

**Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeitsgruppe Klinische Biochemie

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Generierung und Charakterisierung von Makrophagen-Zelllinien  
aus  $Ccr5^{-/-}/p53^{-/-}$  - und  $p53^{-/-}$ -Mäusen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marie-Christine Becker

aus

Marburg/Lahn

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. D. Schlöndorff
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. M. Jochum Prof. Dr. med. E. Faist
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. rer. nat. B. Luckow
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	17. Januar 2008





# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Immunbiologische Grundlagen .....	1
1.1.1	Angeborenes und erworbenes Immunsystem .....	1
1.1.2	Makrophagen als Teil des angeborenen Immunsystems .....	1
1.2	Chemokine und ihre Rezeptoren .....	2
1.2.1	Einteilung der Chemokine .....	2
1.2.2	Struktur und Funktion von Chemokinrezeptoren .....	3
1.2.3	Die Rolle von Chemokinrezeptoren bei verschiedenen Erkrankungen .....	6
1.2.4	Die Rolle des Chemokinrezeptors 5 beim Menschen und in der Maus .....	7
1.2.5	Modelle zur Rolle von Ccr5 bei entzündlichen Erkrankungen in der Maus .....	8
1.2.6	Chemokinrezeptoren und ihre Rolle in Makrophagen .....	9
1.3	Zielsetzung der Arbeit .....	11
<b>2</b>	<b>Material</b> .....	<b>13</b>
2.1	Chemikalien und Reagenzien .....	13
2.2	Puffer und Lösungen .....	14
2.3	Mäuse .....	15
2.4	Zelllinien .....	15
2.5	Zellkulturmedien und Lösungen .....	15
2.6	Zellkultur .....	16
2.7	Mykoplasmentestung .....	16
2.8	Bakterien .....	16
2.9	Kulturmedien für Bakterien .....	17
2.10	Antikörper .....	17
2.11	Material zur Anreicherung CD11b-positiver Zellen .....	18
2.12	Reagenzien-Kits .....	18
2.13	Oligonukleotidprimer .....	18
2.14	Geräte .....	19
2.15	Sonstiges .....	19
2.16	Verwendete Software .....	20
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.1	Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen aus CCR5 <sup>-/-</sup> /p53 <sup>-/-</sup> - und p53 <sup>-/-</sup> -Mäusen ....	21
3.2	Nomenklatur .....	23
3.3	Zellkultur .....	23

3.3.1	Zelllinien.....	23
3.3.2	Kultivierung, Passagierung und Kryokonservierung.....	23
3.3.3	Variationen in den Kulturbedingungen .....	24
3.3.4	Serielle Verdünnung zur Überprüfung der Immortalisierung der Zelllinien.....	26
3.3.5	Langzeitkultivierung.....	27
3.3.6	Etablierung von Subzelllinien .....	27
3.4	Morphologie der Zellen .....	27
3.5	Mykoplasmentestung .....	27
3.6	Analyse von Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	28
3.7	Anreicherung CD11b-positiver Zellen.....	30
3.7.1	Anreicherung CD11b-positiver Zellen durch MACS-MicroBeads .....	30
3.7.2	Anreicherung CD11b-positiver Zellen durch Dynal-Biotech-Dynabeads.....	31
3.8	Überprüfung des Genotyps der Zelllinien durch Polymerasekettenreaktion .....	32
3.9	Analyse der Genexpression ausgewählter Gene mit Hilfe von RT-PCR.....	32
3.9.1	RNA-Isolierung .....	32
3.9.2	Messung der RNA-Konzentration .....	33
3.9.3	Gelelektrophorese.....	33
3.9.4	DNase-Verdau der RNA.....	34
3.9.5	Reverse Transkription.....	34
3.9.6	Polymerasekettenreaktionen (PCR).....	35
3.10	Phagozytoseassay.....	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1	Zellkultur .....	41
4.1.1	Kultivierung.....	41
4.1.2	Variationen in den Kulturbedingungen .....	41
4.1.3	Serielle Verdünnung.....	45
4.1.4	Langzeitkultivierung.....	45
4.1.5	Etablierung von Subzelllinien .....	46
4.2	Morphologie der Zellen .....	46
4.3	Mykoplasmentestung .....	51
4.4	Überprüfung des Genotyps der Zelllinien durch Polymerasekettenreaktion (PCR) ..	52
4.5	Anreicherung CD11b-positiver Zellen.....	53
4.5.1	Anreicherung CD11b-positiver Zellen durch <i>MACS-MicroBeads</i> .....	53
4.5.2	Anreicherung CD11b-positiver Zellen durch <i>Dynal-Biotech-Dynabeads</i> .....	54
4.5.3	Serielle Verdünnung von phagozytierenden Zellen.....	54
4.6	Analyse der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie .....	57
4.7	Analyse der Genexpression ausgewählter Gene mit Hilfe von RT-PCR.....	64
4.7.1	Isolierung und gelelektrophoretische Auftrennung von RNA aus den Zelllinien ..	64
4.7.2	Expression der Chemokinrezeptoren <i>Ccr1</i> , <i>Ccr2</i> und <i>Ccr5</i> .....	65
4.7.3	Expression von Lysozym.....	69
4.8	Phagozytoseassays .....	70

---

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
5.1	Der Einsatz von Zelllinien: Vor- und Nachteile .....	75
5.2	Verschiedene Ansätze zur Generierung Ccr5-defizienter Makrophagen-Zelllinien..	76
5.3	Immortalisierung von hämatopoetischen Zellen durch Ausschalten von p53 .....	76
5.4	Auswirkungen der p53-Defizienz auf die Zelllinien .....	78
5.5	Dedifferenzierung der Zellen.....	80
5.6	Durchflusszytometrische Analysen .....	81
5.6.1	Vermeidung unspezifischer Signale .....	81
5.6.2	Analyse von Leukozyten- und Makrophagen-spezifischen Markern.....	83
5.7	Charakterisierungen der Zelllinien mittels RT-PCR und Phagozytoseassays .....	85
5.8	Etablierung von Subzelllinien.....	86
5.9	Ausblick.....	87
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>105</b>
	Abkürzungsverzeichnis.....	105
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	109
	Danksagung .....	111
	Lebenslauf.....	113



# 1 Einleitung

## 1.1 Immunbiologische Grundlagen

### 1.1.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Das Immunsystem der Säugetiere lässt sich formell in zwei Bereiche unterteilen: Makrophagen und neutrophile Granulozyten bilden die so genannte angeborene, unspezifische Abwehr, während Lymphozyten Teil des erworbenen, spezifischen Abwehrsystems sind. Die Zellen des angeborenen Immunsystems spielen eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und der Ausrichtung der Immunantwort sowie bei der anschließenden Beseitigung der Pathogene. Da bis zur vollständigen Aktivierung des erworbenen Immunsystems vier bis sieben Tage verstreichen, kontrolliert das angeborene Immunsystem während dieser Zeit die primäre Immunantwort.

Im Gegensatz zu den Zellen der unspezifischen Abwehr werden die Lymphozyten des erworbenen Immunsystems im Laufe ihrer Reifung und Entwicklung zu spezialisierten Zellen, die spezifisch gegen bestimmte Antigene gerichtet sind und deren Aufgabe es unter anderem ist, den Körper gegen Reinfektionen mit einem Pathogen zu schützen. Allerdings kann es durch fehlgeleitete oder überschießende Immunreaktionen des erworbenen Immunsystems zu Autoimmunkrankheiten und Allergien kommen.

Funktionell lassen sich jedoch die angeborene und die erworbene Immunität nicht ohne weiteres voneinander trennen. Durch eine Vielzahl komplexer Mechanismen interagieren sie miteinander, auch aktivieren oder hemmen sie sich gegenseitig, um so die Immunreaktionen zu regulieren.

### 1.1.2 Makrophagen als Teil des angeborenen Immunsystems

In einer kurzen Definition des amerikanischen Lehrbuchs von *C. A. Janeway et al.* „Immunobiology“ werden Makrophagen und ihre Aufgabe wie folgt charakterisiert: Makrophagen sind mononukleäre Zellen und besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der angeborenen Immunität und bei der unspezifischen Abwehr von Krankheitserregern. Bei der erworbenen, spezifischen Immunität agieren Makrophagen sowohl als Antigen-präsentierende Zellen als auch als so genannte Effektorzellen. Makrophagen entwickeln sich aus Vorläuferzellen im Knochenmark und verteilen sich dann in den unterschiedlichen Geweben des Körpers (Janeway et al., 2001).

Dringen Mikroorganismen wie Bakterien in den Körper ein, treffen sie zunächst auf Zellen des angeborenen Immunsystems, wie beispielsweise Makrophagen; diese werden durch den Kontakt mit dem Antigen aktiviert. Die aktivierten Makrophagen sezernieren dann Zytokine und initiieren so den Entzündungsprozess. Unterschiedliche Leukozytenpopulationen werden angezogen, adhären am Endothel der Blutgefäße und wandern durch die Gefäßwände hindurch in das Gebiet des Entzündungsgeschehens ein. Bei diesen Prozessen handelt es sich um gezielte Bewegungen von Leukozyten entlang eines Gradienten, der von den ausgeschütteten Zytokinen gebildet wird. Dieses Phänomen wird als Chemotaxis bezeichnet. Zudem besitzen Leukozyten die Fähigkeit, durch Gefäßwände hindurch zu wandern, was Diapedese genannt wird.

## 1.2 Chemokine und ihre Rezeptoren

Chemokine sind acht bis vierzehn Kilodalton große, sezernierte Proteine, die zum Teil ein hohes Maß an Homologie in ihren Aminosäuresequenzen aufweisen. Der Name der Chemokine leitet sich von ihrer Funktion ab: Sie bilden eine Gruppe *chemotaktisch wirksamer Cytokine*, also kurz *Chemokine*, denen eine Schlüsselrolle bei Prozessen wie Chemotaxis und Diapedese zukommt (Luster, 1998). Darüber hinaus können sie die Gentranskription in Zellen beeinflussen oder Prozesse wie Zellteilung und Exozytose von Zellgranula initiieren. Chemokine werden hauptsächlich von leukozytären Zellen sezerniert. Zusätzlich werden sie allerdings auch von einer Vielzahl von Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs gebildet, so beispielsweise von Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Bindegewebszellen, Neuronen und Epithelzellen (Gerard und Rollins, 2001). Ihre Wirkung wird durch die Bindung an spezifische Rezeptoren, die so genannten Chemokinrezeptoren, vermittelt, welche sich an der Membranoberfläche der Zielzellen befinden.

### 1.2.1 Einteilung der Chemokine

Im Jahr 1977 wurde von Walz *et al.* das erste menschliche Chemokin, *native platelet factor 4* (PF4/CXCL4), sequenziert (Walz *et al.*, 1977). Seither konnten über 40 verschiedene Chemokine beim Menschen identifiziert werden. Sie lassen sich anhand der Anzahl und des Abstands der N-terminalen Cysteine in mehrere Gruppen unterteilen. Dabei unterscheidet man mindestens vier Gruppen: Die Unterfamilien der CXC- und der CC-Chemokine besitzen jeweils vier Cysteine; in der Gruppe der CXC-Chemokine sind die beiden N-terminalen Cysteine durch eine weitere Aminosäure voneinander getrennt (Cystein–Aminosäure–Cystein, CXC), wohingegen die N-terminalen Cysteine der CC-Chemokine direkt miteinander verbunden sind (Cystein–Cystein, CC). Zwei Chemokine, die sich nicht in diese Gruppen einordnen lassen, sind

die Chemokine Lymphotactin (XCL1) und Fraktalkin (CX3CL1). Lymphotactin besitzt insgesamt nur zwei Cysteine (XC), bei Fraktalkin sind die ersten beiden Cysteine durch drei Aminosäuren voneinander getrennt (CXXXC) (Baggiolini et al., 1994; Baggiolini et al., 1997; Luster, 1998).

Darüber hinaus kann man Chemokine funktionell in zwei Klassen einteilen: Die *konstitutiven Chemokine* werden unter physiologischen Bedingungen – vorwiegend in lymphatischem Gewebe – produziert und steuern so die Migration der Leukozyten unter physiologischen Bedingungen. Die *induzierbaren Chemokine* werden als Antwort auf entzündliche Prozesse gebildet und vermitteln eine unter diesen Bedingungen gesteigerte Rekrutierung von Leukozyten (Mantovani, 1999).

Bis vor Kurzem herrschte viel Unklarheit und Verwirrung hinsichtlich der Nomenklatur der Chemokine. So wurden zum Beispiel manche Chemokine zur Gruppe der Interleukine gezählt (z.B. IL-8 bzw. CXCL8); andere wurden nach ihrer Funktion benannt, wie zum Beispiel MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1* bzw. CCL2). Daher ging man – analog zur damals bereits verwendeten Nomenklatur der Chemokinrezeptoren – zu einer neuen und systematischen Nomenklatur über: Dabei werden die Chemokine entsprechend der Reihenfolge ihrer Cysteine (CC, CXC, XC und CX3C) einer Gruppe zugeordnet. Die Abkürzungen CC, CXC, XC und CX3C werden dann mit einem „L“ für „Ligand“ und einer Zahl kombiniert (Zlotnik und Yoshie, 2000). So wird beispielsweise das CC-Chemokin MCP-1 nun CCL2 genannt.

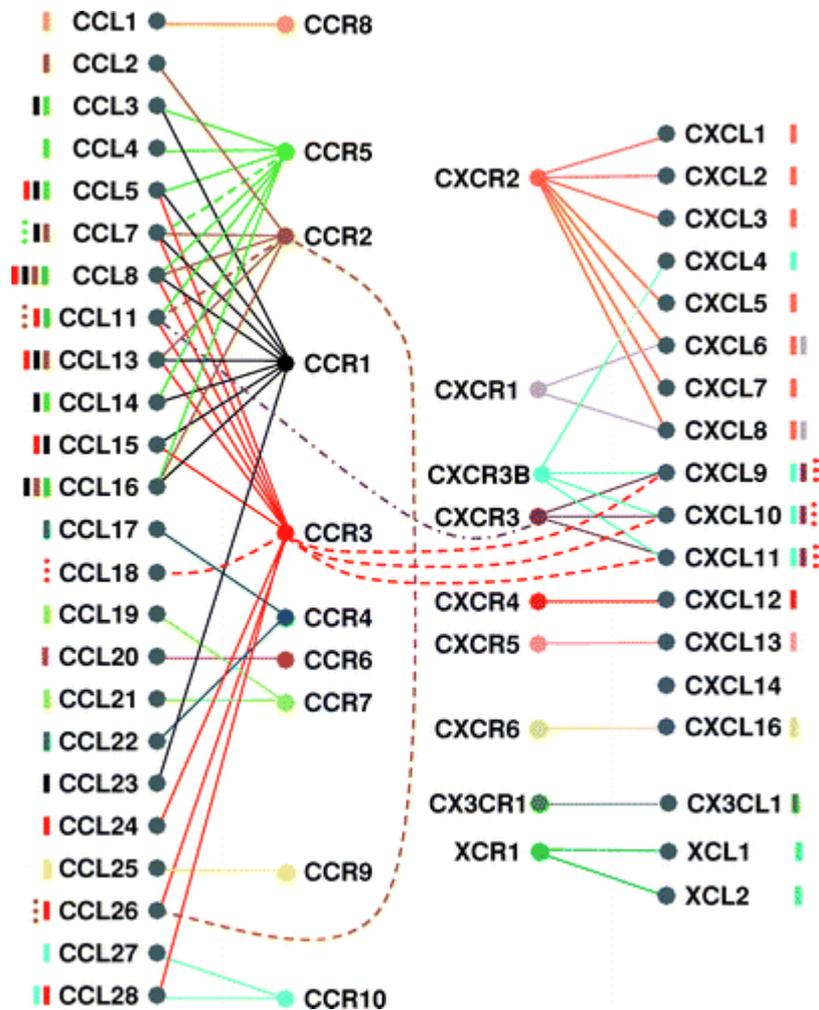
### 1.2.2 Struktur und Funktion von Chemokinrezeptoren

Chemokine vermitteln ihre Wirkung durch die Bindung an spezielle, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die über sieben Transmembrandomänen an der Oberfläche der Zielzellen verankert sind. Bisher wurden sieben CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR1-7), zehn CC-Chemokinrezeptoren (CCR1-10) und jeweils ein CX3C- (CX3CR1) und ein XC-Rezeptor (XCR1) identifiziert (Charo und Ransohoff, 2006). Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren ist der Nomenklatur der Chemokine sehr ähnlich. In Abhängigkeit von ihren Liganden werden die Rezeptoren in vier Gruppen unterteilt: CXC-, CC-, XC- und CX3C-Rezeptoren. Diese Abkürzungen werden mit einem „R“ für „Rezeptor“ und einer Zahl kombiniert.

Chemokinrezeptoren werden vorwiegend auf Leukozyten-Subpopulationen exprimiert, wobei manche Rezeptoren nur von einer bestimmten, andere wiederum von verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen gebildet werden. Des Weiteren können Chemokinrezeptoren auch auf Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs exprimiert werden, wie zum Beispiel auf

Neuronen, Astrozyten, Epithelzellen, Endothelzellen (Luster, 1998) und auf Mesangialzellen in der Niere (Banas et al., 1999).

