primers zur Kapillarsequenzierung eingesetzt.

Die Kapillarsequenzierung ist eine Methode zur DNA-Sequenzbestimmung nach Frederick Sanger. Wie bei der PCR werden einer DNA-Polymerase, nach Annealing des Primers, reguläre Nukleotide zum Einbau bei Herstellung von Doppelstrang-DNA angeboten, aber auch in niedriger Konzentration fluochrommarkierte Di-deoxynucleotide, deren Einbau zu einem Kettenabbruch führt; sogenannte „kettenterminierende Di-deoxynucleotide“. Es entstehen also DNA-Stränge verschiedener Länge. Anhand der mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen versehenen Di-deoxynucleotide ist nach Längenbestimmung der DNA-Fragmente durch Elektrophorese das letzte, unter Argon-Laser fluoreszierende Nucleotid erkennbar und auf seine richtige Position festlegbar. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte aus Gründen der besseren Automatisierbarkeit in einer mit viskösem Polymer gefüllten Glaskapillare. Verwendet wurde zur Kapillarsequenzierung ein ABI Prism 310 Sequenziergerät. Dem Gemisch aus Primern, Proben-DNA und destilliertem Wasser wurden 8µl BigDyeReady Reaction Mix, in dem vorgefertigt die Polymerase (AmpliTaq), Nucleotide und Di-deoxynucleotide in Tris-HCl-Puffer pH 9,0 enthalten sind, zugefügt. Nach dem durch den Hersteller standardisierten Protokoll wurde nun eine PCR mit folgenden Zyklusparametern durchgeführt:

24 Zyklen	t[s]	T[°C]
Aufwärmen		96
Zyklen	10	96
	5	50
	240	60
Kühlen/Ende	∞	4

Um störende Signale von verbliebenen fluoreszierenden Di-deoxynucleotiden zu vermeiden, wurden die aus der PCR gewonnenen DNA-Stücke durch Zugabe von 3 µl 3M Natriumacetat pH 4,6 und 60 µl Ethanol 95% ausgefällt. Nach Zentrifugation bei 2000 x g über 30 min wurde der Überstand mit den unerwünschten Reagenzien der PCR abpipettiert und das Präzipitat am Boden des Reaktionsgefäßes mit 150 µl Ethanol 70% aufgenommen. Nach dem so erfolgten Waschen der gefällten DNA-Stücke wurde

erneut zentrifugiert bei 2000 x g über 10 min. Wieder wurde der Überstand abgenommen. Um ein Verklumpen der DNA und dadurch Verschluss der Sequenzierkapillare zu vermeiden, wurde das Pellet in 25 µl TSR (Template suppression reagent, Applied Biosystems Foster City) aufgenommen und bei 95°C über 2 min im Heizblock denaturiert, dann sofort auf schmelzendem Eis abgekühlt. Um kondensierte Flüssigkeit vom Deckel des Reaktionsgefäßes zu entfernen, wurde kurz erneut mit hoher Zentrifugalgeschwindigkeit zentrifugiert, die Probe in das Sequenzgerät geladen und der Sequenzvorgang gestartet. Mit Hilfe der GeneScan Software wurden die von den Detektoren empfangenen, vier verschiedenen Fluoreszenzsignale als Signalwelle registriert und entsprechend ihrer Wellenlänge dem Nukleotid an dieser Position zugeordnet. Es entstand also aus einer Abfolge von Signalen die Rückübersetzung in die Sequenz der DNA. Zur Identifizierung des so sequenzierten Gens wurde ein Abgleich mit der Internet-Nucleotiddatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) des „National Health Institutes“ durchgeführt. Dafür wurde ein Sequenzabschnitt in die Suchmaske des „Basic local alignment search tool“ (BLAST), verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, eingegeben und mit hier archivierten Sequenzen verglichen.

2.3.7. Herstellung der Cytospin-Präparate

Für nicht-adhärenente Zellen erweist sich zur Herstellung eines Monolayers die Cytospin-Methode gegenüber dem Ausstrich-Verfahren als vorteilhaft, da beim Cytospin durch die Methode genau vorgegebene Zellspots entstehen mit gleichmäßigerer Zellverteilung. Beim Cytospin-Verfahren wird die Zellsuspension in einen Trichter gefüllt und unter Zentrifugation auf einen unten befestigten Objektträger aufgebracht. Zwischen Träger und Trichtergrundplatte eingelegte, für den Zelldurchtritt auf den Träger gelochte Filterpapiere nehmen überschüssige Suspensionsflüssigkeit auf, sodass allein die Zellen auf dem silanüberzogenen Glas haften bleiben.

Versuche, reguläre Objektträger mit unbehandelter Glasoberfläche zu benutzen, wurden aufgrund des dabei resultierenden mangelhaften Zellbildes und schlechter Auftrennung

der Zellen, rasch verlassen. Die Zellen blieben in Clustern; vornehmlich am Rand des Zellspots entstanden dichte Konglomerate aus teilweise fragmentierten, strukturgeschädigten Zellen. Einzelzellen waren kaum beurteilbar und somit zur Färbung ungeeignet. In diesem Zusammenhang erwies sich der Gebrauch von silanisierten Objektträgern als dem Zellbild zuträglich. Zur Überschichtung der Träger wurden sie zunächst in eine 2%igen Lösung von 3-Aminopropylethoxysilane in Aceton über eine Stunde eingetaucht. Es folgte ein Waschschrift durch zweimaliges Tauchen der Träger in 99 % Aceton über je eine Stunde. Bei 56°C wurden die Träger 30 min lang im Brutschrank getrocknet.

Zum Auftragen wurden die durch MACS oder FACS sortierten Zellen pelletiert und in RPMI 1640 auf eine Konzentration von 10^6 c/ml eingestellt. Je $2,5 \times 10^5$ Zellen in 250 μ l wurden dann mittels einer Cytospin II – Zentrifuge (Shandon Inc. Pittsburgh PA) bei 20 x g über 5 min auf die Träger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

2.3.8. Immunzytochemische Färbung

Immunzytochemische Färbungen ermöglichen es, auf Grundlage von Antigen-Antikörperreaktionen Zellstrukturen erkennbar zu machen. Hierbei nutzt man enzymatisch katalysierte, chemische Farbstoffreaktionen. In vorliegenden Versuchen kam eine Peroxydase, die Horseradish-Peroxydase (HRP), zum Einsatz, welche als Chromogensubstrat 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) angeboten wurde. Bei positivem Färbeergebnis resultierte somit ein braunroter Farbaspekt. Ein entscheidender Vorteil der enzymabhängigen Methode ist die höhere Sensitivität der Applikation gegenüber dem Einsatz von fluorochromgekoppelten Antikörpern. Nachteilig wirkt hingegen die vergleichsweise geringe Spezifität, da beispielsweise endogene, zelleigene Peroxydasen das Färbeergebnis verfälschen könnten. Es ist sicher leichter, einen fluoreszierenden Spot auf dunklem Hintergrund zu erkennen, als eine enzymatische Farbreaktion auf kleinster Stelle vor diffusem Hintergrund, eventuell noch mit störender Gegenfärbung. Die Enzyme der immunzytochemischen Methode sind entweder direkt an den Primär-Antikörper gekoppelt, welcher selbst eine Bindungsstelle für das zu detektierende

Antigen besitzt, oder an den Sekundär-Ak, welcher Epitope des Primär-Antikörpers erkennt. Ein zusätzlich verstärkter Färbefeffekt resultiert, wenn man das Enzym, wie auch in vorliegender Arbeit geschehen, an Streptavidin-Moleküle bindet und diesen Streptavidin-Peroxydase-Komplex an einen biotinylierten Sekundär-Ak koppeln lässt. Solch eine Verstärkung des Farbsignals beruht auf der Tatsache, dass Biotin vier Bindungsstellen für Streptavidin besitzt, an ein Biotinmolekül also vier Streptavidin-Peroxydase-Komplexe binden und somit die Färbewirksamkeit durch die vierfache Peroxydasemenge verbessert wird. Ein weiterer Verstärker ist der Gebrauch von kompletten Antikörpern im Gegensatz zu Antikörper-Fragmenten. Komplette Antikörper bieten dem korrespondierenden Sekundär-Antikörper, bei entsprechender Immunisierung der Spenderspezies gegen aufgereinigtes IgG-Gesamtmolekül, die Möglichkeit, sowohl an Leicht- und Schwereketten des zu erkennenden Komplet-Antikörpers zu binden.

2.3.8.1. Referenzfärbungen

Als Referenzfärbungen, zur Kontrolle der Färbungsspezifität, des korrekten Ablaufs der Färbereaktion und zur Reagenztitrierung wurden zunächst Färbungen gegen CD20 als Marker für B-Zellen und gegen CD2 als Oberflächenmolekül von T-Zellen angefertigt. Da es sich bei den somit verwendeten primären Antikörpern um mouse-anti-human-Antikörper handelte, konnte das Farbe-Kit „Ultra Vision Detection System Anti-Mouse“ (Lab Vision, Freemont) mit dem enthaltenen goat-anti-mouse IgG (H+L) -Ak direkt benutzt werden.

2.3.8.2. Färbungen zum Nachweis von Blimp-1 Protein

In den Färbungen zum Nachweis von Blimp-1 wurde ein goat-anti-human Ak (H+L) verwendet. Daher wurde hier ein rabbit-anti-goat-Ak (H+L) benötigt. Der polyklonale Anti-Blimp-1-Ak kam zum Vergleich der Färbereigenschaften einerseits als Ak gegen das C21-Ende des Zielproteins, andererseits gegen den N20-Terminus zum Einsatz. Um eine optimale Negativkontrolle zu erlangen und über unspezifische und spezifische Ergebnisse klar urteilen zu können, wurde nicht nur das Protokoll nach vorheriger

Optimierung rigide befolgt, sondern auch der Primär-Ak durch spezifisches Ag (korrespondierende Blocking -Polymere) geblockt. Als zweite, weitere Negativkontrolle wurde lediglich der Sekundär-Ak respektive das Substratgemisch ohne vorheriges Aufbringen des Primärantikörpers aufpipettiert, um unspezifische Färbung durch unspezifische Bindung des Ak zu demaskieren. Somit konnten Falschfärbungen durch unspezifische Bindung von Sekundär-Ak oder Streptavidin ausgeschaltete werden. Des Weiteren wurde dem Sekundär-Ak bei Färbungen gegen Blimp-1 Mausserum zugesetzt, um trotz Prä-Absorption gegen humane Antigene solch eine Kreuzreaktion weitestgehend auszuschließen.

2.3.8.3. Färbeprozess

Nach Beginn der Färbesequenz musste ein vollkommenes Abtrocknen unbedingt vermieden werden. Zu Anfang wurden die luftgetrockneten Objektträger in einer Färbekammer mit Aceton 99% für 10 min fixiert und weitere 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Zelleigene Peroxydasen, in Lymphozyten eher von geringer Aktivität vermutbar, können ein falsch positives Ergebnis vortäuschen. Um unspezifische Färbeartefakte durch endogene Peroxydasen zu vermeiden, wurde für 10 min ein Hydrogen-Peroxide-Block (Lab Vision, Freemont, entsprechend einer 3%igen H_2O_2 -Lösung) aufgetragen. Dann wurde viermalig in Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween 20) gewaschen. Eine weitere Blocksubstanz gegen unspezifische Hintergrundfärbung, verursacht durch endogenes Biotin, wurde als Ultra-V-Block (Lab Vision, Freemont, entsprechend einem Dextranpolymer) angewendet und nach 5 min durch einen erneuten Waschschrift entfernt. Nun wurden die entsprechenden Primär-Antikörper in einer 1:25-Verdünnung in PBS aufpipettiert. Lediglich bei dem CD2 – Ak war eine Verdünnung von 1:50 bereits ausreichend.

Ein Volumen von 100 μ l Verdünnung pro Objektträger erwies sich als ideal. Der geblockte Primär-Ak wurde wie folgt auf die erwünschte Konzentration verdünnt: 1:6 mit dem Blocking-Polymere, dann nach Auffüllen des Volumens auf die Endkonzentration mit PBS ohne Serumzusatz. Die Bindungszeit für Polymer und Ak wurde nach sorgfältiger Durchmischung auf zwei Stunden festgelegt. Nach Inkubation

des Primär-Ak (1 h, RT, in abgeschlossener Kammer) wurde wieder viermal gewaschen und der biotinylierte Sekundär-Ak aufgetragen. Jener wurde als Ready-to-use-Lösung dem Färbekit entnommen oder der rabbit-anti-goat-Ak 1:25 mit PBS und 15% (anteilig am Totalvolumen) Mausserum verdünnt. Nach einer Bindungszeit von 15 min (RT, in geschlossener Kammer) wurden die Träger viermal gewaschen. Jetzt konnte der Streptavidin-HRP-Komplex aufgetropft werden und inkubieren (10 min, RT, in geschlossener Kammer). Inzwischen wurde das AEC-Chromogen mit der AEC-Substrat-Pufferlösung im Volumenverhältnis 1:20 angesetzt. Ein Zeitrahmen von 20 min nach Mischen bis zur Applikation auf den Träger durfte nicht überschritten werden, da ansonsten durch Zerfall der fertigen AEC-Komplexe das Färbeergebnis litt. Erneutes viermaliges Tauchen der Objektträger in Waschpuffer entfernte überschüssige Streptavidinkomplexe und erlaubte die Farbentwicklung durch Zugabe von AEC-Substrat-Chromogengemisch. Nach der Einwirkungszeit (8 bis 9 min) wurden die Träger vorsichtig in Waschpuffer getaucht, luftgetrocknet und sofort mit im Wasserbad erwärmter Kaysers Glyceringelatine eingedeckt.