Das System der Chemokine und ihrer Rezeptoren bildet ein redundantes Netzwerk, ist hoch komplex, und die Spezifitäten überlappen sich. So können einige Chemokine an verschiedene Rezeptoren binden, umgekehrt kann ein Rezeptor mehrere verschiedene Chemokine binden (Mantovani, 1999; Murphy et al., 2000). Abbildung 1.1 zeigt dies schematisch. Wie die Chemokine kann man auch die Chemokinrezeptoren analog ihrer Funktion in konstitutive und induzierbare Rezeptoren unterteilen: Konstitutive Chemokinrezeptoren werden unter physiologischen Bedingungen exprimiert, während induzierbare Chemokinrezeptoren vermehrt bei Entzündungsreaktionen gebildet werden und so eine gesteigerte Rekrutierung von Leukozyten bewirken.



**Abbildung 1.1 Redundantes Netzwerk aus humanen Chemokinen und ihren Rezeptoren**

Die Abbildung gibt einen Überblick über das hoch komplexe und redundante Netzwerk aus Chemokinrezeptoren und Chemokinen. Die durchgezogenen Linien verbinden die Chemokinrezeptoren mit ihren agonistisch wirkenden Liganden, während sie mit ihren Antagonisten durch gestrichelte Linien verbunden sind (Rot und von Andrian, 2004).

### 1.2.3 Die Rolle von Chemokinrezeptoren bei verschiedenen Erkrankungen

Seit dem Jahre 1996 stehen die Chemokinrezeptoren insofern ganz besonders im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, als entdeckt wurde, dass einige dieser Rezeptoren als Corezeptoren bei Infektionen mit HI-Viren fungieren: CCR5 bei der Infektion von Makrophagen (Blanpain et al., 2002) und CXCR4 bei der Infektion von T-Zellen mit HIV-1 (Feng et al., 1996). In Europa sind etwa 1 % der Bevölkerung homozygot, 10 bis 15 % der Bevölkerung heterozygot Träger (Martinson et al., 1997; Libert et al., 1998; Stephens et al., 1998) einer Mutation im CCR5-Gen; dies entspricht einer sehr hohen Allelfrequenz. Die Mutation wird durch eine Deletion von 32 Basenpaaren im kodierenden Bereich des humanen CCR5-Gens charakterisiert (Dean et al., 1996; Doranz et al., 1996; Dragic et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996b). Der Name dieses Mutationsallels lautet CCR5 $\Delta$ 32. Homozygote Träger zeigen eine starke Resistenz gegenüber einer Infektion mit HIV-1 (Dean et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996b; Biti et al., 1997), haben ansonsten allerdings einen unauffälligen Phänotyp und sind gesund.

Die Frage, warum die CCR5 $\Delta$ 32-Mutation in der weißen Bevölkerung kaukasischen Ursprungs so überraschend häufig ist, konnte bisher nicht klar beantwortet werden. Man nimmt unter anderem an, dass diese Mutation des CCR5-Gens erst vor einigen tausend Jahren und nur ein einziges Mal aufgetreten ist. Sie wurde an die Nachkommen weitergegeben und stellte für ihre Träger höchst wahrscheinlich einen Selektionsvorteil bei einer der großen Seuchen der vergangenen zwei Jahrtausende, wie beispielsweise Pest oder Pocken, dar (Libert et al., 1998). In ersten Experimenten an Mäusen konnte allerdings gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit *Yersinia pestis* zwischen Ccr5-Wildtyp- und -„Knockout“-Tieren keine Unterschiede in der Überlebenszeit bestehen (Elvin et al., 2004; Meccas et al., 2004). Allerdings dürften die Mechanismen komplexer sein: In *in-vitro*-Experimenten zeigten aus Peritoneallavage isolierte Ccr5-defiziente Makrophagen eine signifikant geringere Fähigkeit zur Phagozytose von *Yersinia pestis* als Makrophagen aus Wildtyp-Tieren (Elvin et al., 2004).

Darüber hinaus scheinen Chemokinrezeptoren in die Pathogenese einer Vielzahl weiterer Erkrankungen involviert zu sein. So wurden beispielsweise die Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5, CXCR2 und CXCR3 auf infiltrierenden Leukozyten in Gelenken von Arthritispatienten nachgewiesen (Mack et al., 1999; Brühl et al., 2001; Gerard und Rollins, 2001). In einer groß angelegten Studie ließ sich zeigen, dass bei Arthritispatienten die Allelfrequenz der CCR5 $\Delta$ 32-Mutation unter dem Niveau der für die Normalbevölkerung typischen Allelfrequenz lag (Gomez-Reino et al., 1999). In einer zweiten Studie zeigten Träger der CCR5 $\Delta$ 32-Mutation

einen deutlich milderen Verlauf der Krankheit (Garred et al., 1998). Auch bei Abstoßungsreaktionen von Organtransplantaten kommt dem Chemokinrezeptor CCR5 und seiner CCR5 $\Delta$ 32-Mutation eine besondere Bedeutung zu. In einer Studie zur Überlebenszeit von Nierentransplantaten zeigte sich ein signifikant längeres Transplantatüberleben bei Patienten, die homozygot hinsichtlich der CCR5 $\Delta$ 32-Mutation waren (Fischereder et al., 2001).

Chemokine und Chemokinrezeptoren scheinen auch bei Krankheiten wie Multipler Sklerose, Asthma, Gefäßerkrankungen, u.a. der Arteriosklerose (Gerard und Rollins, 2001; Braunersreuther et al., 2007) und bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen der Niere (Segeer et al., 2000) von Bedeutung zu sein. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass beispielsweise der Chemokinrezeptor CCR2 von Adipozyten exprimiert wird (Gerhardt et al., 2001) und bei seiner Aktivierung durch CCL2 die Insulin-abhängige Aufnahme von Glucose vermindert wird. Auf diese Weise scheint CCR2 mitverantwortlich für die Entwicklung der Insulinresistenz bei Diabetes mellitus Typ II zu sein (Charo und Ransohoff, 2006). Es gibt noch viele offene Fragen in Bezug auf die Rolle von Chemokinen und ihren Rezeptoren in der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen, die es in Zukunft zu klären gilt.

#### **1.2.4 Die Rolle des Chemokinrezeptors 5 beim Menschen und in der Maus**

Der Chemokinrezeptor CCR5 (human) zählt zu der Gruppe der CC-Chemokinrezeptoren. Die Sequenz und die Liganden für den humanen CCR5-Rezeptor wurden erstmals im Jahre 1996 beschrieben (Samson et al., 1996a). CCR5 wird beim Menschen hauptsächlich auf Makrophagen, unreifen Dendritischen Zellen und T-Zellen, aber auch auf Neuronen, Mikroglia, Endothelzellen, Epithelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert. CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES und CCL8/MCP-2 binden mit hoher Affinität an CCR5 und wirken agonistisch, während CCL7/MCP-3 als natürlicher Antagonist am Rezeptor agiert (Murphy et al., 2000).

Die Expression der Chemokinrezeptoren, so auch des Chemokinrezeptors Ccr5 (murin), sind beim Menschen und in der Maus durchaus vergleichbar. Hinsichtlich der CCR5-Expression auf Makrophagen und T-Zellen konnten keine Unterschiede zwischen Mensch und Maus festgestellt werden. Lediglich die Expression von Ccr5 auf Natürlichen Killerzellen in Mäusen ist deutlich höher als die CCR5-Expression beim Menschen (Mack et al., 2001).

### 1.2.5 Modelle zur Rolle von Ccr5 bei entzündlichen Erkrankungen in der Maus

Da die Expressionsmuster von CCR5 beim Menschen und bei der Maus stark miteinander korrelieren, wurde zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge bei entzündlichen Erkrankungen eine Vielzahl von Mausmodellen entwickelt. Insofern besteht die Hoffnung, dass man über sie Rückschlüsse auf die Rolle von CCR5 beim Menschen ziehen und Optionen für mögliche therapeutische Interventionen aufzeigen kann. Bei vielen dieser Mausmodelle kommen Ccr5-defiziente Mäuse zum Einsatz. Im Folgenden sollen beispielhaft einige dieser Modelle erläutert werden:

In Studien konnte einerseits gezeigt werden, dass Ccr5-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren deutlich anfälliger für Infektionen mit Erregern wie beispielsweise *Cryptococcus neoformans* (Huffnagle et al., 1999) und *Toxoplasma gondii* (Aliberti et al., 2000) waren. Andererseits überlebten Ccr5-defiziente Mäuse nach Injektion einer letalen Dosis Lipopolysaccharid (LPS) signifikant länger als die Wildtyp-Tiere (Zhou et al., 1998).

Ein Beispiel für die Komplexität der durch Ccr5 vermittelten Prozesse bilden die Studien von *Murai et al.* sowie *Wysocki et al.* zur Untersuchung der Graft-versus-Host-Disease (GVHD) nach Knochenmarktransplantation in Mäusen. So konnte zwar im Gegensatz zur Infiltration durch Ccr5-positive T-Zellen eine verringerte Infiltration durch Ccr5-negative T-Zellen in den Zielorganen der GVHD gezeigt werden (Murai et al., 2003). Doch in einer zweiten Studie zu diesem Thema wiesen Tiere, die zuvor bestrahlt worden waren, nach Transplantation von Ccr5-negativen T-Zellen deutlich schwerere Verläufe der GVHD auf als Tiere, denen man Ccr5-positive T-Zellen transplantiert hatte (Wysocki et al., 2004).

In einem Modell zur Untersuchung des fulminanten Leberversagens (fulminant liver failure, FLF) zeigten Ccr5-defiziente Mäuse einen deutlich schwereren Verlauf und eine höhere Mortalität. Dies könnte man damit erklären, dass nach Induktion des Leberversagens natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) der Ccr5-defizienten Mäuse deutlich weniger apoptotisch wurden als bei den Ccr5-Wildtyp-Tieren (Ajuebor et al., 2005).

Auch zur Klärung der Rolle von Ccr5 in pathologischen Prozessen des Nervensystems wurden Versuche an Ccr5-defizienten Mäusen durchgeführt. In einem Modell zur Pathogenese der zerebralen Malaria wiesen Ccr5-defiziente Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich weniger neurologische Ausfälle und eine verminderte Mortalität auf. In den Wildtyp-Mäusen ließ sich eine signifikant erhöhte Anzahl infiltrierender Ccr5-positiver T-Zellen sowie eine gesteigerte Zytokinexpression nachweisen (Belnoue et al., 2003). Im Gegensatz dazu zeigten sowohl Ccr5-defiziente als auch Ccr5-Wildtyp-Mäuse bei Induktion einer experimentellen

Autoimmunneuritis, die als Tiermodell für das Guillain-Barré-Syndrom beim Menschen verwendet wird, einen ähnlichen klinischen Verlauf der Krankheit und eine ähnliche Anzahl infiltrierender T-Zellen und Makrophagen im Rückenmark. Ursache für den ebenfalls schweren Verlauf der Krankheit bei den Ccr5-defizienten Tieren scheint eine kompensatorisch erhöhte Produktion der Chemokine MIP-1 $\beta$ /CCL4 und IP-10/CXCL10 zu sein (Duan et al., 2004).

Des Weiteren erschienen Arbeiten zum Einfluss von Ccr5 bei Nierenerkrankungen. In einem Maus-Modell zur Lupus-Nephritis, dem so genannten MRL/lpr-Modell, zeigten Wildtyp-Mäuse eine erhöhte Expression von Chemokinrezeptoren, unter anderem von Ccr5 (Perez de Lema et al., 2001). In einer anderen Publikation wurde versucht, die Rolle der Chemokinrezeptoren Ccr1 und Ccr5 bei der renalen Fibrose unter Anwendung des UUO-Modells zu klären. UUO steht dabei für unilaterale Ureterobstruktion, durch die im Tiermodell eine Nierenfibrose induziert werden kann. Dabei fand man heraus, daß Ccr1 und nicht Ccr5 für die Rekrutierung der Leukozyten und folglich für die Entwicklung der Nierenfibrose verantwortlich sein dürfte (Eis et al., 2004). Andererseits zeigten Mäuse in einem Glomerulonephritis-Modell bei Behandlung mit einem RANTES/CCL5-Antagonisten eine reduzierte Zellproliferation in den Glomeruli und eine verminderte Rekrutierung von Makrophagen. Überraschenderweise verlief jedoch bei diesen Mäusen die Erkrankung deutlich schwerer als in den Kontrollgruppen. Eine mögliche Erklärung dafür bietet die Beobachtung, daß in den mit dem CCL5-Antagonisten behandelten Mäusen die Anzahl apoptotischer Zellen in den Glomeruli erhöht war, diese aber offensichtlich nicht ausreichend von Makrophagen beseitigt werden konnten. Zusätzlich zeigte sich eine erhöhte NO-Produktion in den glomerulären Makrophagen (Anders et al., 2003).

Eine Vielzahl weiterer Modelle zur Klärung der Rolle von Ccr5 bei den verschiedensten entzündlichen Erkrankungen in der Maus wurde bisher entwickelt. Allerdings lässt sich schon an dieser begrenzten Auswahl von Beispielen erkennen, wie komplex die Zusammenhänge sind und wie schwierig sich die Interpretation der gewonnenen Erkenntnisse gestaltet.

### **1.2.6 Chemokinrezeptoren und ihre Rolle in Makrophagen**

Für die Migration von Makrophagen im Organismus ist die Interaktion zwischen den im Gewebe produzierten Chemokinen und den auf den Makrophagen exprimierten Chemokinrezeptoren von entscheidender Bedeutung. Makrophagen und ihre Vorläufer, die Monozyten, gehören zu den Zellen, die auf eine Vielzahl von Chemokinen äußerst sensibel reagieren (Mantovani, 1999). Die Wirkung der Chemokine auf Makrophagen wird durch ein breites Spektrum an Chemokinrezeptoren vermittelt. So konnte in humanen, aus Blut isolierten Monozyten die Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CCR9, CCR10, CXCR1-4 und CX3CR1 nachgewiesen werden.; bei der Differenzierung der Monozyten zu

Makrophagen änderte sich dann das Expressionsprofil der Zellen: die Expression der Rezeptoren CCR1, CCR3, CCR5 und CCR10 wurde verstärkt, wohingegen sich die Expression der Rezeptoren CCR2, CCR9, CXCR1, CXCR2 und CX3CR1 verminderte (Kaufmann et al., 2001; Mack et al., 2001; Patel et al., 2001).

Bei vielen der oben genannten Prozesse sind Makrophagen in das Entzündungsgeschehen und die pathophysiologischen Vorgänge involviert. In Studien wurde versucht, die genaue Funktion der Chemokinrezeptoren in Makrophagen zu klären. Beispielsweise wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um Erkenntnisse über die komplexen Zusammenhänge bei der Infektion von Makrophagen mit HIV und die Rolle des HIV-Corezeptors CCR5 zu erhalten.

In Untersuchungen zu Infektionen mit dem neurotrophen Maus-Hepatitis-Virus (MHV) zeigte sich in Ccr5-defizienten Mäusen eine verminderte Infiltration von Makrophagen und folglich eine verminderte Demyelinisierung im zentralen Nervensystem (Glass et al., 2001). In einer Studie zur Induktion einer Kolitis durch Dextran-Natriumsulfat (DSS-Kolitis) und gleichzeitiger Blockade der Chemokinrezeptoren CCR2, CCR5 und CXCR3 zeigten Mäuse eine fast vollständig fehlende Makrophagen-Infiltration im Kolon und eine verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen (Tokuyama et al., 2005).

Bei Blockade der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 in Ratten durch Met-RANTES, einem Chemokinrezeptorantagonist, wiesen diese Tiere bei Induktion einer rheumatoiden Arthritis eine verminderte Anzahl rekrutierter neutrophiler Granulozyten und Makrophagen auf. Auch hier konnte eine verminderte Expression verschiedener Zytokine in den betroffenen Gelenken festgestellt werden (Shahrara et al., 2005).

In einer Studie zu Herztransplantationen an Ccr5-defizienten Mäusen wurde zum einen die Überlebenszeit der Transplantate, zum anderen die Expression bestimmter Matrix-Metalloproteinasen untersucht. Matrix-Metalloproteinasen sind substratspezifische Endopeptidasen, die unter anderem auch von Makrophagen gebildet werden und unter physiologischen Bedingungen, Umbauvorgänge in der extrazellulären Matrix steuern. Des Weiteren spielen Matrix-Metalloproteinasen eine entscheidende Rolle beispielsweise bei der rheumatoiden Arthritis (Lindy et al., 1997) oder bei der Metastasierung von Tumorerkrankungen (Visse und Nagase, 2003). In der Studie zu den Herztransplantationen war bei den Ccr5-defizienten Tieren der Zeitraum bis zur Abstoßung des Transplantats verlängert. Histologisch war eine reduzierte Infiltration der transplantierten Herzen mit T-Zellen und Makrophagen festzustellen. Gleichzeitig war die Expression bestimmter Matrix-Metalloproteinasen vermindert. Dabei fiel auf, dass die Expression dieser Gene in stärkerem Maß vermindert war, als durch die reduzierte Infiltration mit Leukozyten erklärt werden konnte.

Daraus ergab sich nun die Frage, ob Ccr5 einen direkten Einfluss auf die Expression bestimmter Gene besitzt (Luckow et al., 2004).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl bisher in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass der Chemokinrezeptor CCR5 bei Immunprozessen eine entscheidende Rolle spielt, herrscht jedoch nach wie vor Unklarheit über die genauen Zusammenhänge insbesondere auf zellulärer Ebene. Ein Großteil der bisherigen Erkenntnisse stammt aus Experimenten an Ccr5-defizienten Mäusen. Um die Aufgaben von CCR5 in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen detailliert klären zu können, scheint es sinnvoll, bestimmte Fragestellungen an einer homogenen Zellpopulation, wie beispielsweise einer Zelllinie, zu bearbeiten.

Die Verwendung von Zelllinien stellt eine sinnvolle Ergänzung zur Verwendung von Ccr5-defizienten Mäusen dar: Ccr5-defiziente Mäuse weisen in allen Zellen ihres Organismus eine Ccr5-Defizienz auf. Bei Versuchen an diesen Tieren werden also stets kombinierte Effekte, die durch die Ccr5-Defizienz in allen Ccr5-exprimierenden Geweben verursacht werden, beobachtet. Aus diesen Überlegungen heraus entstand die Idee, eine murine, Ccr5-defiziente Makrophagen-Zelllinie herzustellen. Dabei scheint es sinnvoll, gleichzeitig eine Ccr5-positive Makrophagen-Zelllinie zu generieren; sie dient sozusagen als „Kontroll-Zelllinie“. Die *in-vitro*-Untersuchung von Ccr5-defizienten Makrophagen-Zelllinien und der Vergleich mit der Ccr5-positiven Kontroll-Zelllinie erlauben Rückschlüsse auf die Funktion von Ccr5 in einem wichtigen, Ccr5-exprimierenden Zelltyp.

Die Generierung der Zelllinien geschah jedoch auch aus praktischen Gesichtspunkten heraus: Immortalisierte Zelllinien bilden eine homogene Zellpopulation. Daher lassen sich die bei verschiedenen Experimenten auftretende Unterschiede reduzieren und die gewonnenen Ergebnisse besser reproduzieren. Des Weiteren erlauben Zelllinien die Durchführung von Experimenten „in großem Stil“, da fast unbegrenzt viele Zellen verfügbar sind.

Es gibt prinzipiell mehrere Ansätze, immortalisierte Zelllinien herzustellen. Am häufigsten erfolgt die Immortalisierung von Zellen durch stabile Transfektion mit dem SV40-T-Antigen-Expressionskonstrukt. Diese Methode erweist sich für unsere Zwecke aber als ungeeignet, da das SV40-T-Antigen an unterschiedlichen Stellen und in unterschiedlicher Anzahl in das Genom integriert wird. Die Herstellung einer Ccr5-positiven Kontroll-Zelllinie erscheint daher unmöglich. Eine zweite Methode zur Immortalisierung leukozytärer Zelllinien basiert auf der Hypothese, dass aus p53-defizienten Mäusen gewonnene hämatopoetische Zellen durch das

Fehlen des Tumorsuppressorgens immortalisiert sind; dies konnte im Jahre 1995 von einer australischen Arbeitsgruppe gezeigt werden (Metz et al., 1995).

Für die Herstellung der Ccr5-negativen Zelllinien sollen zunächst Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäuse durch Verpaarung von Ccr5<sup>-/-</sup>-Mäusen mit p53<sup>-/-</sup>-Mäusen gewonnen werden. Aus ihnen lassen sich anschließend die Makrophagen zur Herstellung der Ccr5-defizienten Zelllinie isolieren. Die Makrophagen zur Generierung der Ccr5-positiven „Kontroll-Zelllinie“ werden aus p53-defizienten, Ccr5-Wildtyp-Mäusen gewonnen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, aus den isolierten Primärzellen durch Langzeitkultivierung homogene Zelllinien zu etablieren. Im Anschluss daran können die Zelllinien zunächst biochemisch und funktionell charakterisiert werden, um dann für Stimulationsexperimente zur Verfügung zu stehen. So lässt sich an den beiden Zelllinien möglicherweise der Einfluss von Ccr5 auf die Genexpression und das Verhalten von Makrophagen genauer untersuchen.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Lineares Acrylamid	Ambion, Austin, Texas, USA
Agarose ( <i>Electrophoresis Grade</i> )	Invitrogen, Karlsruhe
AmpliTaq (1 unit/ $\mu$ l)	Applied Biosystems, Roche, Foster City, California, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
dNTP	Amersham Pharmacia, Bucks, UK
Desoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA-Na <sub>2</sub> Triplex III (0,5 M)	Merck, Darmstadt
Ethanol (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt
Formamid	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Gelatine	Sigma-Aldrich, Steinheim
Gentamicin (Gencin ® 80 mg)	curasan, Kleinostheim
Hexanukleotide	Applied Biosystems, Roche, Foster City, California, USA
KCl (2 M)	Merck, Darmstadt
1 kb-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	Merck, Darmstadt
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
MOPS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Nonidet P40	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
PCR-Puffer	Applied Biosystems, Roche, Foster City, California, USA
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNasin (40 units/ $\mu$ l)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
SS-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe

Tris-HCl (pH 8,3, 1 M)

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Tween 20

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

## 2.2 Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser 0,1 %

1 ml Diethylpyrocarbonat

1000 ml VE-Wasser

1,25 mM dNTP

15 µl 100 mM dATP

15 µl 100 mM dCTP

15 µl 100 mM dGTP

15 µl 100 mM dTTP

1140 µl DEPC-Wasser

25 mM dNTP

100 µl 100 mM dATP

100 µl 100 mM dCTP

100 µl 100 mM dGTP

100 µl 100 mM dTTP

Ladepuffer

500 µl 5 % BPB

500 µl 5 % XCB

3000 µl 100 % Glycerol

6000 µl H<sub>2</sub>O

MACS-Puffer

500 ml PBS

26,5 ml 10 % BSA

6,7 ml 150 mM EDTA

10 x MOPS-Puffer

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 mM EDTA

1 x PBNB	50 mM KCl
	10 mM Tris-HCl
	2.5 mM MgCl <sub>2</sub>
	0,01 % w/v Gelantine
	0,45 % v/v Nonidet P40
	0,45 % v/v Tween 20
	H <sub>2</sub> O
10 x TBE-Puffer	25 mM EDTA
	900 mM TRIS-Base
	889 mM Borsäure

## 2.3 Mäuse

Die zur Herstellung der Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>- und der p53<sup>-/-</sup>-Makrophagen-Zelllinien verwendeten p53<sup>-/-</sup>-C57BL/6-Mäuse (Donehower et al., 1992) wurden von der Firma Taconic M&B A/S, Dänemark, bezogen. Die Ccr5<sup>-/-</sup>-C57BL/6 Mäuse waren im Labor von Dr. Bruno Luckow, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, Medizinische Poliklinik, LMU München hergestellt worden (Luckow et al., 2004).

## 2.4 Zelllinien

Die J774-Zellen, eine murine Makrophagen-Zelllinie, wurde über ATCC (American Type Culture Collection), USA, die NIH 3T3-Zellen, eine murine Fibroblasten-Zelllinie, über ecacc (European Collection of Cell Cultures), UK, bezogen.

## 2.5 Zellkulturmedien und Lösungen

Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun AG, Melsungen
DMEM+Glutamax	Gibco BRL Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Foetal Bovine Serum (LOT: A01123-227)	PAA Laboratories, Wien, Österreich
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Berlin
Rekombinantes murines M-CSF	Peptotech, Rocky Hill, New Jersey, USA
Dulbecco's PBS (1x), ohne Ca & Mg	PAA Laboratories, Wien, Österreich

Penicillin/Streptomycin (10 000 units/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	PAA Laboratories, Wien, Österreich
RPMI 1640+Glutamax	Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA in PBS)	PAA Laboratories, Wien, Österreich

## 2.6 Zellkultur

Einfrierröhrchen <i>Cryovials</i>	Simport, Beloeil, Québec, Kanada; bezogen über J. Peske GmbH, Aindling
Konisches Röhrchen, Falcon, 15 ml, Polypropylen	Becton Dickinson, Heidelberg
Petrischalen, 94 x 16 mm, mit Nocken („mikrobiologische Schalen“)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
PS-6-Well-Platten, Standard mit Abdeckplatte („mikrobiologische Schalen“)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Qualifreeze Cryo-Einfriergerät	Nalgene, NUNC™ International, Wiesbaden
Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen, 100 x 20 mm, zellkulturbehandelt, gammasterilisiert	TPP, Trasadingen, Schweiz
6-Well-Zellkulturschalen	Nalgene, NUNC™ International, Wiesbaden
96-Well-Zellkulturschalen	Costar, Bodenheim
Zellschaber, 24 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz

## 2.7 Mykoplasmentestung

Der Test der kultivierten Zellen auf eine mögliche Kontamination durch Mykoplasmen erfolgte unter Verwendung des *MycAlert Mycoplasma Detection Assay* von Cambrex Bio Science, Rockland, USA.

## 2.8 Bakterien

Für die Phagozytoseassays wurde der *E.coli*-K12-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet; er wurde freundlicherweise von Dr. Luckow zur Verfügung gestellt

## 2.9 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium	1 % Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
Agarplatten	LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar

## 2.10 Antikörper

Die für die durchflusszytometrischen Analysen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

**Tabelle 2.1** Verwendete mono- und polyklonale Antikörper sowie Isotyp-Kontrollen

Antikörper	Antigen	Färbung	Hersteller
<i>Fluoreszenz-gefärbte, primäre Antikörper</i>			
monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD45-Ak	CD45	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD11b-Ak	CD11b	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
monoklonaler Ratte-anti-Maus-F4/80-Ak	F4/80	FITC	Serotec, Düsseldorf
monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD3-Ak	CD3	FITC	Caltag, Burlingame, CA, USA
monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD19-Ak	CD19	R-PE	BD Pharmingen, Heidelberg
monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD4-Ak	CD4	APC	BD Pharmingen, Heidelberg
monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD8 $\alpha$ -Ak	CD8 $\alpha$	PE-Cy5	BD Pharmingen, Heidelberg
monoklonaler Hamster-anti-Maus-CD11c-Ak	CD11c	FITC	Serotec, Düsseldorf
<i>ungefärbte, primäre Antikörper</i>			
monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD11b-Ak	CD11b	ungefärbt	BD Pharmingen, Heidelberg
monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD14-Ak	CD14	ungefärbt	BD Pharmingen, Heidelberg
<i>Fluoreszenz-gefärbte, sekundäre Ak</i>			
Maus-anti-Ratte-IgG(H+L)-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	IgG	Cy2	Jackson, Bar Harbor, ME, USA
polyklonaler Kaninchen-anti-Ratte-Ig-Ak	v.a. IgG	FITC	DakoCytomation, Hamburg
<i>Isotyp-Kontrollen</i>			
Ratte-IgG2b, kappa	unspezifisch	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte-IgG2b, kappa	unspezifisch	ungefärbt	BD Pharmingen, Heidelberg
<i>Fc-Rezeptor-Block</i>			
Monoklonaler Ratte-anti-Maus-CD16/CD32-Antikörper (Fc $\gamma$ III/II Rezeptor)	CD16/32	ungefärbt	BD Pharmingen, Heidelberg

## 2.11 Material zur Anreicherung CD11b-positiver Zellen

Zur magnetischen Anreicherung der CD11b-positiven Zellen wurden zum einen Dynabeads-M-450-Sheep-anti-Rat-IgG und ein *Magnetical particle concentrator* (MPC) von Dynal Biotech, Norwegen, verwendet. Zum anderen wurden MACS-CD11b-MicroBeads von Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, eingesetzt. Die *MACS Pre-Separation Filters* und die *MACS MS Separation Columns* stammten ebenfalls von Miltenyi Biotech.

## 2.12 Reagenzien-Kits

Die Isolation von RNA aus den kultivierten Zellen erfolgte unter Verwendung des *RNeasy Mini Kit* von Qiagen, Hilden.

## 2.13 Oligonukleotidprimer

Die Sequenzen der Primer für das Ccr1-Wildtyp- und -„Knockout“-Gen wurden von Phil Murphy, die Sequenzen für das p53-Wildtyp- und -„Knockout“-Gen von M. Yamamoto (Yamamoto et al., 2000) entworfen. Im Labor von Dr. Bruno Luckow, Arbeitsgruppe Klinische Biochemie entstanden die Sequenzen für die Primer der Ccr2- und Ccr5-Gene sowie für das Lysozym-Gen. Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Tabelle 2.2 gibt Auskunft über die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer.

**Tabelle 2.2 Sequenzen der für PCR verwendeten Oligonukleotidprimer**

amplifiziertes Allel	Name des Primers	Oligonukleotidsequenz
Ccr1-„Knockout“-Allel	forward primer: mCcr1KO for reverse primer: mCcr1KO rev	5'-GCTGTCTCTGATCTGGTCTTCCTT-3' 5'-TGGGTGGAGAGGCTTTTTGCTTCCTCTTGC-3'
Ccr1-Wildtyp-Allel	forward primer: mCcr1WT for reverse primer: mCcr1WT rev	5'-GAGTTCACTACCGTACCTGTAGC-3' 5'-TGACCTTCTTCTCACTGGGTCTTC-3'
Ccr2-„Knockout“-Allel	forward primer: Ccr2KO_neu for1 reverse primer: Ccr2KO_neu rev1	5'-AGAACGGCATCAAGGTGAAC-3' 5'-GGTCTTTGCTCAGGGCG-3'
Ccr2-Wildtyp-Allel	forward primer: Ccr2WT_neu for1 reverse primer: Ccr2WT_neu rev1	5'-ATGCCGTGACTGAACCATATC-3' 5'-TGCCCTCCTTTCTTAAATTCC-3'
Ccr5-„Knockout“-Allel	forward primer: Ccr5KO_alt for1 reverse primer: Ccr5KO_alt rev1	5'-TGGATTTTCAAGGGTCAGTTCC-3' 5'-TGTGCTGCAAGGCGATTAAG-3'
Ccr5-Wildtyp-Allel	forward primer: Ccr5WT_alt for1 reverse primer: Ccr5WT_alt rev1	5'-CGCTTCTTGCTGTCTATGGATG-3' 5'-CGGTGTGGTAGGATTTAGGTCTG-3'
Lysozym-Allel	forward primer: mLysozym for1 reverse primer: mLysozym rev1	5'-TGACTCTGGGACTCCTCCTG-3' 5'-CAGTGCTTTGGTCTCCACG-3'
p53-„Knockout“-Allel	forward primer: mp53KO for reverse primer: mp53KO rev	5'-GTGGGAGGGACAAAAGTTTCG-3' 5'-GCCGTTATTAGTGGAGAGGCC-3'
p53-Wildtyp-Allel	forward primer: mp53WT for reverse primer: mp53WT rev	5'-TGTTTCATTAGTCCCCACCTTG-3' 5'-AGAGCAAGAATAAGTCAGAAGCCG-3'

## 2.14 Geräte

FACSCalibur-Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter „Chronos Biosafe“	Messer Griesheim
GeneAmp-PCR-System 9700	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
Mikroskop „Diavert“	Leitz, Wetzlar
Mikroskop „Leica DMIL“	Leica, Solms
Spektralphotometer „DU® Serie 530“	Beckman, München
Universal 16-Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge „Centrifuge 5417 R“	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Megafuge 1.0 R“	Heraeus, Hanau

## 2.15 Sonstiges

Farb-Umkehrfilm, Fujichrome	Fuji Photo Film, Düsseldorf
Rundbodenröhrchen <i>Falcon</i> , Polystyrol, 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg

## **2.16 Verwendete Software**

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte unter Verwendung von FlowJo – Data Analysis Software for Flow Cytometry –, Version 6.1.1, Ashland, Oregon, USA.

Alle Abbildungen wurden unter Zuhilfenahme von Adobe Photoshop, Version 7.0, Adobe Systems, Inc., San Jose, Kalifornien, USA für den Druck aufbereitet.

## 3 Methoden

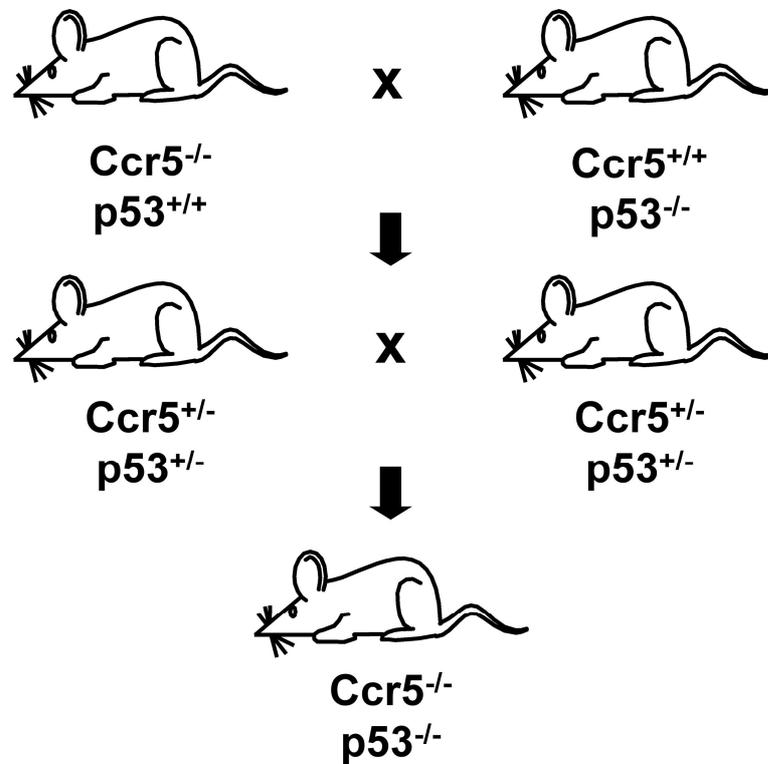
### Vorarbeiten

#### 3.1 Gewinnung von Peritoneal-Makrophagen aus CCR5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>- und p53<sup>-/-</sup>-Mäusen

Um die Ccr5-negative Makrophagen-Zelllinie aus CCR5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäusen generieren zu können, wurden die im Labor von Dr. Luckow hergestellten Ccr5<sup>-/-</sup>-C57BL/6- (Luckow et al., 2004) mit den kommerziell erworbenen p53<sup>-/-</sup>-C57BL/6-Mäusen (Donehower et al., 1992) gekreuzt. Die daraus entstandenen Ccr5<sup>+/-</sup>/p53<sup>+/-</sup>-heterozygoten Mäuse wurden miteinander verpaart, um Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäuse zu erhalten. Abbildung 3.1 zeigt dies schematisch. Zur Herstellung der Ccr5-positiven Makrophagen-Zelllinie wurden Ccr5-positiv p53<sup>-/-</sup>-Mäuse eingesetzt.