2.3.9. Betrachtung der Färbungen mittels Phasenkontrastmikroskopie

Die immunzytochemischen Färbungen wurden nach Aushärten des Eindeckmediums unter dem Phasenkontrast-Mikroskop bei 400facher Vergrößerung betrachtet. Da zugunsten des besseren Erkennens der Positivfärbung auf eine Hämalaun oder Wright-Giemsa-Gegenfärbung verzichtet werden musste, hätte eine reguläre Durchlichtmikroskopie die Zellmorphologie kaum erkennbar werden lassen. Dieser Kompromiss, erhöhte Sensitivität durch eine etwas unzureichend beurteilbare Zellmorphologie zu erkaufen, sollte sich in der Dokumentation mittels digitaler Mikrophotographie bemerkbar machen.

2.3.10. Digitale Mikrofotographie

Dokumentiert wurden die Färbeergebnisse mit einem Mikroskop Olympus U-MD0B der Firma Olympus Optical, auf dem eine Sony 3CCD Color Video Digitalkamera installiert war. Die Vergrößerung der Aufnahmen betrug 40x. Als Software stand

Image-Access v.3.02 von Imagic-Bildverarbeitung zur Verfügung. Zur Grauwertkorrektur bei großen Vergrößerungen und Entfernung von Irisationsartefakten der aufgenommenen Bilder wurden diese behutsam mit Adobe Photoshop CS2 bearbeitet. Die genannten Artefakte entstanden zwangsläufig durch Lichtschwäche bei hohen Vergrößerungen und Streulicht von fremden Lichtquellen.

3. Ergebnisse

3.1. Methoden zur Anreicherung von B- und T-Zellen

Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL) stellen eine heterogene Zellpopulation dar. Das Zellgemisch wurde aufgetrennt in die folgenden Fraktionen: B-Zellen ($CD19^+$), gesamt-T-Zellen ($CD3^+$), Helfer-T-Zellen ($CD3^+CD4^+$) und zytotoxische T-Zellen ($CD3^+CD8^+$).

Eine weitere Auftrennung der $CD4^-$ und $CD8^-$ -positiven T-Zellen erfolgte anhand der Isoformen von $CD45$. Das Leucocyte Common Antigen ($CD45$) ist auf den im Blut zirkulierenden T-Zellen überwiegend in zwei Isoformen vertreten: Mit dem als Kennzeichen für naive T-Zellen betrachteten $CD45RA$ und mit dem Aktivierungs- und Gedächtniszell-Marker $CD45RO$. Die einzelne Zelle kann dabei immer nur eine dieser Isoformen exprimieren. Die Ratio zwischen RA^- und RO^- -positiven Zellen variiert sehr stark mit dem Alter und Infektionsstatus eines Probanden (und den Kulturbedingungen *in vitro*). Beim gesunden, infektfreien Erwachsenen sind ca. 45% der $CD4^+$ -T-Zellen RA^- -positiv und 55% RO^- -positiv, während umgekehrt bei den $CD8^+$ -T-Zellen die RA^- -positiven Zellen mit ca. 70% überwiegen.

Da die Färbung mit dem monoklonalen Antikörper gegen die Isoform $CD45RA$ besser auswertbare Ergebnisse erbrachte als die Färbungen mit dem Antikörper gegen $CD45RO$, wurde für den Versuchsaufbau $CD45RA$ als Zielmolekül gewählt. Da jede T-Zelle nur eine Isoform exprimiert, muss es sich bei der $CD45RA^-$ -negativen Population zwangsläufig um RO^- -exprimierende T-Zellen handeln. **Abb. 2** gibt einen Überblick über die verwendeten Separierungstechniken. Folgende T-Zellpopulationen wurden, da zu wenig Material zur Verfügung stand, nicht untersucht: doppelt negative ($CD4^-CD8^-$) und doppelt positive ($CD4^+CD8^+$) T-Zellen und regulatorische T-Zellen (T_{reg}).

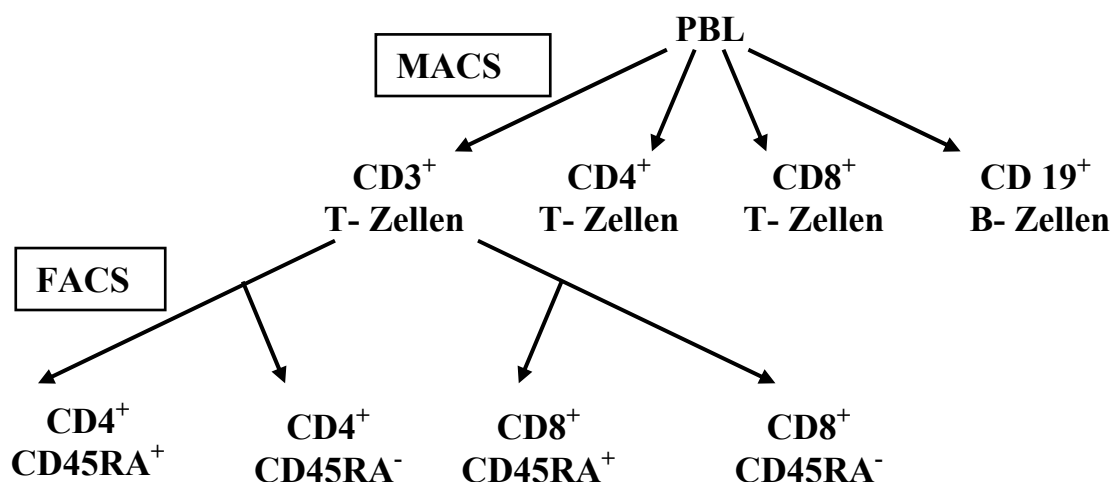


Abb. 2: Überblick über die verwendeten Separierungstechniken

3.2. Reinheitsgrad der mittels MACS sortierten Zellen

Die Kontrollfärbungen der mittels MACS angereicherten Zellen ergaben hohe Reinheitswerte.

Die hoch angereicherten B-Zellpopulationen waren mit ca. 4% T-Zellen kontaminiert, während die Kontamination der T-Zellpopulation durch B-Zellen unter 1% betrug. Die angereicherten T- und B-Zellpopulationen waren außerdem frei von myeloischen Zellen (Monozyten, Granulozyten).

Die Ergebnisse sind in **Tab. 1** dargestellt.

Tab. 1: Reinheitsgrad der mittels MACS angereicherten B- und T-Zellen (Mittelwerte \pm 1 SD aus 3 Versuchen)

Sortierungskriterium	MW \pm 1 SD [%]	Streubreite [%]	Kontamination MW [%]
CD19 ⁺	93,7 \pm 3,6	90,1 - 98,6	3,9 [CD3 ⁺]
CD3 ⁺	93,2 \pm 4,5	92,2 - 98,6	0,9 [CD19 ⁺]
CD4 ⁺	97,4 \pm 2,4	94,0 - 99,2	0,6 [CD19 ⁺]
CD8 ⁺	93,7 \pm 0,6	92,8 - 94,3	0,7 [CD19 ⁺]

3.3. Reinheitsgrad der CD45RA–positiven und –negativen T-Zellen nach FACS-Sorting

Nach dem „Fluorescence-activated-Cell-Sorting“ wurden die aufgetrennten Zellpopulationen durchflusszytometrisch re-analysiert, um den Anreicherungsgrad festzustellen. Die Re-Analyse der mittels FACS-sortierten T-Zellen eines Probanden ist beispielhaft in den Diagrammen der **Abb. 3** dargestellt

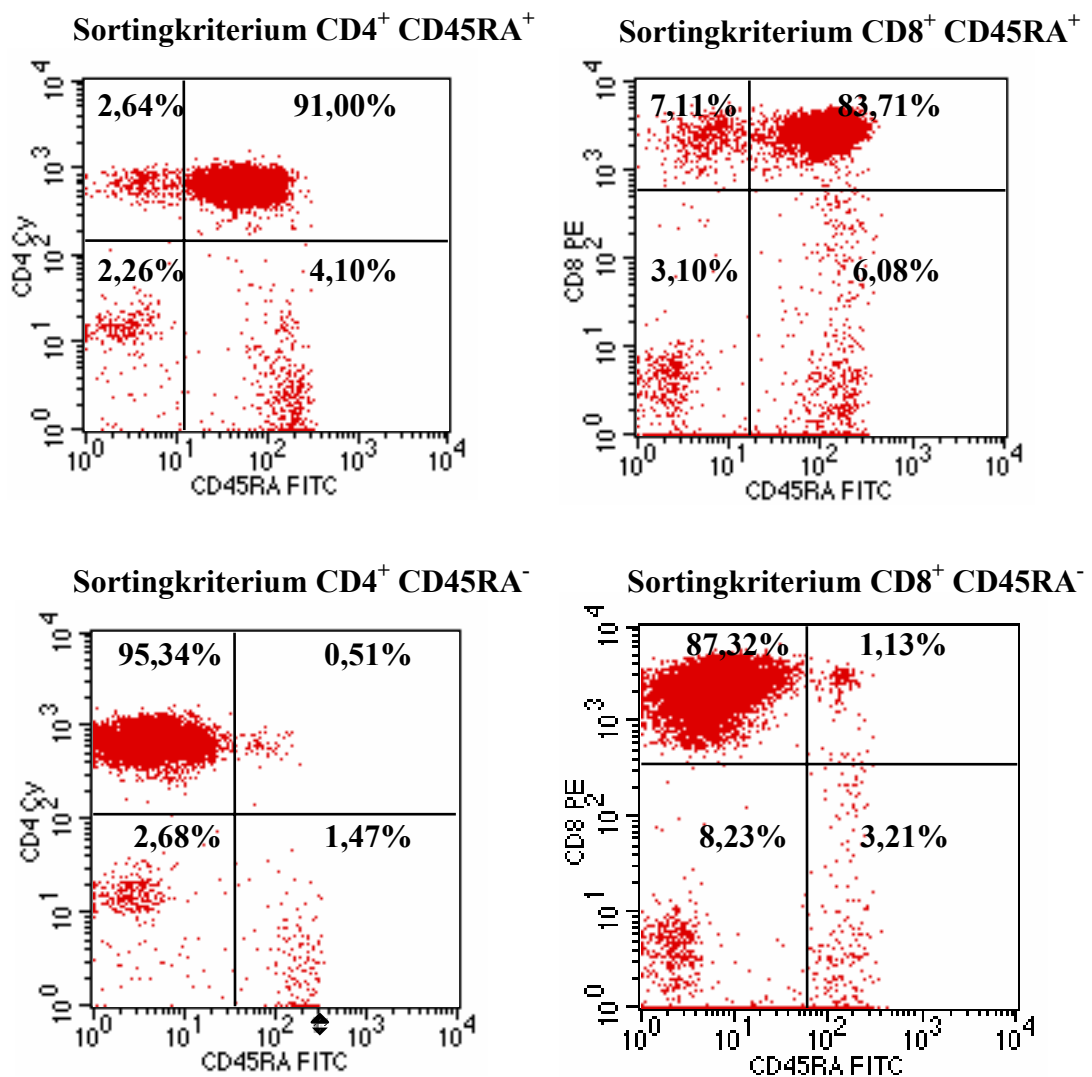


Abb. 3 Durchflusszytometrische Re-Analyse der CD4- und CD8-positiven T-Zellen eines Probanden, die mittels FACS entsprechend den Merkmalen CD45RA⁺/RA⁻ aufgetrennt wurden.

Darüber hinaus zeigt **Tab. 2** den Reinheitsgrad der aufgetrennten Subpopulationen. Die Zellfraktionen waren völlig frei von kontaminierenden B-Zellen.

Tab. 2: Reinheitsgrad der mittels MACS und FACS aufgetrennten T-Zell-Subpopulationen. (Mittelwerte \pm 1 SD aus vier Versuchen).

Sortierungskriterien	MW \pm 1 SD [%]	Streubreite [%]
CD4 ⁺ 45RA ⁺	89,0-4,5	84,5-93,5%
CD4 ⁺ 45RA ⁻	95,2-1,4	93,7-96,7%
CD8 ⁺ 45RA ⁺	84,8-1,4	83,2-86,0%
CD8 ⁺ 45RA ⁻	88,6-1,3	87,3-90,0%

3.4. Expression von Blimp-1 mRNA in humanen B- und T-Lymphozyten und Jurkat-Zellen

In unserer Arbeitsgruppe wurde zunächst die RT-PCR etabliert, um Blimp-1 mRNA in humanen B-Zellen nachzuweisen. Dazu wurden hochangereicherte (monozytenfreie) B-Zellpopulationen drei Tage lang mit SAC und IL-2 stimuliert. Es zeigte sich, dass durch Stimulation ca. 2-5 % der peripheren B-Zellen sich zu Immunglobulin-produzierenden Zellen entwickelten. Wie in **Abb. 4** an einem repräsentativen Beispiel dargestellt, konnte Blimp-1 mRNA in stimulierten B-Zellen nachgewiesen werden. Als Zufallsbefund wurde jedoch eine identische Bande von 370 bp Länge auch in Jurkat-Zellen, einer permanenten humanen T-Leukämie-Zelllinie, und in PHA-stimulierten humanen T-Zellen entdeckt.