Um Primärzellen zu gewinnen, erhielten die Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>- und die p53<sup>-/-</sup>-C57BL/6-Mäuse eine intraperitoneale Injektion von 1,5 ml einer vierprozentigen, sterilen Thioglykolat-Lösung. Dadurch entwickelten sie eine aseptische Peritonitis. Drei Tage später wurden die Mäuse durch Injektion einer Überdosis Narkosemix narkotisiert und mit der Bauchseite nach oben an den vier Extremitäten auf einer Styroporplatte fixiert. Das Fell wurde mit Alkohol desinfiziert und, ohne die Bauchdecke zu verletzen, abpräpariert. Für die Peritoneallavage wurden 10 ml eiskalte, sterile PBS-Lösung in die Bauchhöhle injiziert. Anschließend wurde der Bauch massiert oder alternativ die fixierte Maus mit Hilfe eines Vortex-Mixers ein bis zwei Minuten lang geschüttelt. Die Lavageflüssigkeit mit den durch die Peritonitis eingewanderten Leukozyten – überwiegend Makrophagen – wurde mit Hilfe einer Spritze aus dem Bauchraum aufgezogen und der Rest der Flüssigkeit nach Eröffnung der Bauchdecke abpipettiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit 10 Minuten lang bei 400 g und 4 °C zentrifugiert; die Zellen wurden in PBS-Lösung gewaschen, dann abermals 10 Minuten lang bei 400 g zentrifugiert und daraufhin in RPMI-Medium mit einem Zusatz von 20 % hitzeinaktiviertem fötalem Rinderserum (FBS) und Penicillin/Streptomycin (100 units/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre von 5 % in Kultur genommen.

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Ccr5-negativen Zellen sind nach etwa dreiwöchiger Kultur in der fünften Passage, die verwendeten Ccr5-positiven Zellen nach etwa sechswöchiger Kultur in der ersten Passage kryokonserviert worden.



**Abbildung 3.1 Vereinfachtes Kreuzungsschema zur Generierung von  $CCR5^{-/-}/p53^{-/-}$ -Mäusen**

Zur Generierung von  $CCR5^{-/-}/p53^{-/-}$ -Mäusen durch Kreuzung müssen in einem ersten Schritt  $CCR5^{-/-}/p53^{+/+}$ - und  $CCR5^{+/+}/p53^{-/-}$ -Mäusen miteinander verpaart werden. Die daraus entstandenen zweifach-heterozygoten  $CCR5^{+/-}/p53^{+/-}$ -Mäusen werden dann untereinander gekreuzt. Aus dieser Verpaarung resultieren so die gewünschten homozygot-negativen  $CCR5^{-/-}/p53^{-/-}$ -Tiere.

## Eigene Arbeiten

### 3.2 Nomenklatur

Die Ccr5-negativen Zellen erhielten die Bezeichnung MPL5, die Ccr5-positiven Zellen wurden MPL0 genannt. Dabei steht „M“ für Makrophagen, „PL“ bildet die Abkürzung für Peritoneallavage. Die Ziffer „5“ in MPL5 bezeichnet die Ccr5-Defizienz, während „0“ in MPL0 auf den Ccr5-Wildtyp der Zellen hinweist.

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Zelllinien

Für die Generierung und Charakterisierung der Ccr5-defizienten MPL5-Makrophagen-Zelllinie und ihrer korrespondierenden Ccr5-positiven MPL0-Kontroll-Zelllinie wurden die aus Peritoneallavage gewonnen und in frühen Stadien kryokonservierten Zellen zunächst aufgetaut und in Kultur genommen. Des Weiteren erfolgte die Kultivierung von J774-Zellen, einer murinen Makrophagen-Zelllinie, und von NIH 3T3-Zellen, einer murinen Fibroblasten-Zelllinie. Sie wurden in vielen Experimenten zur positiven bzw. negativen Kontrolle verwendet.

#### 3.3.2 Kultivierung, Passagierung und Kryokonservierung

Als Standardmedium wurde zur Kultivierung der MPL0- und der MPL5-Makrophagen sowie der J774-Zellen RPMI-Medium (Moore et al., 1967) mit einem Zusatz von 10 % fötalem Rinderserum verwendet. Die Kultivierung der NIH 3T3-Fibroblasten erfolgte in DMEM-Medium ebenfalls mit einem Zusatz von 10 % fötalem Rinderserum. Das Medium wurde an jedem zweiten bis dritten Tag durch frisches ausgetauscht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und in einer CO<sub>2</sub>-Atmosphäre von 5 %.

Die eigenen MPL0- und MPL5-Makrophagen-Zelllinien wurden sowohl auf Zellkulturschalen als auch auf mikrobiologischen Schalen kultiviert. Die Kultivierung der J774-Zellen erfolgte vorwiegend auf mikrobiologischen, die Kultivierung der NIH 3T3-Zellen ausschließlich auf Zellkulturschalen. In der Regel wurden Schalen mit einem Durchmesser von 10 cm verwendet. Alle im Folgenden aufgeführten Volumenangaben beziehen sich auf Schalen dieser Größe.

Sobald sich ein dichter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen passagiert. Hierzu saugte man zunächst das Kulturmedium ab und wusch die Zellen mit 10 ml PBS-Lösung. Das Ablösen der Zellen erfolgte dann durch Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA. Alternativ wurden 2 ml einer

1,5 mM EDTA-Lösung eingesetzt. Durch Klopfen an die Kulturschale konnte man das Ablösen der Zellen beschleunigen. Durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium ließ sich die Behandlung der Zellen mit Trypsin-EDTA oder reiner EDTA-Lösung stoppen, und die Zellsuspension konnte in ein 15 ml-Röhrchen überführt werden.

Das Ablösen der Zellen von den Zellkulturschalen mit reinem EDTA erfolgte zum Teil mit Hilfe eines Zellschabers. Bei einer Passagierung der Zellen auf mikrobiologischen Schalen wurde sowohl das abgenommene Medium als auch die zum Waschen verwendete PBS-Lösung separat abzentrifugiert und die daraus gewonnenen Zellen dem Hauptansatz zugefügt, um Verluste so gering wie möglich zu halten. Anschließend wurden die Zellen bei 100 g fünf Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden dann entsprechend der Zellart und der Zelldichte in Verdünnungen von 1:3 bis 1:10 auf einer neuen Kulturschale ausgesät.

Um Zellen über einen längeren Zeitraum stabil aufzubewahren, werden sie in der Regel in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für diese sogenannte Kryokonservierung (Leibo und Mazur, 1971; Pegg, 2002) musste zunächst das Einfriermedium vorbereitet werden: 10 ml Kulturmedium wurden mit 0,7 ml Dimethylsulfoxid (Lovelock und Bishop, 1959) gemischt, so dass sich eine DMSO-Konzentration von 7 % ergab. Die bei der Passagierung noch restlich verbliebene Zellsuspension wurde abermals zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig in einem entsprechenden Volumen Einfriermedium resuspendiert, wobei eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml angestrebt wurde. Je ein Milliliter wurde anschließend in ein Einfrier Röhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte unter Verwendung eines mit Isopropanol gefüllten Qualifreeze-Cryo-Einfriergerätes, das über Nacht in einem  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -Gefrierschrank gelagert wurde. Dadurch erfolgte das Einfrieren der Zellen auf sehr schonende Weise, da hierbei eine Abkühlungsrate von nur  $1\text{ }^\circ\text{C}$  pro Minute erreicht wurde. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in einen Flüssigstickstoff-Lagerbehälter überführt und dort bei  $-135\text{ }^\circ\text{C}$  in einer Stickstoffatmosphäre über flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### **3.3.3 Variationen in den Kulturbedingungen**

Bei der Kultivierung der MPL0- und der MPL5-Zelllinien wurden zunächst verschiedene Variationen vorgenommen. Dazu wurden die Kulturbedingungen in einzelnen Komponenten verändert und mit Standardbedingungen verglichen. Unter Standardbedingungen wurde hierbei Kulturmedium bestehend aus RPMI-Medium, dem man 10 % hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum (FBS) zugesetzt hatte, verwendet.

**Variationen hinsichtlich des verwendeten Mediums:**

- *Zusatz von 5 % oder 20 % Serum zum RPMI-Medium*

Dem Kulturmedium wurden entweder 5 % oder 20 % fötales Rinderserum (FBS) zugesetzt, wohingegen das Standardmedium 10 % FBS enthielt.

- *Vergleich von nicht hitzeinaktiviertem mit hitzeinaktiviertem Serum*

Zur so genannten Hitzeinaktivierung wurde das Serum 30 Minuten lang im Wasserbad auf eine Temperatur von 56 °C erhitzt. Anschließend wurde das hitzeinaktivierte Serum dem RPMI-Medium in einer Endkonzentration von 10 % zugesetzt.

- *Zusatz von freiem Glutamin zum Medium*

Einer Flasche mit 500 ml RPMI-Medium wurden 5 ml einer 200 mM Glutamin-Lösung zugesetzt, so dass sich eine Glutamin-Konzentration von 2 mmol/l ergab.

- *Zusatz von Penicillin/Streptomycin zum Serum*

Da bei der Isolierung der Zellen durch Peritoneallavage eine Kontamination mit Bakterien nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden die Zellen zunächst in Penicillin/Streptomycin-haltigem Medium kultiviert. Dabei wurde Penicillin in einer Konzentration von 100 units/ml und Streptomycin in einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt. Später wurde auf Antibiotikafreies Medium umgestellt.

- *Zusatz von M-CSF in verschiedenen Konzentrationen zum Medium*

10 µg des in lyophilisierter Form vorliegenden murinen *Macrophage Colony Stimulating Factor* (M-CSF) wurden zunächst in 100 µl Wasser resuspendiert, und, um ein möglichst vollständiges Lösen des Proteins zu erreichen, über Nacht bei 4 °C gelagert. Dazu wurde das Wasser unter einer sterilen Werkbank aus einer Infusionsflasche *Aqua Braun* mit einer Spritze entnommen. Auch alle weiteren Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Am nächsten Tag wurden 10 Aliquots à 10 µl hergestellt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um dann das Protein stabil aufzubewahren, wurden die Aliquots bei -80°C gelagert.

Nach den Angaben des Herstellers werden in M-NFS-60-Zellen, einer murinen Makrophagen-Zelllinie, 50 % des maximalen Effekts bei einer M-CSF-Konzentration von 1,0 ng/ml erreicht. Daher wurde zunächst bei den MPL0- und MPL5-Zelllinien eine Konzentration von 2 ng/ml M-CSF vorgegeben, die später allerdings auf eine Konzentration von 30 ng/ml erhöht wurde, um die Zellen maximal zu stimulieren.

### Verwendung unterschiedlicher Kulturschalen:

- *Vergleich von Zellkulturschalen mit mikrobiologischen Kulturschalen*

Bei den verwendeten Zellkulturschalen handelte es sich um Petrischalen aus Polystyrol, deren Schalenboden bei der Herstellung derart behandelt wurde, dass sie sich besonders zur Kultivierung von adhärennten Zellen eignen. Im Gegensatz dazu handelte es sich bei den als „mikrobiologisch“ bezeichneten Schalen um unbehandelte Schalen aus reinem Polystyrol.

### Variationen bei Passagierung der Zellen:

- *Dauer der Trypsin-EDTA-Behandlung beim Ernten der Zellen*

Sowohl die MPL0- als auch die MPL5-Zellen wurden in sechs Wells einer 6-Well-Zellkulturschale ausgesät. Sobald die Zellen konfluent waren, erfolgte die unterschiedlich lang dauernde Behandlung mit Trypsin-EDTA. Diese Behandlung wurde von Well zu Well in 5-Minuten-Intervallen gestoppt; im ersten Well nach fünf Minuten, im sechsten Well nach 30 Minuten. Die Zellen wurden dann in getrennten Röhrchen abzentrifugiert, resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:5 auf getrennte Wells einer 6-Well-Platte ausgesät.

- *Vergleich zwischen der Verwendung von Trypsin-EDTA- und reiner EDTA-Lösung*

Statt der Trypsin-EDTA-Lösung wurde zum Ernten der Zellen häufig eine reine 1,5 mM EDTA-Lösung eingesetzt.

- *Aussäen der Zellen bei der Passagierung in unterschiedlichen Verdünnungen*

Die Zellen wurden nach der Passagierung in unterschiedlichen Verdünnungen ausgesät und ihre weitere Entwicklung lichtmikroskopisch beobachtet.

### 3.3.4 Serielle Verdünnung zur Überprüfung der Immortalisierung der Zelllinien

Zur Durchführung der seriellen Verdünnung pipettierte man zunächst in jedes einzelne Well einer 96-Well-Zellkulturschale 90 µl Medium. Nachdem die zu testenden Zellen geerntet und ausgezählt worden waren, wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von etwa 10 000 Zellen pro Milliliter hergestellt. In das erste Well gab man 10 µl dieser Zellsuspension zu, so dass sich dort nun eine geschätzte Zahl von etwa 100 Zellen befand. Hieran schloss sich nun der Schritt der seriellen Verdünnung an. Bei den Verdünnungsreihen wurden von Well zu Well 10 µl der Zellsuspension überführt und anschließend diejenigen Wells, in denen bei der lichtmikroskopischen Kontrolle nur eine einzige Zelle sichtbar war, markiert und in den nächsten Tagen beobachtet. Die seriellen Verdünnungen wurden später mit den durch Dynabeads angereicherten CD11b-positiven Zellen wiederholt.

### 3.3.5 Langzeitkultivierung

Die MPL0- und die MPL5-Zellen ließen sich über mehrere Monate hinweg sowohl auf Zellkulturschalen als auch auf mikrobiologischen Schalen kultivieren. Während dieser Zeit wurde die Expression Makrophagen-spezifischer Marker kontinuierlich mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft, um einen Hinweis auf den Differenzierungsgrad der Zellen zu erhalten.

### 3.3.6 Etablierung von Subzelllinien

Durch Kultivierung der Zelllinien unter verschiedensten Kulturbedingungen entstanden sowohl bei den Ccr5-positiven als auch den Ccr5-negativen Zelllinien so genannte Subzelllinien. Diese wurden im weiteren Verlauf unter Standardbedingungen (RPMI -Medium mit 10 % FBS) auf mikrobiologischen Schalen kultiviert. Alle Experimente zur Charakterisierung der Zelllinien wurden parallel an verschiedenen Subzelllinien durchgeführt.

## 3.4 Morphologie der Zellen

Die Morphologie der eigenen Makrophagen-Zelllinien wurde mit Hilfe eines auf einem Invertmikroskop installierten Fotoaufsatzes auf Diafilmen dokumentiert. Dabei konnten Fotografien der MPL0- und der MPL5-Zellen sowohl im subkonfluenten als auch im konfluenten Wachstumsstadium in unterschiedlichen Vergrößerungen (100 x, 200 x, 320 x) angefertigt werden. Des Weiteren wurden Zellen nach dem Versuch, CD11b-positive Zellen mit Hilfe von Dynabeads anzureichern, fotografiert. Alle Dias wurden mit einem Kleinbild-Diascanner bei einer Auflösung von 2000 dpi digitalisiert.

## 3.5 Mykoplasmentestung

Die MPL0- und die MPL5-Zelllinien, aber auch die J774- und die NIH 3T3-Zellen wurden auf eine mögliche Kontamination durch Mykoplasmen mit Hilfe des sogenannten *MycoAlert Mycoplasma Detection Assays* getestet.

Der MycoAlert-Test basiert auf einem biochemischen Aktivitätsnachweis von Mykoplasmen-spezifischen Enzymen. Die im Mediumüberstand befindlichen Mykoplasmen werden lysiert; die dadurch frei werdenden Enzyme reagieren mit dem Substrat des MycoAlert-Tests unter Freisetzung von ATP. Dieses kann mit Hilfe einer weiteren katalytischen Reaktion nachgewiesen werden, bei der durch die Umwandlung von Luciferin mittels des Enzyms Luciferase Licht emittiert wird. Die Intensität des emittierten Lichts ist linear zur ATP-

Konzentration – somit auch linear zur möglichen Anzahl kontaminierender Mykoplasmen – und lässt sich mit Hilfe eines Luminometers messen.

Es wurden Mediumüberstände von Zellen, die seit mindestens 24 Stunden in diesem Medium kultivierten worden waren, eingesetzt.

### 3.6 Analyse von Zelllinien mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Identifikation von Zellen anhand ihrer Zelloberflächenmoleküle. Dabei markiert man die Zellen zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, der an die für einen Zelltyp spezifischen Oberflächenmoleküle bindet: Bei der *direkten* Markierung werden *direkt* mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper verwendet. Bei der *indirekten* Markierung wird ein fluoreszenzmarkierter, sekundärer Antikörper eingesetzt, der gegen einen primären Antikörper gerichtet ist. Dieser primäre Antikörper ist spezifisch gegen das Oberflächenmolekül gerichtet. Mit Hilfe eines Lasers und eines Photomultipliers werden die Lichtstreuung, die einen Parameter für die Größe und die Granularität der Zellen darstellt, und die Emissionen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe gemessen. Diese Daten werden von einem Computer analysiert.

Die zu analysierenden Zellen wurden sowohl direkt als auch indirekt markiert. Für die Färbungen gegen die Oberflächenproteine CD45, CD11b, F4/80, CD3, CD19, CD4, CD8 $\alpha$  und CD11c wurden direkt mit einem Fluorochrom markierte Antikörper verwendet. CD14 und zum Teil auch CD11b sollten mittels indirekter Färbungen nachgewiesen werden. Als negative Kontrolle wurden bei jeder einzelnen Probe zunächst ungefärbte Zellen analysiert, später wurden Isotypkontrollen mit Ratten-IgG<sub>2b</sub> durchgeführt. Es erfolgten nur Einzelfärbungen gegen ein spezifisches Oberflächenmolekül und keine Mehrfachfärbungen. Bei allen durchflusszytometrischen Experimenten diente die Makrophagen-Zelllinie J774 zur positiven, die Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 zur negativen Kontrolle.

Um Zellen für durchflusszytometrische Experimente zu gewinnen, wurden sie zunächst – wie in Absatz 3.3.2 beschrieben – mit EDTA-Lösung geerntet. Die Auszählung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Für jede Probe wurden etwa 500 000 Zellen eingesetzt und in 100  $\mu$ l PBS-Lösung resuspendiert. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte in einem 5 ml-Rundbodenröhrchen. Die geeigneten Antikörper-Verdünnungen wurden den Empfehlungen der Hersteller entnommen. Tabelle 3.1 gibt Auskunft über die Konzentration der Stammlösungen, die Verdünnungen und die Endkonzentrationen der eingesetzten Antikörper.

**Tabelle 3.1** Angaben zu den Konzentrationen der Stammlösungen, den Verdünnungen und den Endkonzentrationen der verwendeten Antikörper

Antikörper	Konzentration der Stammlösung	Verdünnung	Endkonzentration
Ratte-anti-Maus-CD45-FITC-Antikörper	0.5 mg/ml	1:75	0.67 µg/100 µl
Ratte-anti-Maus-CD11b-FITC-Antikörper	0.5 mg/ml	1:100	0.5 µg/100 µl
Ratte-anti-Maus-F4/80-FITC-Antikörper	0.1 mg/ml	1:10	1 µg/100 µl
Ratte-anti-Maus-CD3-FITC-Antikörper	0.1 mg/ml	1:80	0.25 µg/100 µl
Ratte-anti-Maus-CD19-R-PE-Antikörper	0.2 mg/ml	1:50	0.4 µg/100 µl
Ratte-anti-Maus-CD4-APC-Antikörper	0.2 mg/ml	1:50	0.4 µg/100 µl
Ratte-anti-Maus-CD8α-Cy5-Antikörper	0.2 mg/ml	1:100	0.2 µg/100 µl
Hamster-anti-Maus-CD11c-FITC-Antikörper	0.1 mg/ml	1:100	0.1 µg/100 µl
Ratte-anti-Maus-CD11b-Antikörper	0.5 mg/ml	1:200	0.25 µg/100 µl
Ratte-anti-Maus-CD14-Antikörper	0.5 mg/ml	1:50	1 µg/100 µl
Kaninchen-anti-Ratte-Ig-FITC-Antikörper	keine Angaben	1:100	
Maus-anti-Ratte-IgG(H+L)-F(ab') <sub>2</sub> -Fragment	1.0 mg/ml	1:100	1 µg/100 µl
<b>Isotyp-Kontrollen</b>			
Ratte-IgG2b, kappa-FITC	0.5 mg/ml	1:100	0.5 µg/100 µl
Ratte-IgG2b, kappa	1.0 mg/ml	1:200	0.5 µg/100 µl
<b>Fc-Rezeptor-Block</b>			
Ratte-anti-Maus-CD16/CD32-Antikörper	0.5 mg/ml	1:50	1 µg/100 µl

Die Inkubation der Proben mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern erfolgte bei den direkten Färbungen 60 Minuten lang bei 4 °C im Dunkeln. Danach wurden die Zellen dreimal mit 4 °C-kalter PBS-Lösung gewaschen, wobei man das Röhrchen mit PBS auffüllte, die Probe gut durchmischte und die Zellen anschließend abzentrifugierte (483 g, 4 min, 4 °C). Die durchflusszytometrischen Analysen wurden noch am selben Tag durchgeführt und die Proben bis zu diesem Zeitpunkt bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Bei den indirekten Färbungen erfolgte die Inkubation mit dem primären Ratten-anti-Maus-Antikörper ebenfalls 60 Minuten lang bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit den sekundären anti-Ratten-Immunglobulin-Antikörpern 45 Minuten lang bei 4 °C. In ersten Experimenten wurde ein Kaninchen-anti-Ratten-Immunglobulin-Antikörper eingesetzt; später wurden F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente eines Maus-anti-Ratten-Immunglobulin-Antikörpers verwendet. Nach Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurden die Proben zweimal mit PBS gewaschen und bis zur Durchführung der Analysen bei 4 °C gelagert. Zur durchflusszytometrischen Analyse der Zelllinien stand ein FACSCalibur-Durchflusszytometer von Becton Dickinson zur Verfügung. Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme einer

speziellen Software für durchflusszytometrische Daten (FlowJo – Data Analysis Software for Flow Cytometry, Version 6.1.1, USA).

In späteren Experimenten wurde versucht, unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers an die Makrophagen zu verhindern. Zu diesem Zweck diente zum einen eine Vorinkubation mit einem Überschuss an Maus-Serum, andererseits der Einsatz eines kommerziell erhältlichen Fc-Rezeptor-Blocks. Bei Verwendung von Maus-Serum wurden die ungefärbten Zellen eine halbe Stunde lang mit einem Volumenanteil von 10 % Serum in 100 µl PBS präinkubiert. Bei Verwendung des Fc-Rezeptor-Blocks erfolgte eine fünf Minuten lange Vorinkubation der Zellen mit dem Ratten-anti-Maus-CD16/CD32-Antikörper. Ohne die Zellen danach zu waschen, wurden alle weiteren Schritte wie oben beschrieben durchgeführt.

### **3.7 Anreicherung CD11b-positiver Zellen**

Die Anreicherung CD11b-positiver Zellen wurde mit zwei verschiedenen Methoden getestet: zum einen wurden gegen CD11b gerichtete, an magnetische Microbeads gekoppelte Antikörper (MACS-CD11b-MicroBeads) verwendet, zum anderen erfolgte eine indirekte Anreicherung mit Hilfe von Ratten-anti-Maus-CD11b-Antikörpern und Dynabeads-M-450-Sheep-anti-Rat-IgG. Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen für beide Zelllinien parallel durchgeführt. Um mögliche Kreuzkontaminationen zwischen den Zelllinien zu vermeiden, wurde getrenntes Material verwendet.

#### **3.7.1 Anreicherung CD11b-positiver Zellen durch MACS-MicroBeads**

Das Prinzip einer Anreicherung CD11b-exprimierender Zellen durch Verwendung von MACS-CD11b-MicroBeads (Ehlich et al., 1994) beruht auf einer Markierung CD11b-positiver Zellen mit magnetischen Teilchen, an die ein gegen CD11b gerichteter Antikörper gekoppelt ist. Die so markierten Zellen werden auf eine Säule geladen, die in ein magnetisches Feld platziert wird. Die CD11b-positiven Zellen verbleiben in der Säule, während die CD11b-negativen Zellen die Säule passieren. Nach Entfernung des Magnetfeldes können die CD11b-positiven Zellen als positiv selektierte Fraktion von der Säule eluiert werden.

Zur Anreicherung CD11b-positiver Zellen wurden von beiden Zelllinien etwa  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Da jedoch die mit EDTA geernteten Zellen nach dem Ablösen stark zusammenklumpten und auch durch starkes Auf- und Abpipettieren nicht voneinander zu trennen waren, wurde zunächst mit Hilfe eines MACS-Pre-Separation-Filters versucht, eine Einzellzellsuspension herzustellen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Microbeads, wobei die Zellen in einem Volumen von 80 µl resuspendiert und mit 20 µl der CD11b-

Microbeads 15 Minuten lang im Kühlschrank inkubiert wurden. Nach drei Waschschrritten mit MACS-Puffer ließen sich zunächst die CD11b-negativen Zellen, dann die CD11b-positiven Zellen eluieren. Nähere Angaben zu einer derartigen Anreicherung mit Hilfe von CD11b-MicroBeads sind dem Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

Anschließend wurden die Zellen in RPMI-Medium resuspendiert und in einem Well einer 24-Well-Zellkultur-Platte in Kultur genommen. Dem Kulturmedium wurde Penicillin/Streptomycin zugesetzt, um eine mögliche Bakterienkontamination zu vermeiden. Anschließend wurden die Zellen expandiert und konnten nach etwa zwei Wochen auf je eine mikrobiologische und eine Zellkulturschale mit Durchmessern von jeweils 10 cm transferiert werden.

### **3.7.2 Anreicherung CD11b-positiver Zellen durch Dynal-Biotech-Dynabeads**

Die Anreicherung CD11b-positiver Zellen mit Hilfe von Dynabeads (Dybedal et al., 1995; Gomm et al., 1995) erfolgte nach der so genannten direkten Methode. Dabei werden zunächst die Dynabeads-M-450 Sheep-anti-Rat-IgG an monoklonale Ratte-Anti-Maus-CD11b-Antikörper gekoppelt und danach die Zellen mit diesen indirekt magnetisch markierten Antikörpern inkubiert. Ähnlich wie bei der Anreicherung mit MACS-MicroBeads plaziert man die magnetisch markierten Zellen zur Isolierung der positiven Fraktion in ein Magnetfeld.

Die Anreicherungen erfolgten entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Pro Zelllinie wurden 25 µl der Dynabead-Suspension – das entspricht einer Menge von  $1 \times 10^7$  Beads – eingesetzt, die Dynabeads nach dreimaligem Waschen in einem Volumen von 25 µl resuspendiert und mit 1,5 µg des Ratte-anti-Maus-Antikörpers unter ständigem Schütteln 30 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Danach folgten vier Waschschrritte in 25 µl PBS. Bei diesem Versuch wurden pro Zelllinie wiederum eine Million mit EDTA geerntete, in 500 µl PBS resuspendierte Zellen eingesetzt und nun mit den in 25 µl PBS resuspendierten, an anti-CD11b gekoppelten Beads 20 Minuten lang bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend ließen sich die CD11b-positiven von den CD11b-negativen Zellen durch Einbringen in das Magnetfeld trennen. Die CD11b-positiven Zellen wurden in 1 ml RPMI-Medium resuspendiert und in einem Well einer 24-Well-Zellkulturschale unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin in Kultur genommen.

### 3.8 Überprüfung des Genotyps der Zelllinien durch Polymerasekettenreaktion

Der Genotyp der MPL0- und der MPL5-Zellen für Ccr5 und p53 wurde mittels Polymerasekettenreaktion überprüft. Zu diesem Zweck wurden die MPL0- und die MPL5-Makrophagen geerntet und in 200 µl PBDN-Puffer resuspendiert. Um die Zellen zu lysieren, wurde zu den Proben jeweils 1 µl Proteinase-K-Lösung (20 mg/ml in Millipore-Wasser) gegeben und vier Stunden lang bei 56 °C geschüttelt. Anschließend konnten die Zellen bei 20 800 g abzentrifugiert werden. 150 µl des Überstands wurden in ein neues Röhrchen überführt und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt. Die Durchführung der PCR ist in Abschnitt 3.9.6 näher beschrieben.

### 3.9 Analyse der Genexpression ausgewählter Gene mit Hilfe von RT-PCR

Zur Analyse der Genexpression durch Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wird zunächst RNA aus kultivierten Zellen extrahiert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die dabei synthetisierte cDNA enthält eine Kopie der gesamten in den kultivierten Zellen vorkommenden RNA. Mit ihrer Hilfe kann so die Genexpression in Zellen bestimmen werden. Um herauszufinden, ob in der isolierten cDNA Sequenzen von bestimmten Genen enthalten sind, werden Polymerasekettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Dabei setzt man für diese Gene spezifische Oligonukleotidprimer ein und kann so eine bestimmte Nukleotidsequenz aus DNA selektiv und schnell in großen Mengen amplifizieren. Die vervielfältigten DNA-Sequenzen lassen sich gelelektrophoretisch auftrennen und durch einen an die DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff sichtbar machen (Alberts, 2001).

#### 3.9.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus den kultivierten Zellen erfolgte unter Verwendung eines *RNeasy Mini Kit* von Qiagen. Das Verfahren basiert auf dem Einsatz einer Silica-Gel-Membran, an die die RNA bindet. Stoffe, die die RNA verunreinigen würden, können mit Hilfe verschiedener Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt werden.

Zur Durchführung der Experimente wurde RNA aus den MPL0- und MPL5-Makrophagen sowie aus J774- und NIH 3T3-Zellen isoliert. Dabei wurden die Zellen, wie in Absatz 3.3.2 beschrieben, zunächst mit EDTA geerntet, anschließend einmal in 5 ml PBS gewaschen und nach vollständigem Absaugen des PBS in 600 µl RLT-Puffer lysiert und homogenisiert. Dem RLT-Puffer wurde vor der Verwendung  $\beta$ -Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 1 %

zugesetzt. Durch das im Puffer enthaltene Guanidinthiocyanat wurden die in den Proben enthaltenen RNasen sofort inaktiviert, so dass die Isolierung nicht degradiertes RNA sichergestellt war. Von den Zelllysaten wurden jeweils 350 µl aufgearbeitet. Die Isolierung der RNA erfolgte genau anhand der Vorschrift des Herstellers.

Nachdem die RNA an die Silica-Membran gebunden hatte und durch verschiedene Wasch- und Zentrifugationsschritte gereinigt worden war, konnte sie durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert werden.

### 3.9.2 Messung der RNA-Konzentration

Nach Isolierung der RNA wurde zunächst die Extinktion der Proben bestimmt, um dann die RNA-Konzentrationen ermitteln zu können. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine 1:100-Verdünnung der RNA-Proben hergestellt und anschließend in einem Photometer die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Mit Hilfe folgender Formel lässt sich die RNA-Konzentration berechnen:

$$[\text{RNA}] = \text{Extinktion} \times 40 \mu\text{g RNA/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Für eine Extinktion von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm beträgt die RNA-Konzentration 40 µg/ml. Durch Berücksichtigung des Volumens lässt sich daraus die RNA-Menge errechnen: So beträgt bei einer zuvor durchgeführten Verdünnung der Proben um 1:100 der Verdünnungsfaktor 100.

### 3.9.3 Gelelektrophorese

Um sicherzustellen, dass die isolierte RNA intakt und nicht degradiert war, wurde zur Qualitätskontrolle von jeder RNA-Präparation 1 µg gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zu diesem Zweck musste für jede Probe folgender Ansatz vorbereitet werden:

Formamid	10 µl
37 % Formaldehyd	4 µl
10 x MOPS	2 µl
Ethidiumbromid 1 mg/ml	1 µl

Anschließend wurde 1 µg RNA, gelöst in 3 µl DEPC-Wasser, zugegeben und der Ansatz bei 65 °C 15 Minuten lang geschüttelt. Nach dem Erhitzen wurden die Proben etwa eine Minute lang auf Eis gestellt und danach kurz zentrifugiert. Zur Herstellung des bei der Gelelektrophorese verwendeten 1 %-MOPS-Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml 1 x MOPS Puffer unter Erhitzen gelöst und ein Anteil von etwa 50 ml in eine Mini-Kammer (12 Spuren, Größe ca. 10 x 10 cm, Dicke des Gels ca. 5 mm) gegossen. Als Laufpuffer dienten

ca. 200 ml 1 x MOPS Puffer. Die RNA-Proben wurden auf das Gel aufgetragen und in eine freie Spur am Rand des Gels 2 µl Ladebuffer gegeben. Die Auftrennung der RNA erfolgte dann innerhalb einer Stunde bei 70 Volt. Anschließend konnten die RNA-Fragmente durch Einlagerung des Ethidiumbromids als Banden auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht werden. Zur Dokumentation wurde das Gel fotografiert. Um die RNA über einen längeren Zeitraum hinweg stabil aufzubewahren, wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

#### **3.9.4 DNase-Verdau der RNA**

Nach den ersten RT-PCR-Experimenten zeigte sich, dass die RNA durch genomische DNA verunreinigt war. Deshalb musste nachträglich ein DNase-Verdau der RNA-Proben durchgeführt werden. Dazu wurde die in 100 µl RNase-freiem Wasser gelöste RNA nochmals an die Silica-Membran der Qiagen-RNeasy-Mini-Säulen gebunden. Anschließend erfolgte der DNase-Verdau unter Zugabe des Enzyms DNase I und nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten die Elution der RNA. Nähere Angaben zur Vorgehensweise sind den Vorschriften des Herstellers zu entnehmen. Abermals wurde zur Ermittlung der RNA-Konzentration die optische Dichte gemessen und die Qualität der RNA gelelektrophoretisch überprüft.