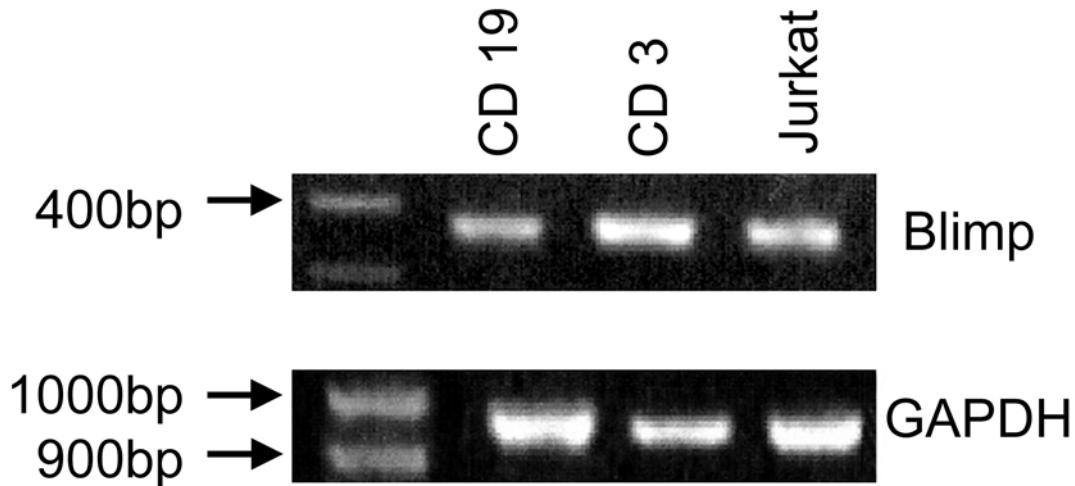


Abb. 4: Gelelektrophorese der PCR-Produkte unter UV-Licht. Darstellung einer identischen Bande von 370 bp Länge in allen drei Proben. Darunter Nachweis des House-keeping-Gens GAPDH als interne Kontrolle der RT-PCR.

3.5. Kapillarsequenzierung der PCR-Produkte

Da die Expression von Blimp-1 in T-Zellen in der Literatur bisher nicht bekannt war, wurden alle drei PCR-Produkte kapillarsequenziert, um die Spezifität der RT-PCR zu beweisen. Das Ergebnis der Kapillarsequenzierung der PCR-Produkte wurde als Fluoreszenzdiagramm mit Signal-Peaks der entsprechenden Wellenlänge (**Abb. 5**) dargestellt. Hieraus konnte die Position der jeweiligen Basen abgelesen werden. Die Peaks wiesen eine sehr gute Signalintensität auf; Überlagerungsartefakte, das heisst, zwei oder mehrere Signalwellen in Projektion auf ein und dieselbe Position (z.B. an Stelle 28 des abgebildeten Diagramms) und damit mögliche Unklarheiten in der Bestimmung des Nucleotids, kamen kaum vor. Entsprechend konnte die Computeranalyse der Sequenz nahezu vorbehaltlos übernommen werden.

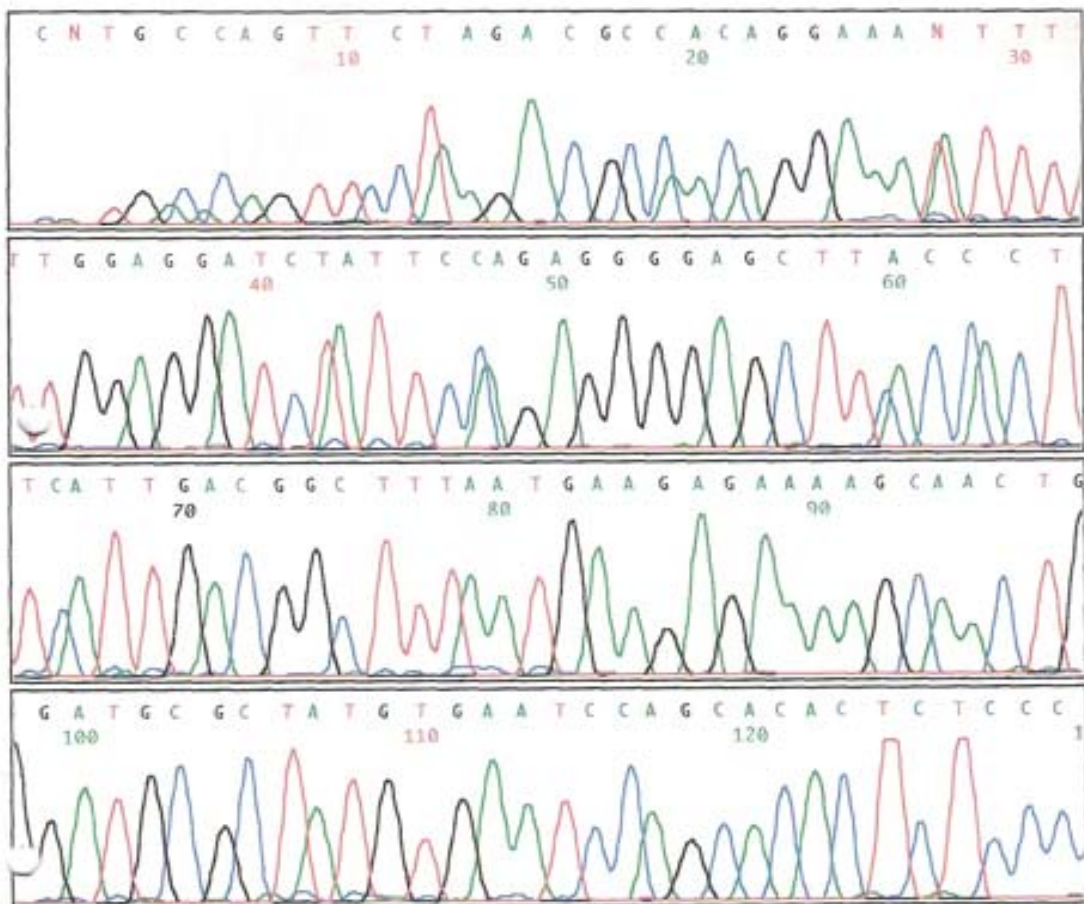


Abb. 5: Kapillarsequenzierung des PCR-Produktes aus T-Zellen: Ausschnitt der als „Peaks“ der entsprechenden Fluoreszenz dargestellten Detektorsignale, aus deren Abfolge auf die Sequenz der Probe geschlossen werden kann. Eindeutig lassen sich hier sowohl Nukleotid als auch Position ablesen.

Die Identifizierung des sequenzierten Gens mit der Nucleotiddatenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) schloss andere Gene als Ursprung der aufgefunden Sequenz aus. Somit konnte bereits aus dem abgebildeten Datensatz eine eindeutige Identität mit „Homo sapiens PR domain containing 1, with ZNF domain (PRDM1), transcript variant 1, mRNA“ (Accession-Code NM001198) abgeleitet werden.

```

> gi|33946272|ref|NM\_001198.2| U E G Homo sapiens PR domain containing 1, with ZNF domain (PRDM1),
transcript variant 1, mRNA
Length=5165

Score = 236 bits (119), Expect = 1e-59
Identities = 119/119 (100%), Gaps = 0/119 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   ACGCCAACAGGAAATATTTTGGAGGATCTATTCCAGAGGGGAGCTTCACCACTTCATTG 60
          |||
Sbjct 620  ACGCCAACAGGAAATATTTTGGAGGATCTATTCCAGAGGGGAGCTTCACCACTTCATTG 679

Query 61  ACGGCTTTAATGAAGAGAAAAGCAACTGGATGCGCTATGTGAATCCAGCACACTCTCCC 119
          |||
Sbjct 680  ACGGCTTTAATGAAGAGAAAAGCAACTGGATGCGCTATGTGAATCCAGCACACTCTCCC 738

```

Abb. 6: Auswertungsprotokoll der Anfrage an die Gendatenbank: die aus dem Datenbogen des Kapillarsequenzierers abgelesene Sequenz stimmt vollkommen mit der von Blimp-1 gespeicherten überein (hier als humanes Ortholog PRDI-BF1 angegeben).

3.6. Expression von Blimp-1 mRNA in T-Zell-Subpopulationen

Nach erbrachtem Identitätsnachweis wurde die molekularbiologische Untersuchung analog an MACS-sortierten CD8⁻ und CD4⁺-T-Zellen und FACS-sortierten CD8⁺45RA⁻ bzw. CD8⁺45RA⁻ und CD4⁺45RA⁺ bzw. CD4⁺45RA⁻-T-Zellen durchgeführt. Es konnte von einer hohen Aussagekraft des Versuches bezüglich der Blimp-1 Expression in T-Zellen ausgegangen werden, zumal die Kontamination mit B-Zellen nach FACS-Sorting unterhalb der Nachweisgrenze lag. In allen Proben konnte eine deutliche, scharf sich demarkierende Bande entsprechend der DNA-Länge des Produktes von 370 Basenpaaren nachgewiesen werden. Repräsentative Beispiele über die Expression von Blimp-1 in PHA-stimulierten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen und in unstimulierten CD45RA-positiven und -negativen T-Zellen sind in **Abb. 7 und 8** dargestellt.

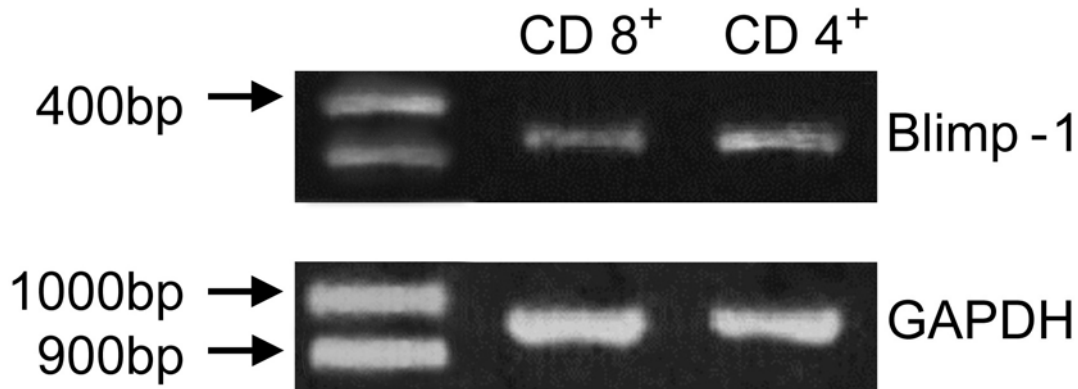


Abb. 7: Gelelektrophorese der PCR-Produkte aus vorstimulierten und hochangereicherten CD4⁺-und CD8⁺-Zellen.

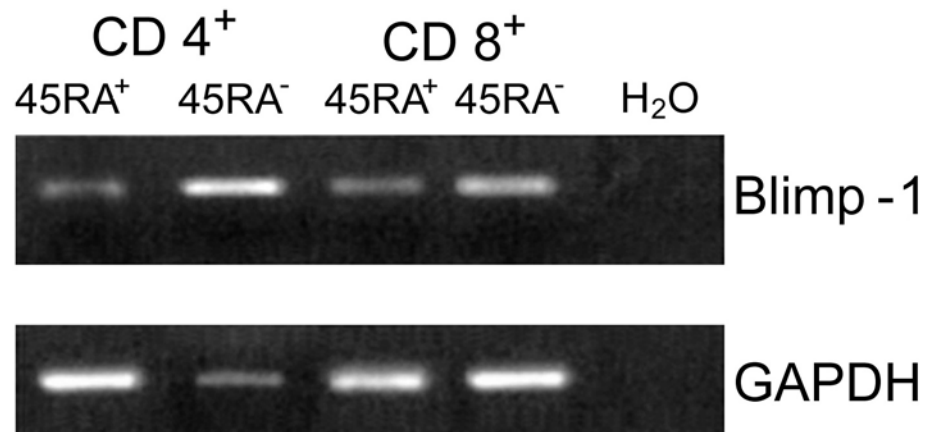


Abb. 8: Gelelektrophorese der PCR-Produkte aus hochangereicherten CD45RA-positiven und -negativen T-Zellsubpopulationen. Die Zellen wurden gleich nach dem FACS-Sorting verarbeitet und nicht vorstimuliert, um so einen Shift des Merkmals RA nach RO zu vermeiden.

GAPDH = House-keeping Gen-Kontrolle; H₂O = Negativkontrolle.