#### **3.9.5 Reverse Transkription**

Die Durchführung der RNA-Präparationen erfolgte parallel in jeweils zwei Ansätzen, wobei zum ersten Ansatz, der so genannten RTplus-Probe, Superscript zugegeben wurde. Superscript enthält das für die reverse Transkription notwendige Enzym, die so genannte reverse Transkriptase. Beim zweiten Ansatz, der RTminus-Probe, wurde statt des Enzyms die entsprechende Menge DEPC-Wasser zugegeben. Da sich in der RTminus-Probe keine reverse Transkriptase befand und somit auch kein Umschreiben der mRNA in cDNA stattfand, sollten die im Anschluss durchgeführten Polymerasekettenreaktionen in den RTminus-Proben negativ ausfallen. Sollte wider Erwarten in den RTminus-Proben ein Signal auftreten, wäre dies als Hinweis auf eine Verunreinigung der RNA durch genomische DNA zu werten. Tabelle 3.2 gibt Auskunft über die beiden verschiedenen Ansätze, die Reagenzien und die eingesetzten Volumina. Die Proben wurden für die reverse Transkription der RNA in cDNA 60 Minuten lang bei 42 °C inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 3.2 Reverse Transkription: Ansätze für die RTplus- und die RTminus-Proben**

Reagenzien	Ansatz für die RTplus-Probe	Ansatz für die RTminus-Probe
5 x SS-Puffer	8.00 µl	8.00 µl
25 mM dNTP	0.80 µl	0.80 µl
0.1 M DTT	2.00 µl	2.00 µl
RNasin 40 u/µl	1.00 µl	1.00 µl
Lineares Acrylamid (15 µg/ml)	0.50 µl	0.50 µl
Hexanukleotide (2 µg/ml)	0.43 µl	0.43 µl
2 µg RNA	10.00 µl	10.00 µl
Superscript (200 units/µl)	0.87 µl	–
DEPC-Wasser	16.40 µl	17.27 µl
Gesamtvolumen	40.00 µl	40.00 µl

### 3.9.6 Polymerasekettenreaktionen (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine sehr empfindliche Methode zur Vermehrung von nur in geringen Mengen vorliegenden DNA-Sequenzen. Sie beruht auf der Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, die eine DNA-Matrize in wiederholten Amplifikationsrunden mehrfach kopiert. Dabei binden spezifische Oligonukleotidprimer an den Beginn und das Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und bilden so die Startpunkte für die Amplifikation.

Polymerasekettenreaktionen wurden sowohl zur Analyse der Genexpression der Zellen mittels RT-PCR als auch zur Überprüfung des Genotyps der Zellen für Ccr5 und p53 durchgeführt (siehe Abschnitt 3.8). Einzelheiten zu den vorbereiteten PCR-Ansätzen finden sich in Tabelle 3.3. Zum Teil wurde die Analyse der Chemokinrezeptoren ohne Zusatz der Primer für das „Knockout“-Allel durchgeführt und dabei das fehlende Volumen durch DEPC-Wasser ersetzt.

Um einen vorzeitigen Beginn der Enzymreaktion zu vermeiden, wurden die Ansätze bis zu Beginn der Polymerisation auf Eis gelagert und um das Reaktionsvolumen während der PCR-Reaktion konstant zu halten, mit Mineralöl überschichtet. Tabelle 3.4 fasst die PCR-Bedingungen zusammen. Bis zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden die Proben bei 4 °C aufbewahrt.

**Tabelle 3.3 Zusammensetzung der Ansätze zur Durchführung von Chemokinrezeptoren-, Lysozym- und p53-Polymerasekettenreaktionen**

Reagenzien	PCR für Ccr1, -2, -5	PCR für Lysozym	PCR für p53
10 x PCR-Puffer	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
1,25 mM dNTP	4.0 µl	4.0 µl	4.0 µl
forward primer Wildtyp-Gen	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl
reverse primer Wildtyp-Gen	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl
forward primer "Knockout"-Gen	1.0 µl	–	1.0 µl
reverse primer "Knockout"-Gen	1.0 µl	–	1.0 µl
cDNA oder DNA-Lysat	1.0 µl	1.0 µl	1.0 µl
1 unit AmpliTaq	0.2 µl	0.2 µl	0.2 µl
DEPC-Wasser	13.3 µl	15.3 µl	13.3 µl
Gesamtvolumen	25.0 µl	25.0 µl	25.0 µl

**Tabelle 3.4 Reaktionsbedingungen für die Durchführung der verschiedenen Polymerasekettenreaktionen**

<b>Ccr1 / Ccr5</b>						
Temperatur	94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	6 °C
Zeit	3 min	30 s	30 s	30 s	5 min	∞
Zykluszahl	1 x			30 x	1 x	1 x
<b>p53</b>						
Temperatur	94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	6 °C
Zeit	3 min	45 s	45 s	60 s	5 min	∞
Zykluszahl	1 x			30 x	1 x	1 x
<b>Ccr2</b>						
Temperatur	94 °C	94 °C	52 °C	72 °C	72 °C	6 °C
Zeit	3 min	45 s	45 s	60 s	5 min	∞
Zykluszahl	1 x			30 x	1 x	1 x
<b>Lysozym</b>						
Temperatur	94 °C	94 °C	52 °C	72 °C	72 °C	6 °C
Zeit	3 min	30 s	30 s	30 s	5 min	∞
Zykluszahl	1 x			25 x	1 x	1 x

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2-prozentiges TBE-Agarosegel verwendet. Zur Herstellung löst man unter Erhitzen 4 g Agarose in 200 ml 0,5 x TBE-Puffer und gibt vor dem Gießen des Gels 4 µl Ethidiumbromid (Konzentration 1 mg/ml) zu. Etwa 50 ml des Gels wurden dann pro Mini-Kammer (12 Spuren) verwendet; als Laufpuffer dienten ca. 200 ml 0,5 x TBE-Puffer mit einem Zusatz von 4 µl Ethidiumbromid.

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden je 10 µl des PCR-Produkts mit 2 µl Ladepuffer gemischt. Um die Größe der PCR-Fragmente abschätzen zu können, musste als Längenstandard in einer Spur eine 1-kb-Leiter aufgetragen werden. Zuvor wurden dazu 3 µl einer 100 ng/ml 1-kb-Leiter mit 7 µl VE-Wasser und 2 µl Ladepuffer gemischt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem Zeitraum von ungefähr 45 Minuten bei einer angelegten Spannung von 200 Volt.

Anschließend konnten die DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 254 nm durch Einlagerung des Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde dann mit Hilfe eines digitalen Video-Dokumentationssystems fotografiert.

### 3.10 Phagozytoseassay

Für die Phagozytoseassays wurden DH5α-Bakterien, ein im Labor häufig verwendeter *E.coli*-K12-Stamm, verwendet. Neben den MPL0- und den MPL5-Zelllinien wurden J774- zur Positiv- und NIH 3T3-Zellen zur Negativkontrolle eingesetzt.

*Tag 1:* Zunächst wurde eine bestimmte Anzahl der zu testenden Zellen auf je ein Well einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät; die Auszählung der Zellen erfolgte dabei in einer Neubauer-Zählkammer. Im Laufe verschiedener Vorversuche hatte sich herausgestellt, dass die Phagozytoseassays mit  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well optimal durchzuführen sind. Pro Zelllinie wurden parallel jeweils drei Wells mit gleicher Zellzahl bearbeitet. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, so dass die Zellen am darauf folgenden Tag fest am Schalenboden adhärten. Da bekannt war, dass die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich schnell proliferierten, musste die genaue Zellzahl nochmals am Tag des Phagozytoseassays bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden auf eine zusätzliche 6-Well-Platte dieselbe Anzahl Zellen der unterschiedlichen Zelllinien ausgesät und ebenfalls über Nacht inkubiert. Diese Zellen konnten am darauffolgenden Tag mit Trypsin-EDTA geerntet und ausgezählt werden. Falls sie sich über Nacht tatsächlich unterschiedlich stark vermehrt hätten, müsste man dies später bei der Auswertung berücksichtigen. Zusätzlich wurde eine 2 ml LB-Kultur mit den DH5α-Bakterien beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.

*Tag 2:* Bei der Herstellung einer geeigneten Bakterienverdünnung konnte davon ausgegangen werden, dass sich die über Nacht bebrütete Bakterienkultur in stationärer Phase befand und somit eine Konzentration von ca.  $2 \times 10^9$  Bakterien/ml vorlag. Die Bakteriensuspension wurde mit frischem LB-Medium so verdünnt, dass ein geeignetes Verhältnis zwischen der Anzahl eingesetzter Bakterien und der Anzahl eingesetzter Zellen erreicht wurde. Die Bakterienkultur, die sich nach Inkubation über Nacht in stationärer Phase befand, wurde daher zunächst im

Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt, so dass sich eine geschätzte Konzentration von  $2 \times 10^8$  Bakterien/ml ergab.

Im Folgenden soll der Versuch exemplarisch für ein Verhältnis Bakterien zu Zellen von 50:1 erläutert werden: Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zu jedem Well einer 6-Well-Platte wurden dann 3 ml RPMI-Medium mit der entsprechenden Anzahl an Bakterien zugegeben. Daraus ergibt sich, dass zu  $1 \times 10^5$  Zellen pro Well 25  $\mu$ l der mit 1:10 verdünnten Bakteriensuspension hinzugefügt wurden; dies entspricht fünf Millionen Bakterien pro Well. Um die Interaktion der Bakterien mit den Zellen zu erhöhen, wurden die Platten bei 272 g und 37 °C fünf Minuten lang zentrifugiert. Da zudem aus Vorversuchen bekannt war, dass die Zellen sehr schnell austrocknen, wurden sie mit 3 ml Bakteriensuspension pro Well eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert; auf diese Weise waren sie sicher vor Austrocknung geschützt. Während dieser Zeit sollte die Phagozytose der Bakterien durch die Makrophagen stattfinden. Nach vollständigem Absaugen des Mediums wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um einen Großteil der im Medium verbliebenen Bakterien zu entfernen und anschließend mit Gentamicin-haltigem Medium 30 Minuten lang inkubiert. Ziel der Behandlung mit dem Antibiotikum war die Abtötung aller extrazellulär verbliebenen Bakterien. Die dazu erforderliche Gentamicinkonzentration betrug 20  $\mu$ g/ml. Das extrazellulär wirksame Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin ist für diesen Zweck besonders gut geeignet, da es nur schlecht membrangängig ist; die phagozytierten intrazellulär befindlichen Bakterien sollten daher überleben (Drevets et al., 1994).

Das Medium wurde abgenommen und die Wirksamkeit der Gentamicin-Behandlung wie folgt überprüft: Pro Well wurden 100  $\mu$ l des abgenommenen Mediums unverdünnt auf einer Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Falls auf diesen Platten entgegen der Erwartung viele Bakterienkolonien gewachsen wären, hätte das Ergebnis später korrigiert und das eingesetzte Gentamicin auf seine Wirksamkeit hin überprüft werden müssen.

Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml 0,1-prozentiger Desoxycholatlösung pro Well lysiert und so die phagozytierten Bakterien freigesetzt. Von den Lysaten wurden nun geeignete Verdünnungsstufen auf LB-Agarplatten ausplattiert. Vorversuche hatten gezeigt, dass bei den hier eingesetzten Mengen an Zellen und Bakterien, die Lysate am besten in einer Verdünnung von 1:100 und 1:1000 auszuplattieren sind. Zu deren Herstellung wurden jeweils 100  $\mu$ l der Lysate im Verhältnis 1:10 bzw. 1:100 mit PBS verdünnt und von diesen Verdünnungen 100  $\mu$ l auf eine Agarplatte ausplattiert.

Für jede Zelllinie wurden die Phagozytoseassays an jeweils drei Wells parallel mit gleicher Zellzahl durchgeführt und demzufolge pro Zelllinie folgende Platten ausplattiert:

- drei Platten mit Zellysaten in Verdünnungen von 1:100 ( $10^{-2}$ ),
- drei Platten mit Zellysaten in Verdünnungen von 1: 1000 ( $10^{-3}$ ),
- drei Platten mit Gentamicin-haltigen Mediumüberständen in Verdünnungen von 1:10,
- mehrere Platten mit unterschiedlichen Verdünnungen der eingesetzten Bakteriensuspension, um später das exakte Verhältnis von Bakterien zu Zellen ermitteln zu können.

Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

*Tag 3:* Nachdem die Bakterienkolonien ausgezählt worden waren, ließen sich anhand dessen das Verhältnis von eingesetzten Bakterien zu Zellen und die Anzahl der von  $1 \times 10^5$  Makrophagen phagozytierten Bakterien berechnen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Kultivierung

Bei der Kultivierung der MPL0- und MPL5-Makrophagen-Zelllinien machte sich schon von Beginn an ein deutlich besseres und schnelleres Wachstum der MPL5-Zellen bemerkbar. Nach dem Auftauen dauerte es mehrere Wochen, bis die MPL5-Makrophagen zu proliferieren begannen; die MPL0-Makrophagen hingegen entwickelten sich deutlich langsamer. Diese Tendenz blieb auch im weiteren Verlauf der Kultivierung bestehen. Der Differenzierungsgrad der Zellen wurde während der Kultivierung in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrisch analysiert und dabei in der Regel die Expression des u.a. für Makrophagen spezifischen Markers CD11b überprüft. Auf Details wird in einem späteren Kapitel eingegangen.

#### 4.1.2 Variationen in den Kulturbedingungen

Da es sich bei den  $Ccr5^{-}/p53^{-}$ - und  $p53^{-}$ -Zelllinien um neu generierte Zelllinien handelte, mussten hierfür zunächst die optimalen Kulturbedingungen bestimmt werden. Um eine möglichst gute Entwicklung der Zellen zu gewährleisten, wurden deshalb einzelne Parameter verändert und mit den Standardbedingungen (RPMI-Medium mit einem Zusatz von 10 % FBS) verglichen. Im Folgenden soll näher erläutert werden, inwieweit sich Variationen in den Kulturbedingungen auf das Verhalten der Zellen auswirkten.

- *Zusatz von 5 % oder 20 % Serum zum RPMI-Medium*

Bei der Kultivierung von Zellen wird den Kulturmedien meist fötales Rinder- oder Kälberserum zugesetzt. Es enthält eine Vielzahl von Proteinen, Polypeptiden, Hormonen und Mineralstoffen, die für die Versorgung und damit für das Wachstum der Zellen von entscheidender Bedeutung sind. Zunächst sollte überprüft werden, bei welcher Serumkonzentration der Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung der Zellen am größten ist. Bei Kultivierung der beiden Zelllinien sowohl auf mikrobiologischen Schalen als auch auf Zellkulturschalen zeigte sich bei einem Zusatz von 10 % und 20 % FBS zum RPMI-Medium gleich gutes Wachstum. Bei einem Zusatz von nur 5 % FBS war die Proliferationsgeschwindigkeit hingegen leicht reduziert. In durchflusszytometrischen Experimenten konnte dann gezeigt werden, dass die Verwendung

unterschiedlicher Serumkonzentrationen keinen Effekt auf den Differenzierungsgrad der Zellen hatte.

- *Vergleich von nicht hitzeinaktiviertem mit hitzeinaktiviertem Serum*

Bei der so genannten Hitzeinaktivierung wird das Serum 30 Minuten lang auf eine Temperatur von 56 °C erwärmt und dann dem Medium zugesetzt. Dies hat eine Reduktion der Aktivität von Komplementfaktoren und eine Zerstörung von Viren und Mikroorganismen zur Folge (Ward, 1979). Da gezeigt werden konnte, dass die Hitzeinaktivierung des Serums Auswirkungen auf die Proliferationsgeschwindigkeit und den Differenzierungsgrad von Zellen haben kann (Bruinink et al., 2004), sollte das Verhalten der MPL0- und der MPL5-Zelllinien in Abhängigkeit von der Hitzeinaktivierung des Serums getestet werden. Der Vergleich einer Verwendung von hitzeinaktiviertem und von nicht hitzeinaktiviertem FBS ergab jedoch keinen Unterschied im Wachstumsverhalten der Zellen.

- *Zusatz von freiem Glutamin zum Medium*

Die Konzentration an verfügbaren Aminosäuren im Medium ist meist der für das Wachstum und das Überleben von Zellen in einer Zellkultur limitierende Faktor. Glutamin ist eine dieser Aminosäuren und wird von den meisten kultivierten Zellen als Energiequelle benötigt (Reitzer et al., 1979). Da diese Verbindung recht labil ist, wurde sie durch den Hersteller dem verwendeten Medium bereits in stabiler Form als so genanntes Glutamax zugesetzt. Dabei handelt es sich um ein Dipeptid, das Glutamin enthält. Nicht alle Zellen können Glutamin in dieser Form verwerten, so dass überprüft werden musste, ob sich die Zellen bei Zugabe von freiem Glutamin besser entwickeln. Eine derartige Zugabe hatte jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen.

- *Zusatz von Penicillin/Streptomycin zum Serum*

Der Zusatz von Antibiotika zum Kulturmedium über einen längeren Zeitraum hinweg sollte vermieden werden, da Bakterien durch bakteriostatisch wirksame Antibiotika wie beispielsweise Penicillin nicht abgetötet, sondern nur in ihrem Wachstum gehemmt werden. Daher verbleiben sie längerfristig unentdeckt in der Zellkultur. Werden hingegen keine Antibiotika zugesetzt, wird eine Kontamination meist sofort bemerkt.

Nachdem die Zellen durch Peritoneallavage isoliert worden waren, konnte eine Kontamination mit Bakterien nicht sicher ausgeschlossen werden, so dass sie zunächst in Penicillin/Streptomycin-haltigem Medium kultiviert wurden. Nach einigen Tagen wurde auf Antibiotika-freies Medium umgestellt. Damit sollte zum einen überprüft werden, ob die Kulturen mit Bakterien kontaminiert waren, und zum anderen, ob sich die Zellen bei fehlendem

Antibiotika-Zusatz anders verhalten. Nach Absetzen der Antibiotika zeigte sich keine Kontamination mit Bakterien; auch beim Wachstum ergaben sich keine Unterschiede.

- *Vergleich von Zellkulturschalen mit mikrobiologischen Kulturschalen*

Nach dem Auftauen der Makrophagen-Zelllinien wurden die Zellen zunächst auf Zellkulturschalen kultiviert. Beide Zelllinien zeichneten sich hier durch ein stark adhärentes Wachstum aus. Während die MPL5-Zelllinien von Beginn an sehr stark proliferierten, entwickelten sich die MPL0-Zellen deutlich langsamer.

Auf mikrobiologischen Schalen wuchsen die Zellen beider Zelllinien zum Teil adhärent, zum Teil in Suspension. Im Gegensatz zur Kultivierung auf Zellkulturschalen entwickelten sie sich aber auf mikrobiologischen Schalen insgesamt deutlich langsamer. Zum Teil dauerte es drei bis vier Monate bis sie zum ersten Mal passagiert werden konnten. Im Laufe ihrer Kultivierung kam es dann zu einer allmählich schnelleren Entwicklung, und die Passagezeiten verkürzten sich zunächst auf etwa drei bis vier, dann auf etwa ein bis zwei Wochen. Auch hier zeigte sich wieder, dass die MPL5-Zellen deutlich stärker als die MPL0-Zellen proliferierten.

Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben, dass sich die Expression von Leukozyten-spezifischen Markern bei den auf Zellkulturschalen kultivierten Zellen sehr bald verminderte. Bereits nach einer Kultivierungszeit von etwa einer Woche reduzierte sie sich um bis zu 50 %; dabei nahm sie bei den MPL0- schneller als bei den MPL5-Zellen ab. Wurden die Zellen allerdings von Zellkulturschalen auf mikrobiologische Schalen überführt, nahm der Anteil an CD11b-exprimierenden Zellen wieder zu. Durch Kultivierung der Zellen auf mikrobiologischen Schalen konnte dann die CD11b-Expression im Laufe mehrerer Monate auf über 80 % gesteigert werden. Daher wurde im weiteren Verlauf auf die Verwendung von Zellkulturschalen vollständig verzichtet. In Absatz 4.6 sind diese Ergebnisse anhand von Histogrammen nochmals ausführlich dargestellt.

- *Zusatz von M-CSF in verschiedenen Konzentrationen zum Medium*

Murines M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) ist ein 36,4 kDa großes Protein, das von einer Vielzahl von Zellen wie beispielsweise von Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und anderen gebildet wird. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Proliferation und der Differenzierung von Monozyten, Gewebemakrophagen und deren Vorläuferzellen (Sunderkotter et al., 2004).

Durch den Zusatz von M-CSF zum Kulturmedium sollte zum einen versucht werden, die Proliferation der differenzierten Makrophagen auf mikrobiologischen Schalen zu verbessern; zum anderen sollte ein differenzierter Status der Makrophagen auf Zellkulturschalen erzielt werden. Da sich bei einem Zusatz von 2 ng/ml M-CSF zum Medium keine Unterschiede im

Wachstum und Differenzierungsgrad der Zelllinien zeigten, wurde der M-CSF-Anteil auf eine Konzentration von 30 ng/ml deutlich gesteigert. Eine Verbesserung der Wachstumsgeschwindigkeit bei Verwendung mikrobiologischer Schalen, auf denen – wie oben erläutert – die Zellen ihren differenzierten Phänotyp deutlich besser aufrecht erhalten können, wäre zwar erstrebenswert gewesen. Dieses Ziel konnte durch den Zusatz von M-CSF zum Kulturmedium jedoch nicht erreicht werden.

Hinsichtlich der Differenzierung der MPL5-Zellen zeigte sich, dass der Anteil an CD11b-exprimierenden Zellen bei einer Konzentration von 30 ng/ml M-CSF im Medium und einer Kultivierung auf Zellkulturschalen um etwa 10 % höher lag als bei Zellen, die ohne den Zusatz von M-CSF kultiviert worden waren. Dieser Effekt war bei den MPL0-Zellen nicht nachzuweisen. Bei einer Kultivierung der Zellen auf mikrobiologischen Schalen konnte der Anteil an CD11b-positiven Zellen durch den Zusatz von M-CSF nicht gesteigert werden.

- *Dauer der Trypsin-EDTA-Behandlung beim Ernten der Zellen*

Die gegenseitige Adhäsion von Zellen oder gegenüber dem Substrat wird durch eine Vielzahl an interagierenden Glykopeptiden vermittelt. Einige von ihnen sind Calcium-abhängig und daher durch Chelatbildner wie EDTA zu beeinflussen. Trypsin ist eine Protease, die verschiedene, bei der Zelladhäsion wirksame Glykoproteine spaltet. Um bei der Passagierung der Zellen die Zell-Adhäsion zu vermindern, wurden sie zunächst mit Trypsin-EDTA behandelt.

In den ersten Wochen nach dem Auftauen ließen sich die Zellen nur sehr schwer vom Boden der Zellkulturschalen ablösen und mussten daher über eine längere Zeit hinweg mit Trypsin-EDTA behandelt werden. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob eine derartige Trypsinbehandlung den Zellen schaden würde. Nachdem jedoch die Zellen unterschiedlich lang – zwischen fünf und 30 Minuten – mit Trypsin-EDTA behandelt und danach getrennt auf sechs Wells einer 6-Well-Platte ausgesät worden waren, zeigten sich im Verlauf der weiteren Kultivierung keine Unterschiede im Wachstumsverhalten. Es darf deshalb davon ausgegangen werden, dass die Zellen auch bei längeren Behandlungszeiten nicht geschädigt werden. Je länger sie auf Zellkulturschalen kultiviert und je häufiger sie passagiert wurden, desto leichter ließen sie sich mit Hilfe von Trypsin-EDTA vom Schalenboden ablösen.

- *Vergleich zwischen der Verwendung von Trypsin-EDTA- und reiner EDTA-Lösung*

Bei der Kultivierung auf Zellkulturschalen wurde zur Passagierung in der Regel Trypsin-EDTA-Lösung verwendet. Sollten jedoch durchflusszytometrische Analysen durchgeführt werden, musste man die Zellen mit reiner EDTA-Lösung ernten, da das Enzym Trypsin die für diese Versuche wichtigen Oberflächenproteine spaltet. Dabei erwies sich das Ablösen der Zellen mit Hilfe einer reinen EDTA-Lösung als extrem schwierig, so dass oftmals ein

Zellschaber verwendet werden musste. Bei Kultivierung der Zellen auf mikrobiologischen Schalen adhärten die Zellen nur sehr locker am Schalenboden oder wuchsen sogar in Suspension, so dass das Ablösen mit Hilfe einer reinen EDTA-Lösung ebenso gut möglich war wie mit Hilfe von Trypsin-EDTA. Um die Zellen auf eine möglichst schonende Art zu passagieren, konnte man später, als die Zellen fast ausschließlich auf mikrobiologischen Schalen kultiviert wurden, auf eine Behandlung mit Trypsin-EDTA vollständig verzichten.

- *Aussäen der Zellen bei der Passagierung in unterschiedlichen Verdünnungen*

In Versuchen zur Kultivierung auf Zellkulturschalen zeigte sich, dass Verdünnungen von bis zu 1:50 oder sogar 1:100 bei der Passagierung der Zellen möglich waren. Trotz dieser sehr starken Verdünnungen entwickelten sich die Zellen gut. In der Regel wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:10 auf eine neue Zellkulturschale ausgesät. Da bei Kultivierung auf mikrobiologischen Schalen – wie bereits erwähnt – eine nur langsame Proliferation eintrat, wurde auf eine zu starke Verdünnung beim Passagieren verzichtet. Hier wurden die Zellen zunächst in Verdünnungen von 1:3, später in Verdünnungen von 1:5 oder 1:10 ausgesät.

### 4.1.3 Serielle Verdünnung

Das Charakteristikum einer Zelllinie besteht in der Fähigkeit der zugehörigen Zellen, sich – im Gegensatz zu primären Zellen – unbegrenzt in Kultur zu vermehren. Um zu prüfen, ob die MPL0- und die MPL5-Zellen durch Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53 tatsächlich immortalisiert wurden und es sich somit um Zelllinien handelt, wurde die Immortalisierung der Zellen durch serielle Verdünnung getestet. Dabei sollte versucht werden, aus einer einzigen Zelle der Zelllinie einen Zellklon zu züchten. Zu diesem Zweck wurden sowohl die MPL0- als auch die MPL5-Zellen zunächst seriell verdünnt; innerhalb von etwa vier Wochen gelang es dann aus jeweils einer Zelle einen Zellklon zu züchten. Diese Zellklone entwickelten sich sehr gut und proliferierten stark. Die anschließende durchflusszytometrische Untersuchung ergab allerdings, dass keine Expression von Leukozyten-spezifischen Markern an der Zelloberfläche nachzuweisen war. Jedoch konnte mit diesem Versuch belegt werden, dass die Zellen durch das Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53 erfolgreich immortalisiert worden waren.

### 4.1.4 Langzeitkultivierung

Da primäre Zellen im Gegensatz zu Zelllinien nur über einen beschränkten Zeitraum zu kultivieren sind, gibt die Langzeitkultivierung ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen einer immortalisierten Zelllinie. Bei den hier beschriebenen Untersuchungen war eine Kultivierung der Zellen sowohl auf mikrobiologischen Schalen als auch auf Zellkulturschalen über Monate hinweg problemlos möglich. Bei der Kultivierung der MPL5-Zellen auf Zellkulturschalen ließ

sich innerhalb von drei Monaten etwa die 35. Passage, bei der Kultivierung der MPL0-Zellen die 25. Passage erreichen. Aufgrund der Dedifferenzierung der Zellen wurde dann die Kultivierung auf Zellkulturschalen allerdings eingestellt und von diesem Zeitpunkt ab ausschließlich mit mikrobiologischen Schalen gearbeitet. Hier ergaben sich bei einer Kultivierung der MPL5-Zellen über 15 Monate hinweg 35 Passagierungen, bei der Kultivierung der MPL0-Zellen 25 Passagierungen. Die lange Kultivierungsdauer sowie die Anzahl der erreichten Passagen erlauben die Schlussfolgerung, dass es sich tatsächlich um immortalisierte Zelllinien handelt.

#### **4.1.5 Etablierung von Subzelllinien**

Durch Kultivierung der Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen entstanden unterschiedliche Subpopulationen, die dann im weiteren Verlauf über mehrere Monate hinweg unter Standardbedingungen (RPMI-Medium mit einem Zusatz von 10 % FBS, mikrobiologische Schalen) kultiviert wurden. Der Differenzierungsgrad der Zellen konnte in regelmäßigen Abständen mittels Durchflusszytometrie überprüft werden. Alle weiteren Experimente zur näheren Charakterisierung der Zelllinien wurden parallel an verschiedenen Subzelllinien durchgeführt. Dabei wurden aber nur solche verwendet, die in hohem Maß CD11b an ihrer Oberfläche exprimierten. Subzelllinien mit nur schwacher oder fehlender CD11b-Expression blieben bei weiteren Experimenten unberücksichtigt.

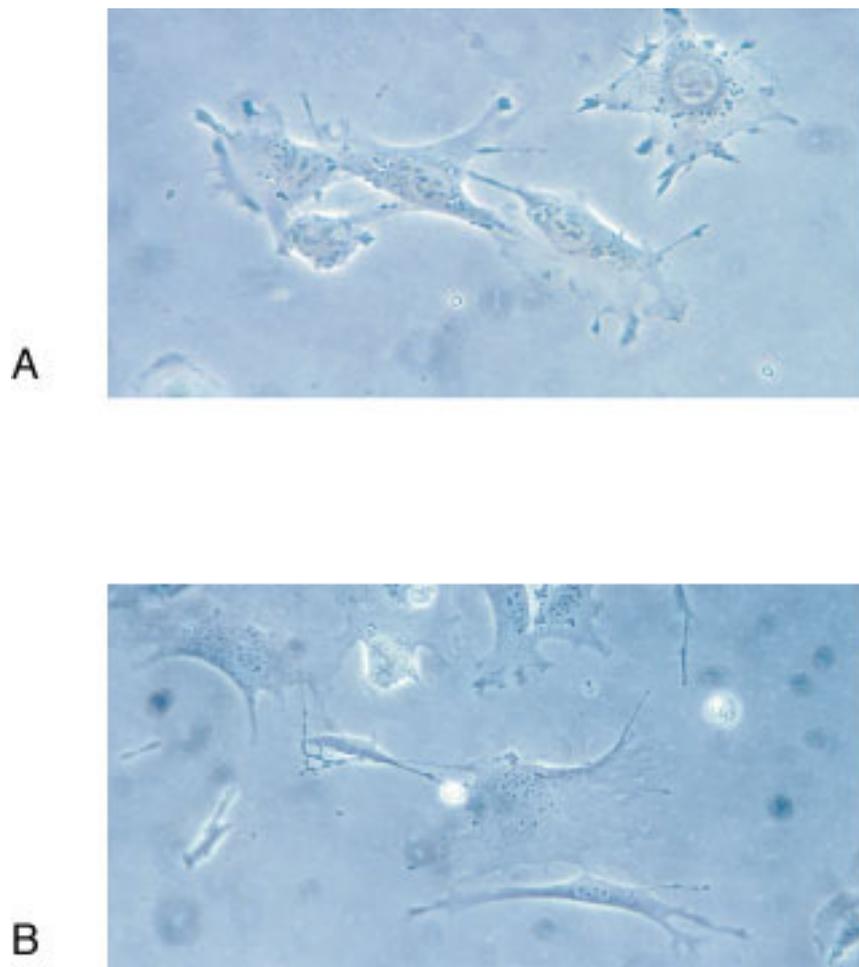
Die CD11b-positiven Subzelllinien verhielten sich hinsichtlich der Morphologie und des Wachstums sehr ähnlich. Auch bei den durchgeführten Versuchen wie beispielsweise den Phagozytoseassays ergaben sich kaum Unterschiede. In einzelnen Abschnitten wird darauf noch gesondert eingegangen.

## **4.2 Morphologie der Zellen**

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellen dienten zum einen der Kontrolle der Zelldichte, zum anderen der morphologischen Charakterisierung. Zu Dokumentationszwecken wurden die Zellen in unterschiedlichen Wachstumsstadien und bei verschiedenen Vergrößerungen fotografiert.

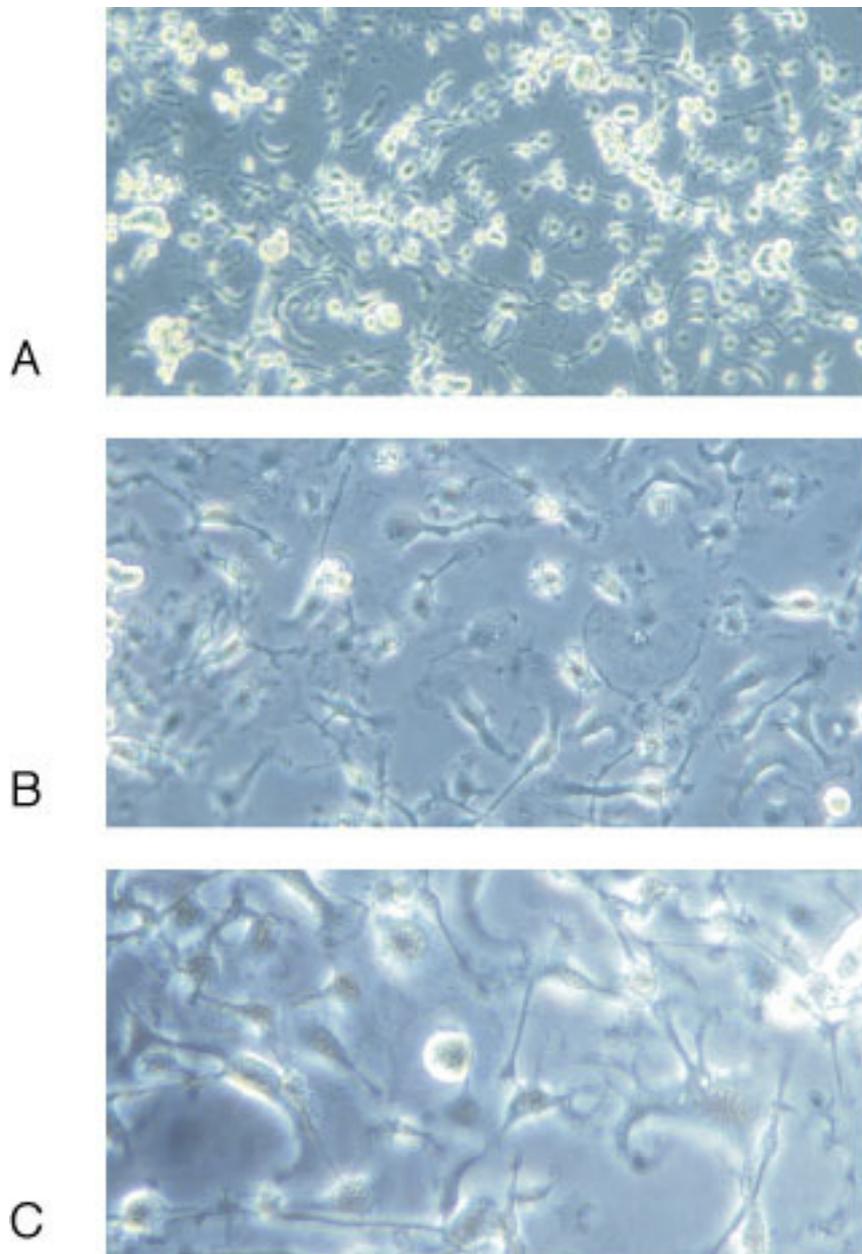
Auf Zellkulturschalen wuchsen die Zellen stark adhärent, wobei sie sich auf dem Schalenboden sehr flach ausbreiteten. Sie zeichneten sich durch eine polygonale Form sowie dünne Zellausläufer aus und besaßen einen großen, prominenten Kern (Abbildung 4.1). Im konfluenten Stadium bildeten sie einen dichten, „pflastersteinartigen“ Zellrasen. Wurden die Zellen auf mikrobiologischen Schalen kultiviert, wuchsen sie zum Teil nur schwach adhärent,

zum Teil in Suspension. Die in Suspension wachsenden Zellen bildeten nach einigen Tagen dicke Zellklumpen, die adhärent wachsenden hafteten nur sehr locker am Schalenboden und lösten sich leicht vom Untergrund ab. Insgesamt zeichneten sich die Zellen auf mikrobiologischen Schalen durch eine eher runde Form aus und besaßen prominente und sehr lange Zellausläufer; zum Teil wuchsen sie in mehreren Schichten übereinander. Auffällig war, dass sich die Zellen am Schalenrand besonders gut entwickelten, während in der Schalenmitte kaum Zellwachstum zu beobachten war. Bei der Kultivierung sowohl auf Zellkulturschalen als auch auf mikrobiologischen Schalen zeigten die MPL0- und die MPL5-Zellen keine Unterschiede in der Morphologie (Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3).