Da jeweils die gleiche Menge an zellulärer RNA eingesetzt wurde, könnte die Fluoreszenzintensität der Banden eventuell als semiquantitatives Kriterium für die Menge an spezifischer mRNA gewertet werden. Die schwächste Bande wurde in den CD4⁺45RA⁺-T-Zellen nachgewiesen, auch in wiederholten Versuchen mit Zellen anderer Probanden. In den CD4⁺45RA⁻-T-Zellen war das Signal deutlich ausgeprägter. Man könnte daraus schließen, dass die Expression von Blimp-1 in Antigen-erfahrenen CD4⁺-T-Zellen höher ist als in naiven CD4⁺-T-Zellen. Bemerkenswert ist, dass der Unterschied zwischen naiven und Memory CD8⁺-T-Zellen weniger ausgeprägt war. Für

eine weitere Quantifizierung in einer Verdünnungsreihen-PCR mit logarithmischer Verdünnung des Templates erwies sich die Reaktion als nicht stabil und effizient genug. Bereits in erster Verdünnung fielen die Signale wiederholt aus sowohl für T-Zell-Untergruppen als auch für die Positivkontrolle (B-Zellen und Jurkat-Zellen) und liessen so keine Interpretation zu. Eine Quantifizierung der mRNA mittels Real-Time-PCR oder RiboQuant wurde nicht durchgeführt.

Im Folgenden wurde versucht, Blimp-1 auch auf Proteinebene nachzuweisen.

3.7. Beurteilung der immunzytochemischen Färbungen

Für die Immunzytochemie wurden aktivierte B- und T-Zellen eingesetzt. Die B-Zellen wurden für 72 h, die T-Zellen für 14 h aktiviert. Da für einen Western-Blot keine ausreichende Zellmenge verfügbar war, wurde für den Nachweis von Blimp-1 Protein die immunzytochemische Färbung gewählt. Als weiteren Vorteil dieses Verfahrens sollte sich erweisen, dass die – in der Reinheitsanalyse ohnehin als gering anzusehende – Fehlerquelle durch B-Zell-Kontamination gänzlich vermieden werden konnte. B-Zellen wurden aufgrund ihrer sich gänzlich von T-Zellen unterscheidenden Morphologie problemlos erkannt und aus der Auswertung ausgeschlossen. Da B-Zellen in der Mikroskopie in extrem geringer Anzahl beobachtet wurden, stützt diese Beobachtung zusätzlich die Aussagekraft des molekularbiologischen Nachweises von Blimp-1 mRNA in T-Zellen.

3.7.1. Referenzfärbungen

Nach Auftragen der Zellen auf Objektträger und Durchführen der immunzytochemischen Färbungen wurde als erstes die Referenzfärbungen gegen CD20 (**Abb. 9**) bzw. CD2 (**Abb. 10**) unter Durchlichtmikroskopie betrachtet. War ein regelrechtes Färbeergebnis zu verzeichnen, konnte also somit der korrekte Ablauf der in gleichem Prozess angefertigten experimentellen Färbungen angenommen werden; hier wurde eine Quelle systematischer Fehler ausgeschlossen. Ferner konnte in allen der repräsentativen Versuchsansätze eine gute Zellmorphologie und sehr geringe bis

gänzlich fehlende Färbeartefakte durch fleckige Farbstoffausfällung im Interzellularraum (z.B. **Abb. 21**), besonders bei CD3⁺ T-Zellen, welche zur Clusterbildung mit Farbstoffeinschlüssen neigten, gezeigt werden.

3.7.2. Färbungen zum Nachweis von Blimp-1 Protein

Bei Beurteilung der experimentellen Färbungen auf Blimp-1 wurde zunächst durch die Negativkontrollen, also die Abwesenheit von gebundenem Primär-Ak und folglich färbungsfreiem Mikroskopiebefund, in allen Kontrollpräparaten eine hohe Spezifität erkannt. Das negative Färbeergebnis beruhte auf dem mit Blocking Polymere bis zur Belegung aller Bindungsstellen gesättigten Primär-Ak oder der Abwesenheit von unspezifisch gebundenen Sekundär-Ak bzw. Streptavidin. Vor Hintergrund dieser Negativkontrolle konnte also das Färbeergebnis, was über die Negativkontrolle heraus bemerkbar war, als Nachweis von Blimp-1-Protein interpretiert werden. So wurde besonders ausgeschlossen, dass der Primär-Ak unspezifische Bindungen einging, da er sonst nicht durch das dem Ag homologe Blocking Polymere blockierbar wäre. Insbesondere wurde auch ausgeschlossen, dass die bereits nach MACS und FACS an die Zellen gebundenen Antikörper als Bindungsstrukturen für die Antikörper und somit als Fehlerquelle in Frage kämen. Zugleich konnte aus der guten Qualität der Negativfärbung auch auf eine hohe Spezifität und Sensitivität des Sekundär-Antikörpers geschlossen werden, da diesbezügliche Mängel wieder zu einem positiven Färbeergebnis geführt hätten. Gelegentliche leichte rötliche Tingierung, besonders in der Cytoplasmaregion (z.B. **Abb. 12**, **Abb. 16**, **Abb. 20**) wurde als unspezifische Hintergrundfärbung und durch die Waschschriffe nicht entferntes Farbstoffüberbleibsel interpretiert, da sie auch in Präparaten auftraten die in Vorversuchen weder mit Primär- noch Sekundär-Ak, sondern nur mit Färbereagenzien inkubiert worden waren.

Diese Schlussfolgerung war zulässig durch die Gegenüberstellung mit in allen Positivfärbungen, mit ungeblocktem primären Antikörper, deutlichen Färbeergebnissen.

Das positive Färbeergebnis zeigte ein feinblasig-granuläres Färbungsmuster mit deutlicher Präferenz der Kernregion. In den B-Zellen (**Abb. 11**) und in allen

Untergruppen der T-Zellen war dieses Merkmal unabhängig von deren Differenzierungsstadium vorhanden (**Abb. 13 ff**) Sowohl aufgrund der im Negativpräparat erwiesenen Spezifität und der Lokalisation, welcher mit der vermuteten von Blimp-1 Protein und seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor übereinstimmte. Dieser Befund entsprach also mit hoher Wahrscheinlichkeit dem direkten Nachweis von Blimp-1 Protein.

Hierbei erwies sich der N20-terminale Antikörper als sensitiver und besser im Färbeergebnis. Auf Gegenfärbungen etwa mit Hämalaun wurde verzichtet, da so eine Beurteilung erschwert und die Sensitivität der Versuchsanordnung beeinträchtigt worden wäre.

Diese Befunde wurden in zweimaliger Wiederholung der Versuchsreihe mit komplett neuem Versuchsansatz mit Zellen zweier weiterer Spender bestätigt. In allen genannten Punkten ließen sich die Ergebnisse mit den Vorversuchen exakt wiederholen. Unbeeinflusst von dem anders gestalteten Ausgangsmaterial ergaben sich unter konstanten Versuchsbedingungen gleiche Ergebnisse (**Abb. 13 ff**). Der erhobene Befund erwies sich als reproduzierbar. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnte als definitiver Beleg für den schlüssigen Versuchsansatz und korrekte Ergebnisse gewertet werden.

4. Diskussion

Blimp-1 war ursprünglich als Protein beschrieben worden, welches typischerweise in differenzierten B-lymphozytären Linien nachweisbar ist (Turner et al. 1994). Das Protein wird in allen humanen und murinen Plasmazellen und in einer Untergruppe von B-Zellen im Keimzentrum nachgewiesen (Angelin Duclos et al. 2000; Nagy et al. 2002) sowie in Monozyten/ Macrophagen und Granulozyten (Chang et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Blimp-1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in humanen T-Zellen nachweisbar ist.

Im ersten Teil der Arbeit wurden vorbereitende Schritte zum Bereitstellen der zu untersuchenden Zellpopulationen aus humanen peripheren Blutlymphozyten beschrieben. Für die molekularbiologischen Versuche wurden die MACS-sortierten B- und T-Zellen mit SAC und IL-2 bzw. PHA und IL-2 vorstimuliert. Die naiven und Memory-Effector-T-Zellen wurden nicht aktiviert, da eine Stimulation vor Sorting die CD45RA/RO-Expression *in vitro* stark verändert hätte. Auch die Stimulation nach FACS-Sortierung wurde nicht durchgeführt, da ebenfalls ein Teil der Zellen ihre Expression von CD45RA nach CD45RO „geschiftet“ hätten und daraus die Sortierung nachträglich unpräzise geworden wäre.

In Vorversuchen zur Immunzytochemie konnte in unstimulierten Lymphozytenpopulationen kein Färbeerfolg beobachtet werden. Um eine optimale Expression von Blimp-1 in der Immunzytochemie zu erreichen, mussten die durch MACS gewonnenen CD19⁺-B-Zellen und die T-Zell-Subpopulationen (CD3⁺, CD4⁺ bzw. CD8⁺) ebenfalls aktiviert werden. Das galt auch für die CD45RA-positiven und –negativen T-Zellen, weil ohne Vorstimulation kein Färbeergebnis sichtbar war. Da durch längere Stimulation und Kultur der T-Zellen die Zellmorphologie und Vitalität litt und die stark aktivierten Zellen sich zu Zellagglomeraten zusammenballten, wurde die Kulturzeit auf 14 h verkürzt. Durch die kurze Stimulationszeit nach dem FACS-Sorting konnte vermutlich ein übermäßiger Shift von CD45RA⁺ nach CD45RA⁻ verhindert werden. Dies wurde jedoch nicht überprüft.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die B-Zellen mit SAC und IL-2 nicht maximal stimuliert wurden. (In Vorversuchen fanden sich nur 2 bis 5 Immunglobulinproduzierende Zellen.) Die T-Zellen wurden dagegen mit PHA und IL-2 sehr effektiv, in fast zu 100% aktiviert, was die unterschiedlichen immunzytochemischen Befunde in B- und T-Zellen erklären könnte.

MACS- und FACS-Methoden eigneten sich hinreichend gut zum Zweck der Zellauftrennung nach den verschiedenen Merkmalen. Um die zytotoxischen und T-Helferzellen weiter zu unterteilen, wurde mit CD45RA ein etabliertes Merkmal gewählt (Dutton et al. 1998), welches die T-Zellen in die „funktionellen“ Gruppen der naiven und Memory-/Effector-T-Zellen weiter differenziert. Anhand der durchflusszytometrischen Analysen der in MACS als auch sequenziell in MACS- und dann FACS-sortierten Zellen konnte eine hohe Reinheit der B- und T-Zellen bis in die Subpopulationen festgestellt werden. Bereits nach MACS war die Kontamination durch unerwünschte Zellen extrem gering. Nach FACS-Sortierung war besonders die Kontamination der T-Zell-Subpopulationen durch B-Zellen nicht mehr nachweisbar. Das Setzen eines „Lymphozytengates“ schloss eine Kontamination durch Monozyten und Granulozyten aus. Zusätzlich könnte durch den sogenannten „Capping“-Effekt, also Internalisierung des fluorochromgebundenen Antikörpers in die Zelle, die Reinheit als noch höher, als in der Durchflusszytometrie ermittelt, angenommen werden.

Im nächsten Schritt wurde der molekularbiologische Nachweis von Blimp-1 mRNA in T-Zellen erbracht, nachdem die Blimp-1-Expression zufällig in Vorversuchen in Jurkat-Zellen (T-Zell-Leukämie) entdeckt wurde. Zunächst gelang es, Blimp-1 analog zu bekannten Ergebnissen in stimulierten B-Zellen aufzufinden. Sowohl in CD3⁺, CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen konnte mRNA für Blimp-1 identifiziert werden. Bei den in der Gelelektrophorese beobachteten Banden der PCR-Produkte konnte eine Sequenzierung des Produktes und Abgleich mit der Gensequenz von Blimp-1 belegen, dass wirklich zweifelsfrei Blimp-1 vorlag. In den Untergruppen der naiven bzw. Memory/Effector-T-Zellen konnte ein äquivalentes PCR-Produkt nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzintensität als semiquantitativer Hinweis auf die Menge an vorhandener mRNA für Blimp-1 war unterschiedlich. Die schwächste Bande wurde in den

CD4⁺45RA⁺-Zellen gefunden. In den CD4⁺45RA⁻-Memory-/Effector-T-Zellen konnte eine stärkere Bande nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass der Unterschied zwischen naiven und Memory CD8⁺-Zellen weniger ausgeprägt war. Das identische Ergebnis wurde in erneuten Versuchsansätzen mit Zellen zweier anderer Spender erzielt und war somit reproduzierbar. Für eine weitere Quantifizierung in einer Verdünnungsreihen-PCR mit logarithmischer Verdünnung des Templates erwies sich die Reaktion als nicht stabil und effizient genug. Bereits in erster Verdünnung fielen die Signale wiederholt sowohl für T-Zell-Untergruppen als auch für die Positivkontrolle in B-Zellen und Jurkat-Zellen aus und ließen so keine Interpretation zu. Für eine exakte Quantifizierung wäre die Real-Time-PCR notwendig gewesen. Diese wurde jedoch nicht etabliert. Alternativ wurde ein RNase-Protection-Assay (RiboQuant) durchgeführt, der jedoch im humanen System mit PBL keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte, im Gegensatz zum murinen System, wobei T-Zellen aus Lymphknoten eingesetzt wurden (Santner-Nanan et al. 2006).

Im dritten Teil der Arbeit wurde Blimp-1 auf Proteinebene nachgewiesen. Weil mit den verfügbaren Antikörpern kein schlüssiges Ergebnis im Western Blot zu erzielen war und die Zellen in nicht ausreichender Anzahl für den Versuch bereitgestellt werden konnten, wurde als Alternative das immunzytochemische Nachweisverfahren gewählt. Als vorteilhaft erwies sich zusätzlich, dass die Fehlerquelle durch B-Zell-Kontamination gänzlich vermieden werden konnte. B-Zellen wurden aufgrund ihrer sich gänzlich von T-Zellen unterscheidenden Morphe erkannt und aus der Auswertung ausgeschlossen. Da B-Zellen in der Mikroskopie in extrem geringer Anzahl beobachtet wurden, stützt diese Beobachtung zusätzlich die Aussagekraft des molekularen Nachweises von Blimp-1 mRNA in T-Zellen.

Um die Spezifität der Färbung zu dokumentieren, wurden drei unterschiedliche Negativkontrollen durchgeführt, um 1. die unspezifische Bindung des Primärantikörpers, 2. die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers und 3. die unspezifische Färbung durch Ausfällung von Streptavidin-Enzymkomplex oder Chromogen zu demaskieren. Der Spezifitätsbeweis war desto wichtiger, da nach MACS und FACS die Zellen bereits mit Antikörpern beladen waren, die möglicherweise

Epitope für den Sekundärantikörper hätten darstellen können. Durch Zelltrümmer oder sich stark zusammenballende Zellen können Artefakte durch Farbstoffeinlagerungen entstehen. Die Sensitivität der Methode wurde durch die Verwendung des Sekundärantikörpers und des Streptavidin-Enzymkomplexes im Vergleich zum Einsatz eines primär enzym- oder fluorochromgebundenen Antikörpers erhöht, da sich so das Signal verstärken ließ. Als Positiv-Befund nach Immunzytochemie fanden sich granuläre Färbungsergebnisse mit Präferenz der Kernregion, was zu Blimp-1 als Transkriptionsfaktor passt. Die Färbung durch einen gegen N20-terminale Blimp-1-Proteinstrukturen gerichteten Antikörper lieferte die besten Ergebnisse.

Eine Beurteilung der Färbeergebnisse durch Auszählung der als negativ, schwach, mittelstark und stark angefärbten Zellen und Bildung einer Ratio von negativen zu positiven Zellen führte zu keinen verwertbaren Aussagen, da Zellmorphologie und subjektive Bewertungsmaßstäbe dies nicht erlaubten. Dagegen sprach die fehlende Gegenfärbung, welche negativ gefärbte Zellen, besonders die gegenüber B-Zellen sehr kleinen T-Zellen, relativ schwer erfassbar machten. Auch das Vorhandensein von graduellen Unterschieden der Färbeintensität bereitete Schwierigkeiten, sodass bestenfalls nur semiquantitative Beurteilungen zulässig gewesen wären. Die Analyse der Folgefärbungen im Vergleich zum Erstversuch machte bei konstant guter Färbequalität durch die Abweichung zu der vormals ermittelten Ratio eine allgemeingültige Aussage schwierig und eher spekulativ als verlässlich. Eine Quantifizierbarkeit der Blimp-1-Expression aufgrund der Färbungsintensität musste durch den experimentellen Charakter der Methode in diesem Fall verlassen werden; hier fehlte eine ausreichende Standardisierung und die dazu nötigen, weit höheren Präparatemengen, um eine Interpretation zuzulassen. Eine Morphometrie, wie zur Beurteilung von Gewebsschnitten gemeinhin üblich, kam bedingt durch stark schwankende Zellzahlen pro Gesichtsfeld und Objektträger bzw. variierende Zelldichte im Gegensatz zum histologischen Schnitt nicht in Frage.

Die Ergebnisse mit humanen T-Zellen wurden fast gleichzeitig auch für die Maus bestätigt. Untersuchungen in der Arbeitsgruppe von Anneliese Schimpl am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg zeigten auch an ex vivo

isolierten murinen T-Zellen, dass die Blimp-1-Expression in Antigen-erfahrenen CD4- und CD8-positiven T-Zellen (CD45RO⁺) höher ist als in naiven CD4⁺-Zellen. Am stärksten ausgeprägt war die Expression in TH2-Zellen und CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Santner-Nanan et al. 2006). Die nur schwach ausgeprägte Bande in naiven T-Zellen ist möglicherweise der Grund, warum in der Erstbeschreibung von Blimp-1 die Expression in T-Zellen übersehen wurde (Turner et al. 1994)

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Blimp-1 in murinen T-Zellen schleusten Santner-Nanan und Mitarbeiter Blimp-1 mit Hilfe retroviraler Vektoren in in vitro stimulierte CD4⁺-Zellen ein. Die Überexpression von Blimp-1 führte zu einer drastischen Reduktion der IL-2-Synthese, zu einer Hemmung der Proliferation und zu einer Verkürzung der Lebensdauer dieser Zellen. Die Befunde von Santner-Nanan (2006) und Mitarbeitern wurden inzwischen von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. So fanden Gong und Malek (2006), dass sich die IL-2-Produktion genau entgegengesetzt verhält wie die Blimp-1-Expression. Inzwischen existieren auch Mäusestämme mit deletiertem oder defektem Prdm-1-Gen, das für Blimp-1 kodiert (Kallies et al. 2006, Martins et al. 2006). Das Fehlen von Blimp-1 in T-Zellen resultiert in einer stärkeren IL-2-Synthese. Es kommt zu ausgeprägten Veränderungen im T-Zell-Kompartiment mit höheren Anteilen von Effektor-/ Memory-T-Zellen, polyklonaler T-Zellproliferation mit Infiltration diverser Organe und T-Zell-vermittelter Immunpathologie.

Offenbar hat Blimp-1 in B- und T-Zellen unterschiedliche Funktionen. In B-Zellen ist Blimp-1 ein „Master-Regulator“ für die terminale Differenzierung. In T-Zellen dagegen wird Blimp-1 erst während der späten T-Zell-Differenzierung exprimiert und ist möglicherweise essentiell für die Terminierung der T-Zell-Antwort und damit verantwortlich für die T-Zell-Homöostase (Jameson et al. 2006, Kallies and Nutt 2007).

Um funktionelle In-vitro-Tests mit humanen T-Zellen durchzuführen, müsste Blimp-1 entweder überexprimiert (z.B. durch retroviralen Transfer) oder ausgeschaltet werden. Hier würde sich das „Gene-Silencing“ durch siRNA anbieten. Der Mechanismus besteht darin, dass kleine, doppelsträngige RNA-Fragmente von Längen um 21 bp spezifischer Sequenz die RNA-Expression der korrespondierenden Gene „abschalten“. Das siRNA-

vermittelte „Silencing“ ist inzwischen als Versuchsmethode fest etabliert und funktioniert auch in ansonsten retroviral schwer zu transfizierenden T-Zellen (Novina et al. 2002, Elbashir et al. 2002, Elbashir et al. 2001, Tuschl et al. 1999). Weiterführende Untersuchungen werden zeigen, ob sich diese Methode zur Funktionsanalyse von Blimp-1 in primären humanen T-Zellen eignet.

5. Zusammenfassung

Der transkriptionelle Repressor Blimp-1 wurde ursprünglich als essentiell für die terminale Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in drei unabhängig von einander durchgeführten Versuchsserien die Expression von Blimp-1 in humanen T-Zellen untersucht. Nach Isolierung der Lymphozyten aus dem Vollblut gesunder Spender wurden durch magnetisches Zellsortieren (MACS) B- ($CD19^+$) und T-Zellen ($CD3^+$, $CD4^+$ bzw. $CD8^+$) aufgereinigt. Die $CD4^-$ und $CD8^-$ positiven T-Zellen wurden durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) in die Unterklassen der naiven und Antigen-erfahrenen T-Helferzellen ($CD4^+/CD45RA^+$ und $CD4^+/CD45RA^-$) und in die entsprechenden zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+/CD45RA^+$ und $CD8^+/CD45RA^-$) weiter unterteilt. Die An- und Abreicherung der Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft. Die aufgereinigten Zellen wurden, von wenigen Ausnahmen abgesehen, entweder mit SAC + IL-2 (B-Zellen) oder PHA + IL-2 (T-Zellen) aktiviert.

Aus den durch MACS aufgereinigten B- und T-Zellen erfolgte zunächst die Extraktion der RNA und anschliessend nach reverser Transkription eine PCR zur Amplifizierung des Blimp-1-Gens. Die PCR-Produkte wurden in der Agarosegel-Elektrophorese dargestellt und durch Kapillarsequenzierung spezifiziert. Die Probensequenz stimmte mit der publizierten Blimp-1-Sequenz überein. Ebenso konnten in den aufgereinigten T-Zell-Subpopulationen je eine Blimp-1 entsprechende Bande deutlich nachgewiesen werden. Die Bande war allerdings in den naiven T-Helferzellen ($CD4^+/CD45RA^+$) schwächer ausgeprägt.

Zum immunzytochemischen Nachweis des Blimp-1- Proteins in den aufgetrennten Zellpopulationen wurde auf Cytospin-Präparaten ein polyklonaler Antikörper gegen den N20-terminalen Blimp-1-Proteinanteil als Primärantikörper und ein Anti-IgG-Antikörper als Sekundärantikörper verwendet. Die Färbereaktion beruhte auf einer HRP-vermittelten Reaktion von AEC-Substrat zu rot erkennbarem Pigment. Ein entsprechendes Färbeergebnis war in mehreren unabhängigen Versuchsdurchgängen als feingranuläre Kernfärbung reproduzierbar und wurde in Phasenkontrastmikroskopie

fotografiert. Durch mehrfache Negativkontrollen konnten Artefakte ausgeschlossen werden, so dass eine hohe Spezifität gewährleistet war. Bei Reproduzierbarkeit, hoher Spezifität und Sensitivität des Versuchsansatzes wurde der Nachweis von Blimp-1-Protein in humanen CD3⁺-T-Zellen und naiven und Antigen-erfahrenen T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen erbracht.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass Blimp-1 auch in humanen T-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene exprimiert wird. Es ist deshalb anzunehmen, dass Blimp-1 auch für die terminale Differenzierung von T-Zellen eine wichtige Rolle spielt.

6. Anhang: Mikrofotographien

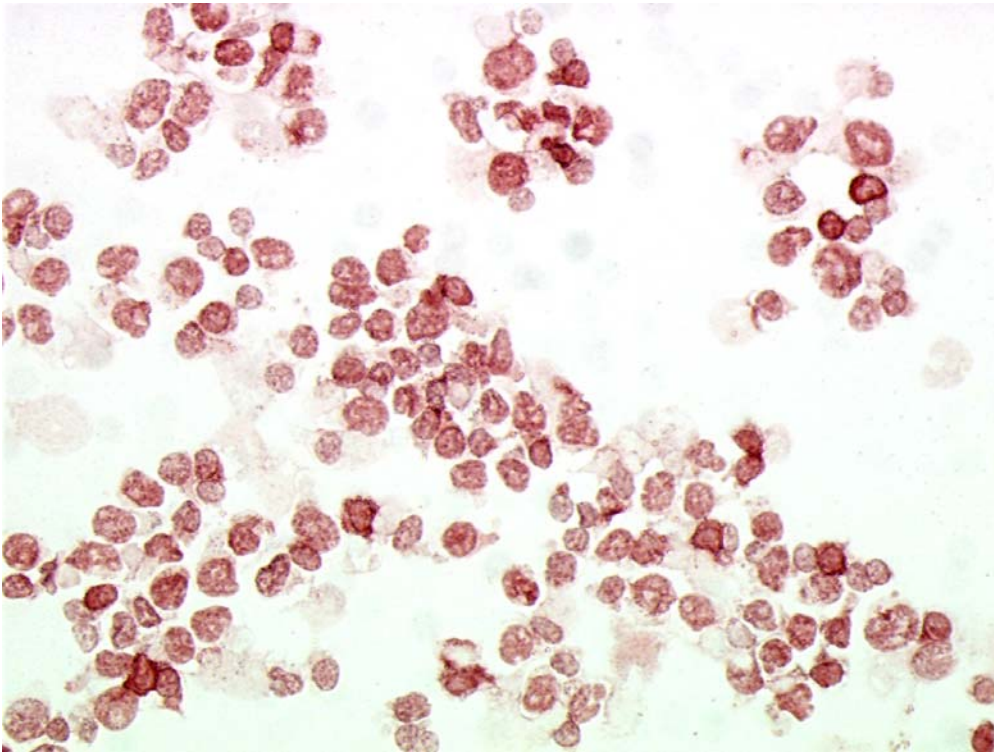


Abb. 9: Referenzfärbung für hoch angereicherte, stimulierte CD 19⁺-B-Zellen: Primär-Ak: Anti-CD20, Sekundär-Ak: goat-anti-mouse-Ak (Ultra vision detection System kit) 200x Vergrößerung

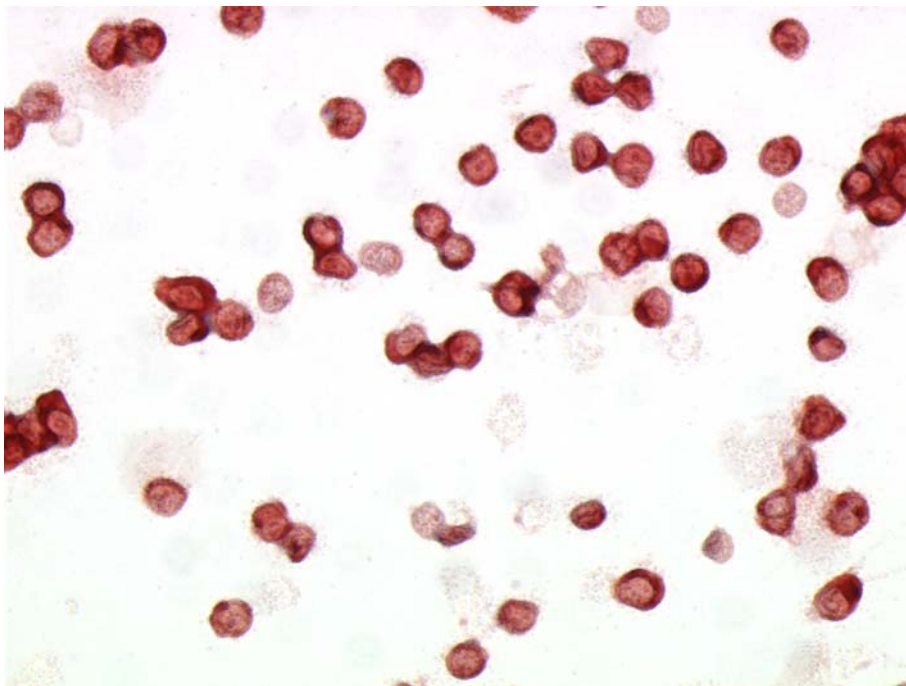


Abb. 10: Referenzfärbung für hoch angereicherte, stimulierte CD 3⁺-T-Zellen: Primär-Ak: Anti-CD2, Sekundär-Ak: goat-anti-mouse-Ak, 400x Vergrößerung

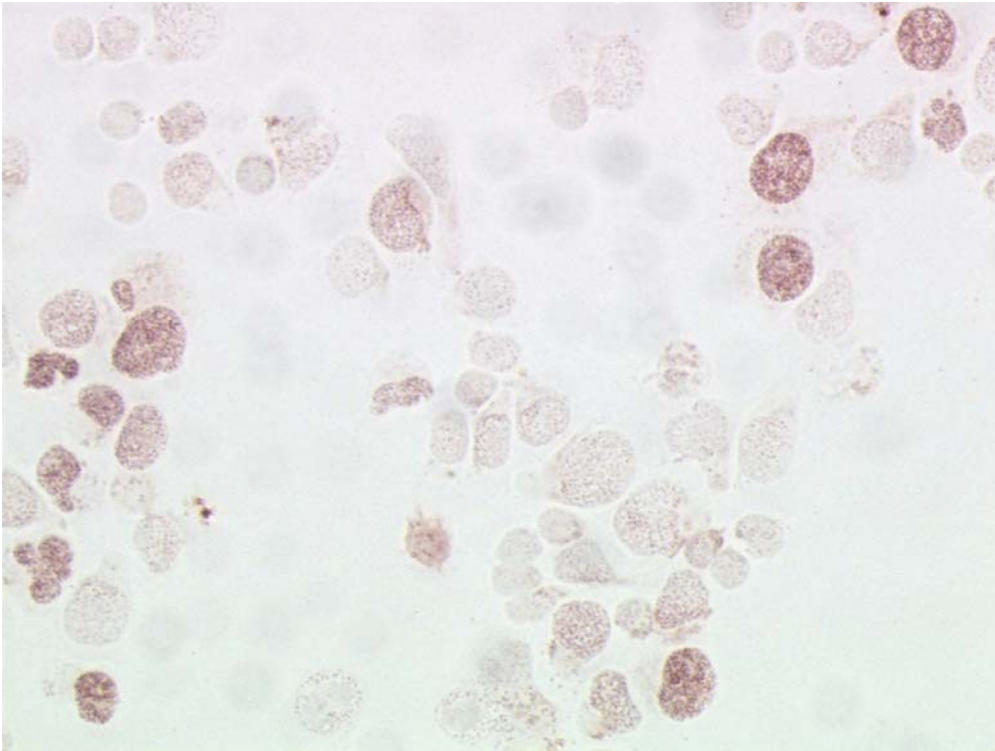


Abb.11: Positivfärbung: Hoch angereicherte B-Zellen nach 3 d Stimulation, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus), Sekundär-Ak , Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x . Man beachte, dass nur ein kleiner Teil der B-Zellen positiv reagiert.

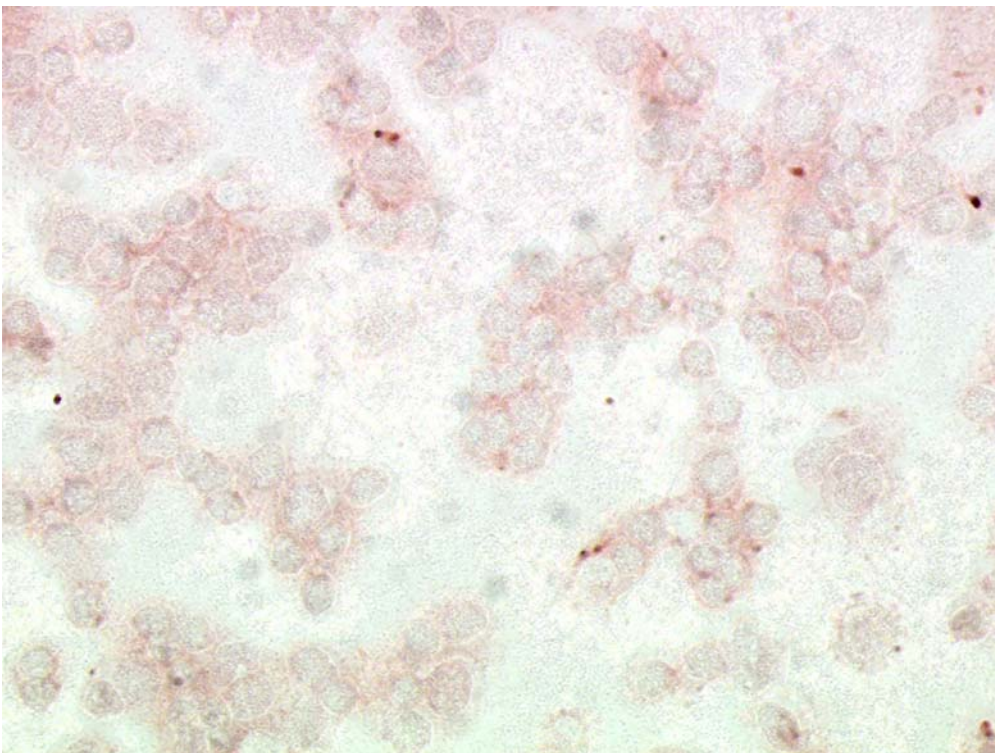


Abb. 12: Negativkontrolle: Hoch angereicherte B-Zellen nach 3 d Stimulation, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus) nach Inkubation mit Blocking-Polymeren N20, Sekundär-Ak , Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

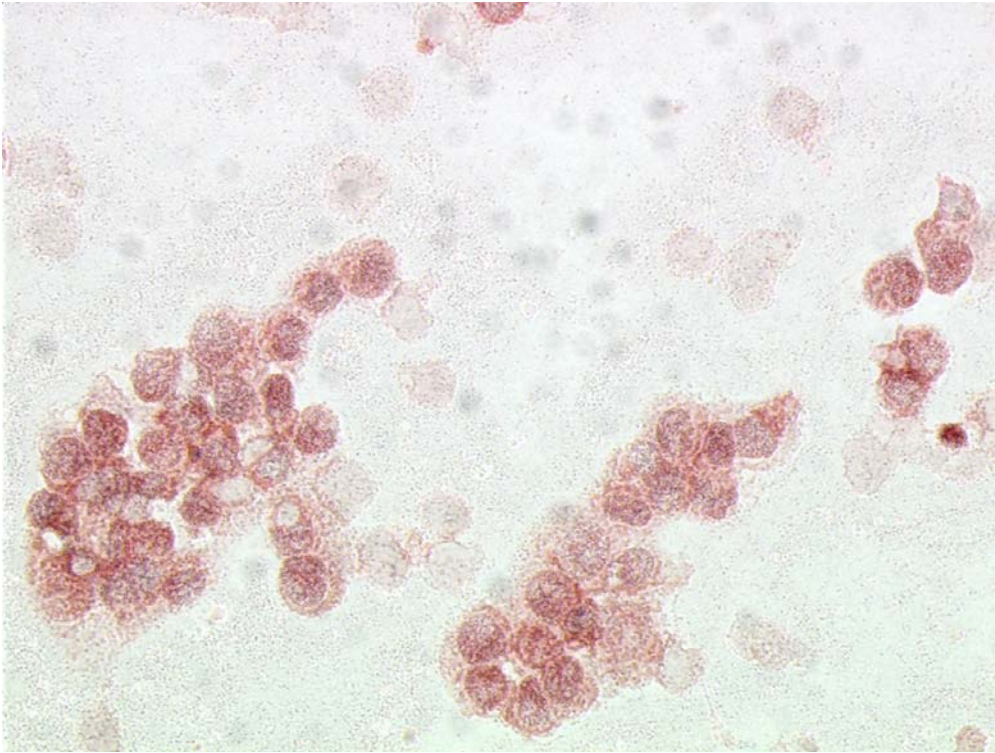


Abb. 13: Positivfärbung: Hoch angereicherte T-Zellen ($CD\ 3^+$) nach 14 h Aktivierung, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus), Sekundär-Ak, Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

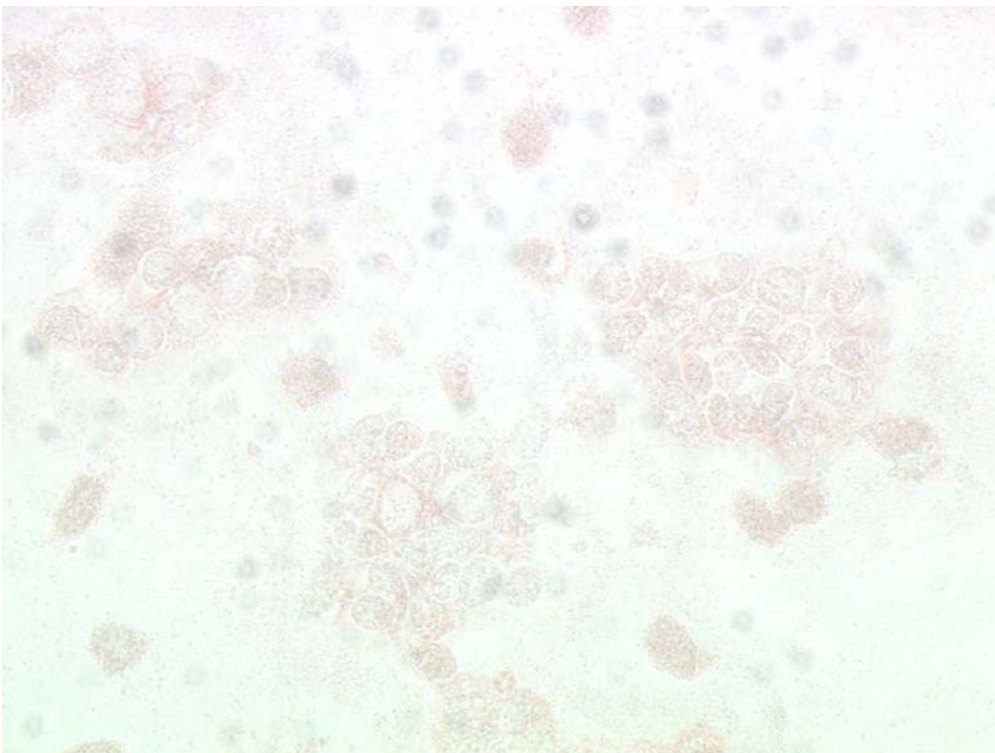


Abb. 14: Negativkontrolle: Hoch angereicherte T-Zellen ($CD\ 3^+$) nach 14 h Aktivierung, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus) nach Inkubation mit Blocking-Polymeren N20, Sekundär-Ak: Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

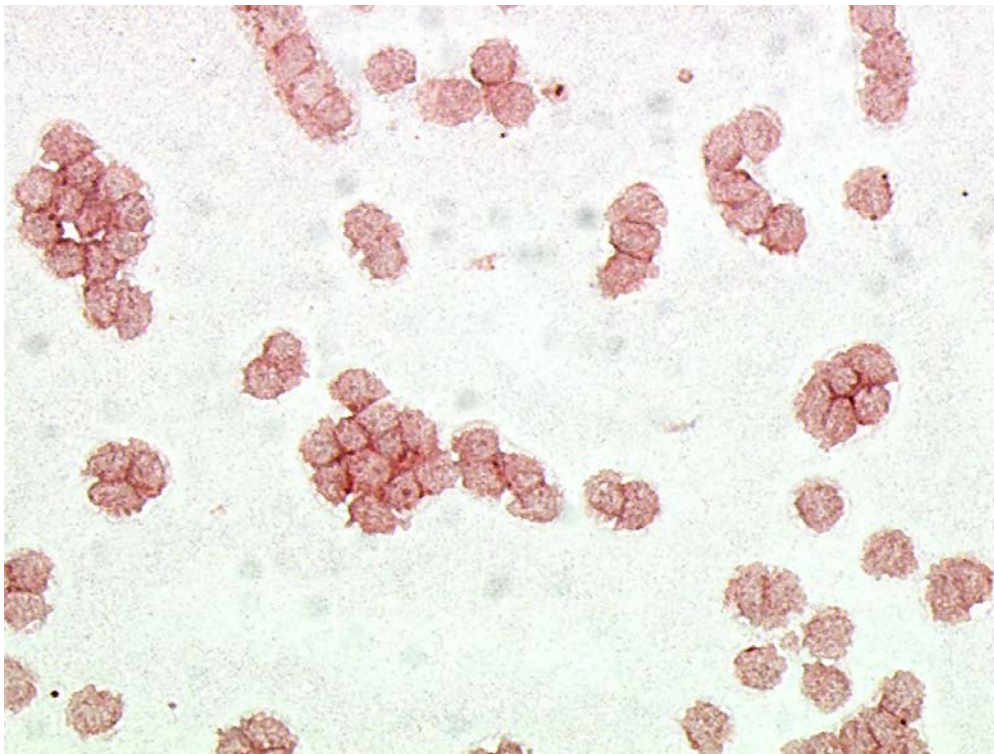


Abb. 15: Positivfärbung: Hoch angereicherte $CD3^+/CD4^+/CD45RA^+$ T-Zellen, nach 14 h Aktivierung, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus), Sekundär-Ak, Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

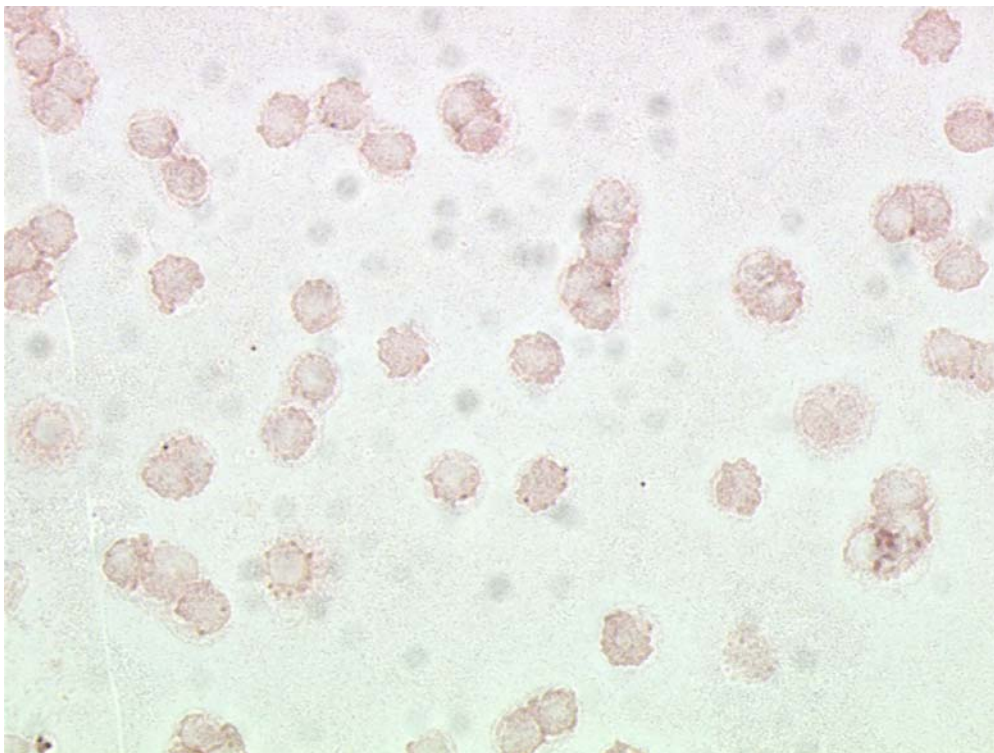


Abb. 16: Negativkontrolle: Hoch angereicherte $CD3^+/CD4^+/CD45RA^+$ T-Zellen, nach 14 h Aktivierung, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus) nach Inkubation mit Blocking-Polymeren, Sekundär-Ak: Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

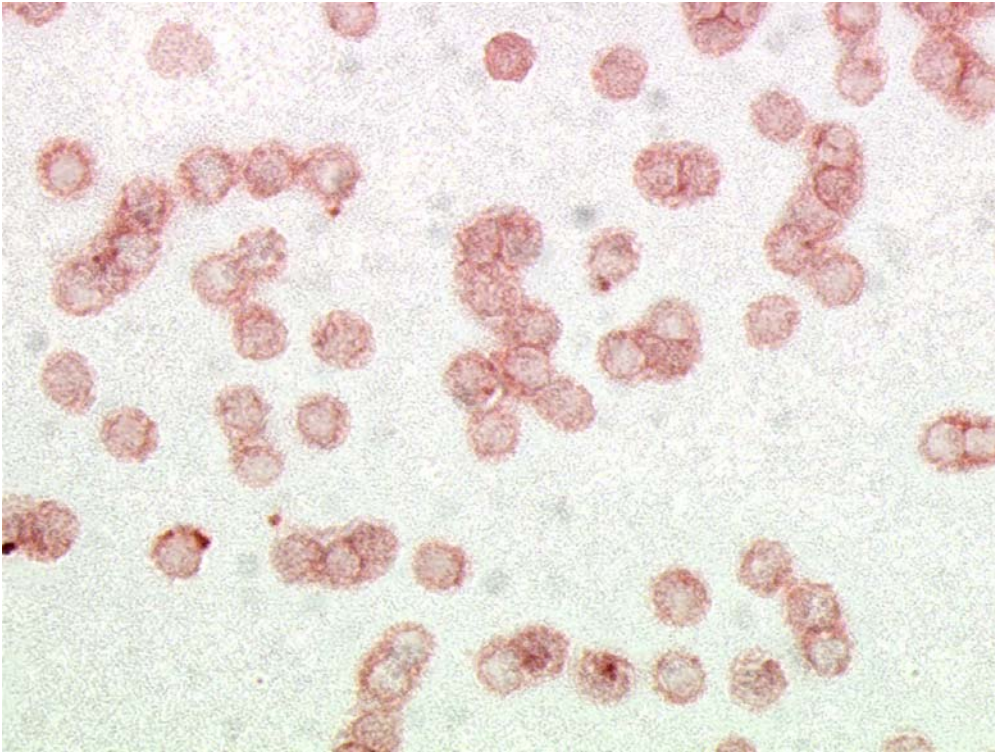


Abb. 17: Positivfärbung: Hoch angereicherte $CD3^+/CD4^+/CD45RA^-$ -Zellen, nach 14 h Aktivierung, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus), Sekundär-Ak, Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

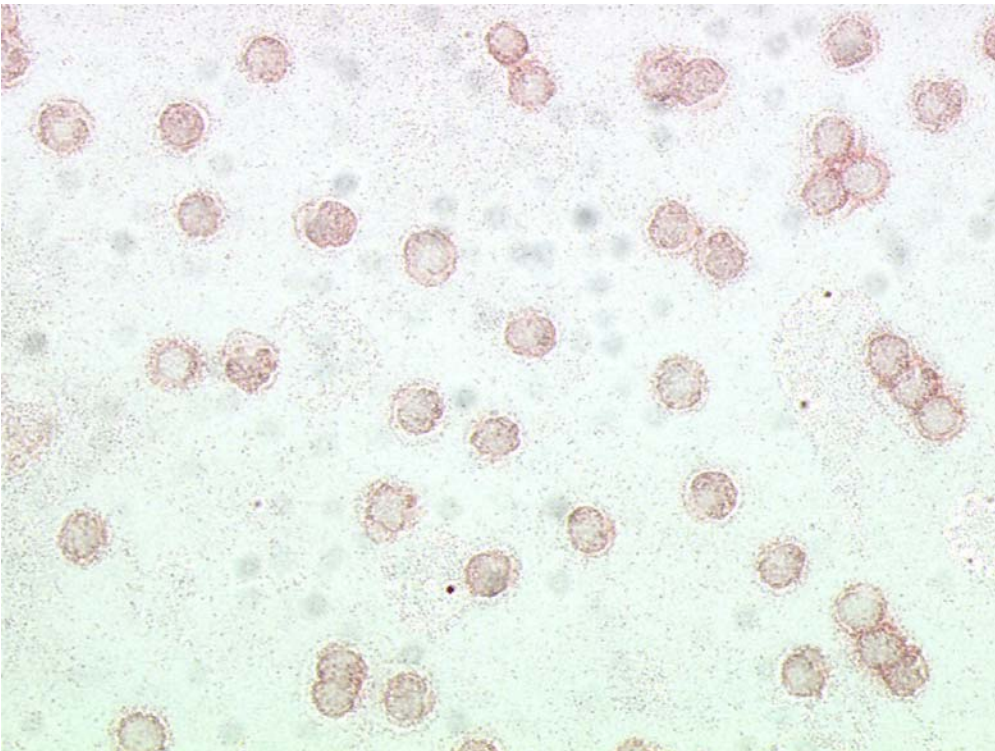


Abb. 18: Negativkontrolle: Hoch angereicherte $CD3^+/CD4^+/CD45RA^-$ -Zellen, nach 14 h Aktivierung, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus) nach Inkubation mit Blocking-Polymeren, Sekundär-Ak, Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

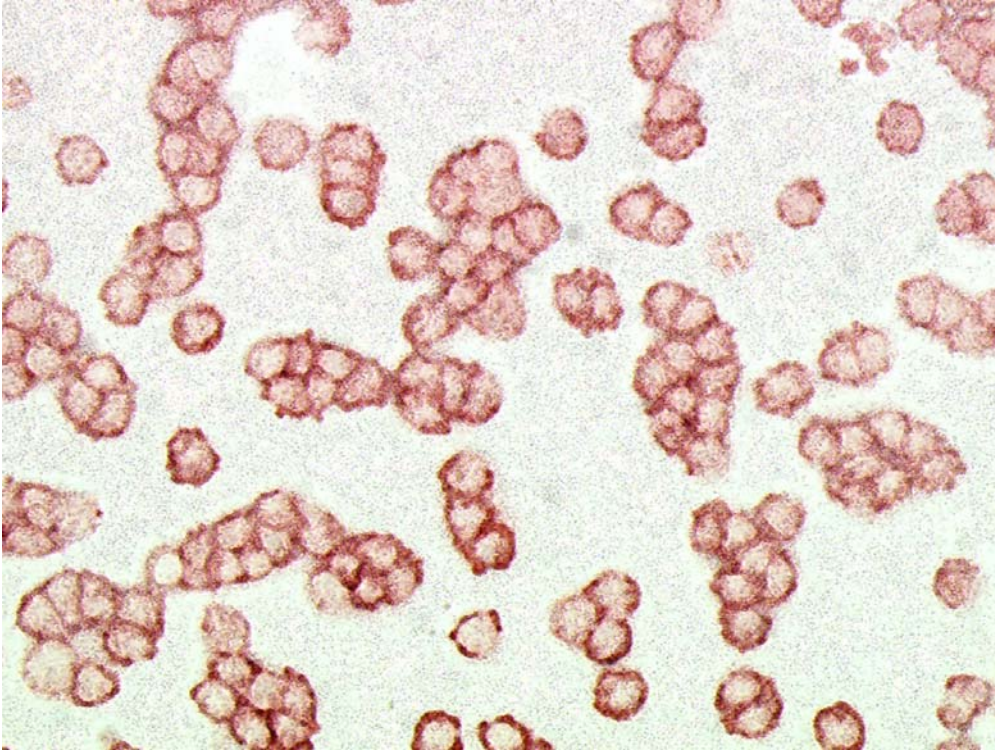


Abb. 19: Positivfärbung: Hoch angereicherte CD 3⁺/CD8⁺/CD45RA⁺ T-Zellen, nach 14 h Aktivierung, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus), Sekundär-Ak , Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

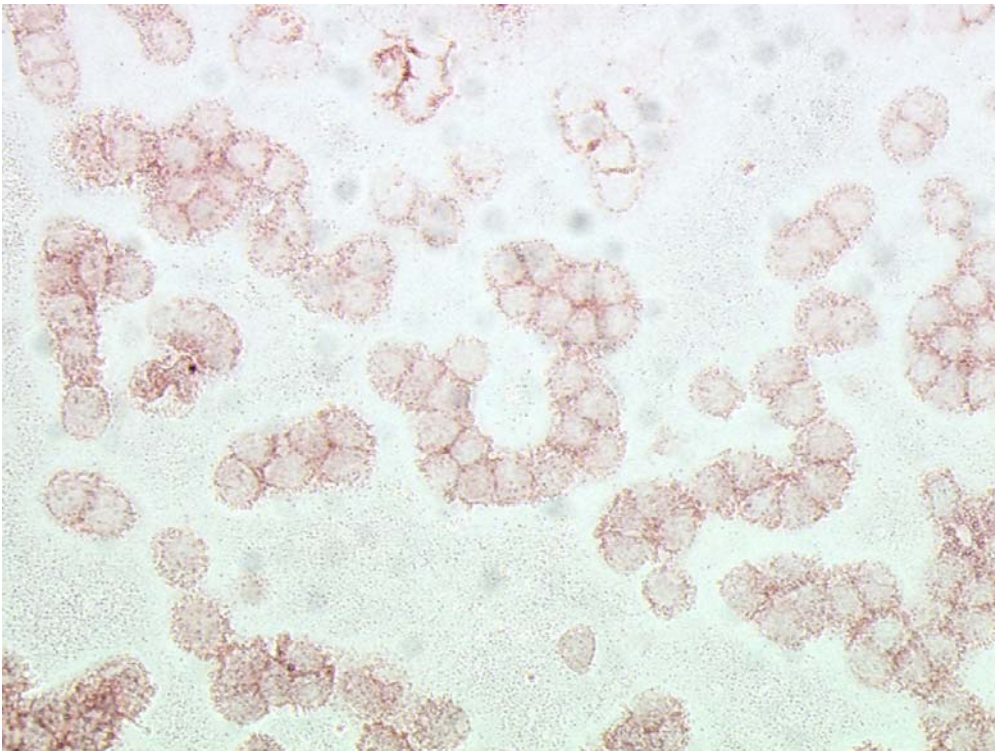


Abb. 20: Negativkontrolle: Hoch angereicherte CD 3⁺/CD8⁺/CD45RA⁺ T-Zellen, nach 14 h Aktivierung , Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus) nach Inkubation mit Blocking-Polymere, Sekundär-Ak , Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x



Abb. 21: Positivfärbung: Hoch angereicherte CD 3⁺/CD8⁺/CD45RA⁻-Zellen, nach 14 h Aktivierung, Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus), Sekundär-Ak , Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

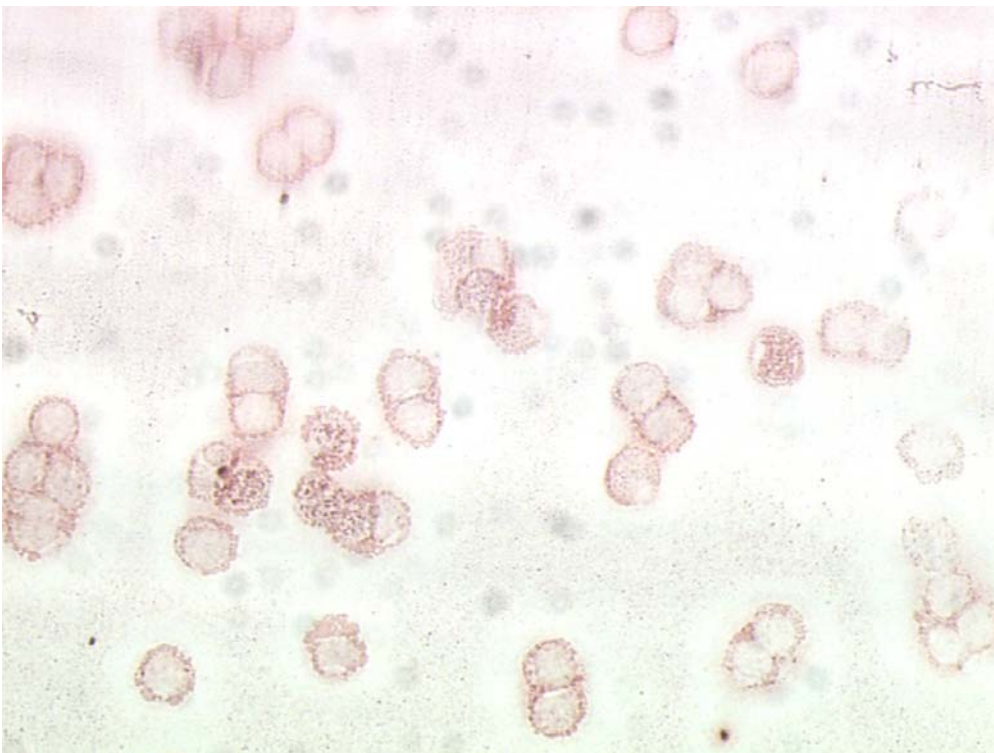


Abb. 22: Negativkontrolle: Hoch angereicherte CD 3⁺/CD8⁺/CD45RA⁻T-Zellen, nach 14 h Aktivierung , Primär-Ak: Anti-BLIMP-1 (N20-Terminus) nach Inkubation mit Blocking-Polymeren, Sekundär-Ak , Anti IgG (H+L) rabbit-anti-goat, 400x

7. Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
BLIMP	B-lymphocyte induced maturation protein
bp	base pairs, Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
c/ml	Zellen pro Milliliter
CD	Cluster of Differentiation, Oberflächenantigen
cDNA	complimentary desoxyribonucleic acid
Cy	Cychrom
DEPC	Diethylpolycarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleotid
dsRNA	double strand ribonucleic acid, doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluoreszenz- aktivierter Zellsorter
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Graulocyte-colony stimulating factor
HRP	horseradish-peroxydase
I.E.	Internationale Einheit
IFN β 1	Interferon Beta-1
Ig G (H+L)	Immunglobulin G Leicht- und Schwerekette
IL-2	Interleukin 2
kD	kiloDalton
MACS	Magnetic cell separation
MHC II	Maior histocompatibility complex II
mRNA	messenger ribonucleic acid

PBL	Peripheral Blood lymphocytes
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PHA-P	Phytohemagglutinin P
PRDI-BF	PR-domain zinc finger protein
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonucleinsäure-verstoffwechselndes Enzym
RPE-Cy5	R-Phycoerythrin-Cychrom 5
RT-PCR	reverse-transcription polymerase chain reaction
SAC	Staphylococcus aureus Protein A
SET	SU-VAR enhancer of zeste and tri-thorax trx
siRNA	small interfering ribonucleic acid
TAE	Tris-acetate
TPH	12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate

8. Literaturverzeichnis

- Angelin-Duclos C, Cattoretti G, Lin KI, Calame K. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression in vivo. *J Immunol.* 2000 165: 5462-71.
- Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol.* 2003;21: 205-30.
- Chang DH, Angelin-Duclos C, Calame K. BLIMP-1: trigger for differentiation of myeloid lineage. *Nat Immunol.* 2000 1: 169-76.
- Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 1998;16: 201-23.
- Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods.* 2002 ;26: 199-213.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001; 411: 494-8.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 2001; 20: 6877-88.
- Gong D, Malek TR. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production. *J Immunol.* 2007 ;178: 242-52.
- Gyory I, Wu J, Fejer G, Seto E, Wright KL. PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat Immunol.* 2004; 5:299-308.
- Huang S. Blimp-1 is the murine homolog of the human transcriptional repressor PRDI-BF1. *Cell* 1994; 78: 9.
- Jameson SC. T cells climb on board Blimp-1. *Trends in Immunology* 2006, 27: 349-351.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." *Nat Rev Immunol.* 2002 Apr;2(4):251-62.
- Kallies A; Nutt SL: Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; 19: 156-162.

- Kallies A, Hawkins ED, Belz GT, Metcalf D, Hommel M, Corcoran LM, Hodgkin PD, Nutt SL. Transcriptional repressor Blimp-1 is essential for T cell homeostasis and self-tolerance. *Nat Immunol.* 2006; 7: 466-474.
- Keller AD, Maniatis T. Only two of the five zinc fingers of the eukaryotic transcriptional repressor PRDI-BF1 are required for sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol.* 1992; 12:1940-9.
- Knodel M, Kuss AW, Berberich I, Schimpl A. Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur J Immunol.* 2001 ;31: 1972-80.
- Kouzarides T. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12:198-209. Erratum in: *Curr Opin Genet Dev* 2002;12: 371.
- Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14:286-98.
- Lin KI, Angelin-Duclos C, Kuo TC, Calame K. Blimp-1-dependent repression of Pax-5 is required for differentiation of B cells to immunoglobulin M-secreting plasma cells. *Mol Cell Biol.* 2002; 22: 4771-80.
- Lin Y, Wong K, Calame K. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science.* 1997; 276: 596-9.
- Makar KW, Wilson CB. Sounds of a silent Blimp-1. *Nat Immunol.* 2004; 5: 241-2.
- Martins GA, Cimmino L, Shapiro-Shelef M, Szabolcs M, Herron A, Magnusdottir E, Calame K. Transcriptional repressor Blimp-1 regulates T cell homeostasis and function. *Nat Immunol.* 2006; 7: 457-465.
- Messika EJ, Lu PS, Sung YJ, Yao T, Chi JT, Chien YH, Davis MM. Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development. *J Exp Med.* 1998; 188: 515-25.
- Nagy M, Chapuis B, Matthes T. Expression of transcription factors Pu.1, Spi-B, Blimp-1, BSAP and oct-2 in normal human plasma cells and in multiple myeloma cells. *Br J Haematol.* 2002; 116:429-35.
- Nasi S, Ciarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L. Making decisions through Myc. *FEBS Lett.* 2001; 490: 153-62.
- Nelson BH, Willerford DM Biology of the interleukin-2 receptor *Adv. Immunol.* 1998, 70: 1-81.
- Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, Collman RG, Lieberman J, Shankar P, Sharp PA siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med.* 2002; 8: 681-6.

- Piskurich JF, Lin KI, Lin Y, Wang Y, Ting JP, Calame K. BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility class II transactivator expression in plasma cells. *Genes Dev.* 1999; 13: 125-37.
- Ren B, Chee KJ, Kim TH, Maniatis T. PRDI-BF1/Blimp-1 repression is mediated by corepressors of the Groucho family of proteins. *Nat Immunol.* 2000; 1: 526-32.
- Santner-Nanan B, Berberich-Siebelt F, Xiao Z, Poser N, Sennefelder H, Rauthe S, Vallabhapurapu D, Berberich I, Schimpl A, Kreth HW, Nanan R. Blimp-1 is expressed in human and mouse T cell subsets and leads to loss of IL-2 production and to defective proliferation. *Signal Transduction.* 2006; 6: 268 – 279.
- Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltzane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, Staudt LM. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity.* 2002; 17: 51-62.
- Shapiro-Shelef M, Lin KI, McHeyzer-Williams LJ, Liao J, McHeyzer-Williams MG, Calame K. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity.* 2003; 19: 607-20.
- Turner CA Jr, Mack DH, Davis MM. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells. *Cell.* 1994; 77: 297-306.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 1999; 13: 3191-7.
- Yu J, Angelin-Duclos C, Greenwood J, Liao J, Calame K. Transcriptional repression by blimp-1 (PRDI-BF1) involves recruitment of histone deacetylase. *Mol Cell Biol.* 2000; 20: 2592-603.

Danksagung

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. H. W. Kreth, der es mir ermöglicht hat diese Promotionsarbeit an der Kinderklinik und Poliklinik der Universität Würzburg anzufertigen.

Herrn Prof. R. Nanan danke ich herzlichst für die Bereitstellung und Betreuung des Projekts, für die Möglichkeit, an der University of Sydney die praktische Arbeit im Themenbereich der immunologischen Forschung zu vertiefen und seine Bereitschaft, meine Interessen im Bereich der Wissenschaft zu fördern und zu unterstützen.

Danksagen möchte ich Frau Prof. A. Schimpl und Frau Dr. B. Santner-Nanan für ihre stetige Hilfsbereitschaft, ihre wertvollen Ratschläge und Unterstützung.

Dank an Herrn Prof. H. K. Müller-Hermelink für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ganz besonders danke ich Frau Helga Sennefelder und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Humangenetischen Instituts der Universität Würzburg für ihre tatkräftige Unterstützung.

Mein Dank gilt auch Regina Moritz, die mich während meiner Studienzeit und vor allem während der Arbeit an dieser Dissertation begleitet und immer wieder motiviert hat.

Bedanken möchte ich mich nicht zuletzt bei meinen Eltern für ihre unablässige Unterstützung während meines Medizinstudiums und dem Entstehen der Dissertation.

LEBENS LAUF
STEPHAN CHRISTIAN RAUTHE

PERSÖNLICHE DATEN

Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Prof. Dr. med. Gerhard Rauthe, Gynäkologe
Renate Rauthe, geb. Harr, Operationsfachschwester/ Study Nurse
Geburtstag: 30.11.1977
Geburtsort: Giessen / Lahn

SCHULLAUFBAHN

August 1984 – Juli 1988: Grundschule in Linden (Hessen)
September 1988 – Juni 1997: Staatliches Gymnasium Lindenberg in Allgäu
Mai 1997: Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

ZIVILDIENTST

Juli 1997 – Juli 1998: Zivildienst in der Schlossbergklinik Oberstaufen

STUDIUM

September 1998 – März 1999 Studium der Philosophie, Rhetorik und Neueren
Deutschen Literatur an der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen
April 1999 Beginn des Medizinstudiums an der Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
März 2001 Physikum
März 2002 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 2004 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
März 2005 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

PRAKTISCHES JAHR

Praktisches Jahr vom April 2004 bis März 2005 an den Kliniken der Universität Würzburg:
Chirurgische Universitätsklinik, Medizinische Klinik, Klinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe

FORSCHUNGSTÄTIGKEIT

Juli 2003 – September 2003: Forschungsaufenthalt an der University of Sydney (Division of
Women and Children's Health), Zusammenarbeit mit dem Centenary Institute Sydney und der
Faculty of Veterinary Medicine

KLINISCHE TÄTIGKEIT

Juli 2005 bis November 2006 Assistenzarzt an der Klinik für Frauenheilkunde und
Geburtshilfe der Universität Würzburg
Seit Dezember 2006 Assistenzarzt am Pathologischen Institut der Universität
Würzburg