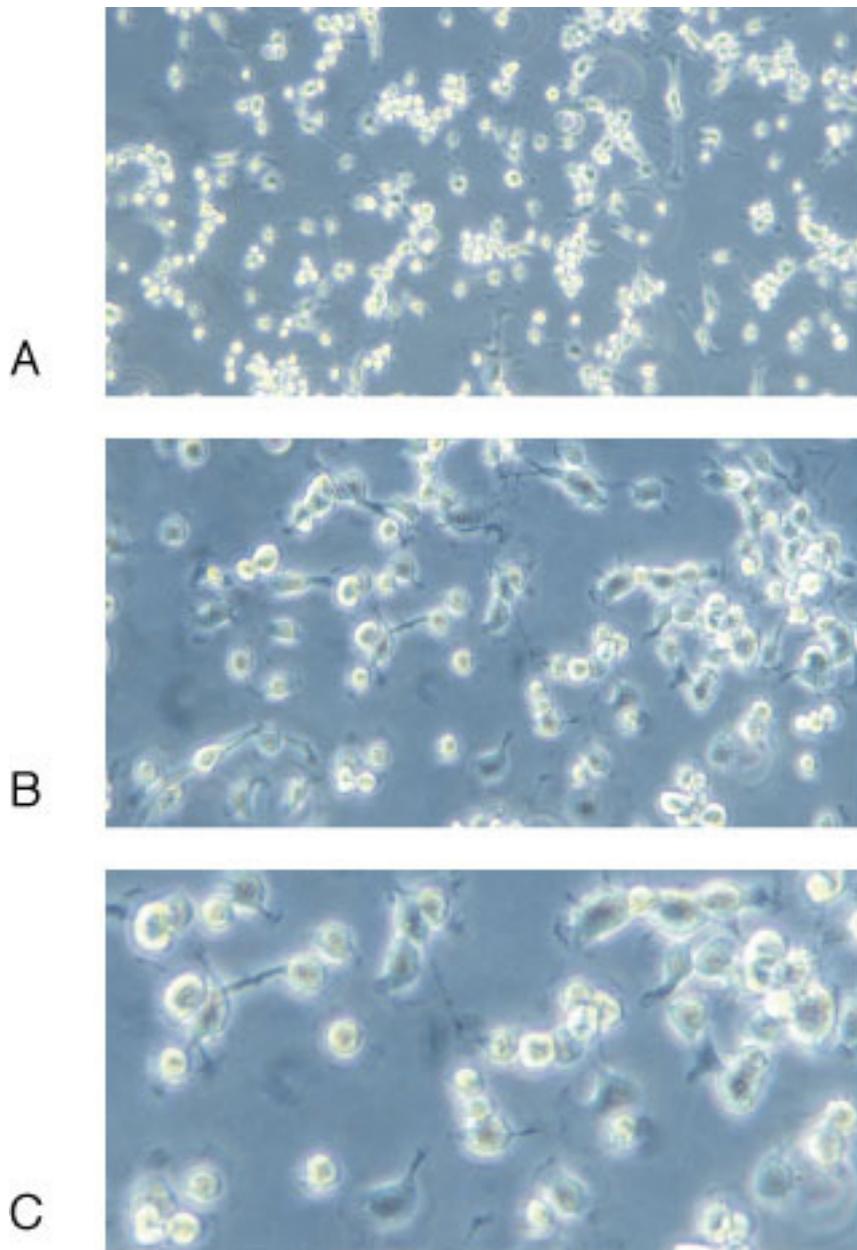
**Abbildung 4.1 Morphologie von MPL0- (A) und MPL5- (B) Makrophagen auf Zellkulturschalen**

Die Abbildung zeigt die Morphologie der MPL0- (A) und MPL5- (B) Makrophagen auf Zellkulturschalen. Die Aufnahmen wurden mit Phasenkontrast bei einer 200-fachen Vergrößerung erstellt. Die Zellen zeichnen sich durch eine polygonale Form und adhärenes Wachstum aus. Die Aufnahmen der MPL0-Zellen erfolgten in der 18., die Aufnahmen der MPL5-Zellen in der 17. Passage. Morphologisch lassen sich keine Unterschiede zwischen den MPL0- und den MPL5-Zellen erkennen.



**Abbildung 4.2 Morphologie von MPL0-Zellen auf mikrobiologischen Schalen**

Die auf mikrobiologischen Schalen wachsenden MPL0-Makrophagen wurden bei 100-facher (A), 200-facher (B) und 320-facher (C) Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen der Zellen erfolgten in der 15. Passage. Zum Teil wuchsen die Zellen in Suspension, größtenteils adhärirten sie jedoch am Schalenboden.



**Abbildung 4.3 Morphologie von MPL5-Makrophagen auf mikrobiologischen Schalen**

Die Abbildung zeigt auf mikrobiologischen Schalen wachsende MPL5-Makrophagen in 100-facher (A) und 200-facher (B) Vergrößerung. Abbildung C zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von B. Die Aufnahmen der Zellen erfolgten in der 25. Passage. Hinsichtlich der Morphologie ließen sich keine Unterschiede zu den MPL0-Makrophagen (Abbildung 4.2) erkennen.

### 4.3 Mykoplasmentestung

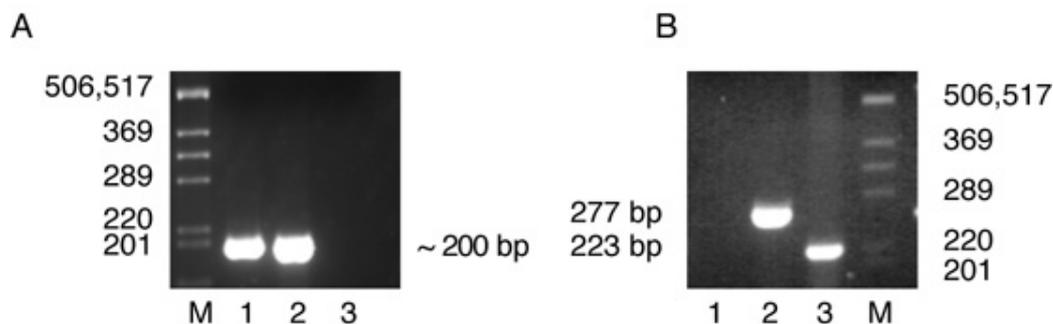
Mykoplasmen sind kleine, vorwiegend intrazellulär lebende Bakterien. Da sie keine Zellwand besitzen (Uphoff et al., 2002), sind sie resistent gegen Antibiotika wie beispielsweise Penicillin und kontaminieren häufig unbemerkt Zelllinien. Eine Kontamination mit Mykoplasmen kann die Proliferationsgeschwindigkeit und die Genexpression der Zellen verändern. Aus diesem Grund wurden alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien auf eine derartige Kontamination getestet; mit dem *MycoAlert Mycoplasma Detection Assay* lassen sich Mykoplasmen-spezifische Enzyme über biochemische Reaktionen nachweisen.

Durch Untersuchung der Mediumüberstände aller Zelllinien konnte eine mögliche Kontamination der MPL0- und MPL5-Makrophagen sowie der J774- und der NIH 3T3-Zellen mit Mykoplasmen ausgeschlossen werden.

#### 4.4 Überprüfung des Genotyps der Zelllinien durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Generierung der Ccr5-positiven MPL0-Zelllinien wurden Makrophagen aus Ccr5<sup>+/+</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert; die für die MPL5-Zelllinien benötigten Makrophagen stammten hingegen aus Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäusen. Der Genotyp der Zellen für p53 und Ccr5 sollte mittels Polymerasekettenreaktionen (PCR) überprüft werden. Zusätzlich ließ sich auf diese Weise eine Kontamination mit fremden Zellen ausschließen. Bei der Durchführung wurden jedem Ansatz die Primer sowohl für das Wildtyp- als auch für das „Knockout“-Allel zugesetzt.

In Abbildung 4.4 A und B sind die Ergebnisse wiedergegeben. Beide Zelllinien zeigten sich homozygot negativ für das p53-Gen. Aufgrund fehlender Information lässt sich die genaue Größe der Bande für das p53-„Knockout“-Gen nicht exakt bestimmen; sie beträgt jedoch ungefähr 200 Basenpaare (Yamamoto et al., 2000). Bei der Genotypisierung zeigten sich die MPL5-Zellen zusätzlich homozygot negativ für das Ccr5-Gen. Bei den MPL0-Zellen wurde ein homozygot positiver Genotyp für Ccr5 nachgewiesen.



##### Abbildung 4.4: Genotypisierung der Zelllinien durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Abbildung A zeigt das Ergebnis der PCR für das p53-Gen. Spur 1: MPL0-Zellen, Spur 2: MPL5-Zellen, Spur 3: Wasser-Kontrolle, M: 1 kb-Leiter als Marker für die Fragmentgrößen. Die eingesetzten Primer ergaben bei einem Genotyp von p53<sup>-/-</sup> ein PCR-Fragment von ungefähr 200 Basenpaaren (Einzelheiten siehe Text).

Abbildung B zeigt das Ergebnis der PCR für das Ccr5-Gen. Spur 1: Wasser-Kontrolle, Spur 2: MPL0-Zellen, Spur 3: MPL5-Zellen, M: 1 kb-Leiter. Bei einem Genotyp von Ccr5<sup>+/+</sup> ergaben die eingesetzten Primer ein Fragment von 277 Basenpaaren, während sich bei einem Genotyp von Ccr5<sup>-/-</sup> ein Fragment von 223 Basenpaaren zeigte.

## 4.5 Anreicherung CD11b-positiver Zellen

Um den Differenzierungsgrad der Zelllinien zu überprüfen, wurden in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Dabei sollte die Expression von CD11b, einem speziellen Marker für Leukozyten, der vor allem von Granulozyten, reifen Makrophagen (Leenen et al., 1994), Dendritischen Zellen, Natürlichen Killer-Zellen, Mikroglia und B-Zellen exprimiert wird, auf den Zellen nachgewiesen werden. Nachdem beide Zelllinien zunächst auf Zellkulturschalen kultiviert worden waren, zeigte sich in den durchflusszytometrischen Analysen, dass es sich bei den MPL0- und MPL5-Zelllinien um eine Mischung aus CD11b-positiven und -negativen Zellen handelte. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde versucht, die CD11b-positiven Zellen anzureichern.

### 4.5.1 Anreicherung CD11b-positiver Zellen durch *MACS-MicroBeads*

Bei einer Anreicherung mit Hilfe von MACS-CD11b-MicroBeads werden die CD11b-positiven Zellen magnetisch markiert. Dies erfolgt durch Inkubation mit einem gegen CD11b gerichteten, an magnetische Teilchen gekoppelten Antikörper. Durch Einbringen der Proben in ein magnetisches Feld lassen sich dann die CD11b-positiven und die CD11b-negativen Zellen voneinander trennen.

Zunächst waren die Zellen zwei Tage vor ihrer Anreicherung durchflusszytometrisch überprüft worden: dabei zeigten ungefähr 20 % der MPL0- und ungefähr 35 % der MPL5-Zellen eine Expression von CD11b. Ein Versuch, unter Verwendung eines MACS-Pre-Separation-Filters eine Einzelzellsuspension vor der Anreicherung herzustellen, blieb erfolglos, denn es befanden sich immer noch kleinere Zellklumpen im Kulturmedium.

Nach der Anreicherung wurden die Zellen zunächst auf 24-Well-Zellkulturschalen kultiviert. Dabei proliferierten sowohl die MPL0- als auch die MPL5-Zellen stark und wurden soweit expandiert, dass sie nach etwa zwei Wochen auf jeweils eine mikrobiologische und eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm transferiert werden konnten. Nach dreiwöchiger Kultur auf Zellkulturschalen wurden die Zellen erstmals durchflusszytometrisch analysiert: Leider zeigten nur 5 % der MPL5-Zellen eine Expression der Leukozyten-Marker CD45 und CD11b, bei den MPL0-Zellen waren CD45 und CD11b nicht an der Zelloberfläche nachweisbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nur die MPL5-Zellen weiter kultiviert. Nach zwei Wochen auf Zellkulturschalen wiesen dann erstaunlicherweise etwa 20 % der Ccr5-negativen Zellen eine Expression von CD11b auf; nach einer Kultivierungszeit von etwa drei Monaten auf

mikrobiologischen Schalen exprimierten 50 % der Ccr5-negativen Zellen CD11b an ihrer Oberfläche.

#### **4.5.2 Anreicherung CD11b-positiver Zellen durch *Dynal-Biotech-Dynabeads***

Da die Anreicherung CD11b-positiver Zellen mit Hilfe der *MACS-MicroBeads* nicht den gewünschten Erfolg erbracht hatte, sollte noch ein zweites, methodisch ähnliches Verfahren ausprobiert werden. Dazu wurden zunächst unmarkierte Ratten-anti-Maus-CD11b-Antikörper an magnetisch markierte Dynabeads-M-450 Sheep-anti-Rat-IgG-Antikörper gekoppelt und die Zellen anschließend mit den indirekt magnetisch markierten CD11b-Antikörpern inkubiert. Durch Einbringen in ein Magnetfeld konnten dann die CD11b-positiven Zellen isoliert werden. Einige Tage vor der Anreicherung zeigten etwa 20 % der MPL0- und der MPL5-Zelllinien durchflusszytometrisch eine Expression von CD11b.

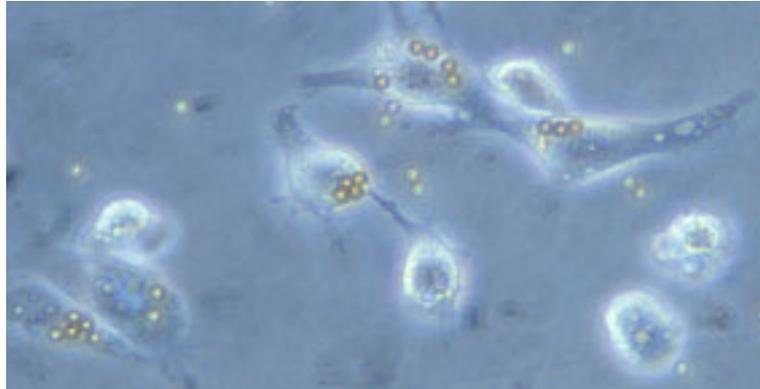
Die zur Anreicherung verwendeten Dynabeads besitzen einen Durchmesser von 4,5 µm und sind daher im Lichtmikroskop zu erkennen. Direkt nach der Anreicherung war zu beobachten, dass sich die Dynabeads um die Zellen herum angesammelt hatten. Nach einigen Stunden ließ sich bei lichtmikroskopischer Kontrolle feststellen, dass die Beads teilweise von den Zellen phagozytiert worden waren und sich nun im Zytoplasma der Zellen befanden (Abbildung 4.5).

Auch dieser Versuch einer Anreicherung CD11b-positiver Zellen mit Hilfe von magnetischen Beads, die an einen gegen CD11b gerichteten Antikörper gekoppelt sind, brachte keinen Erfolg. Die nach der Anreicherung auf mikrobiologischen Schalen kultivierten Zellen wiesen zwar im Laufe ihrer Kultivierung durchflusszytometrisch eine zunehmende Expression Leukozyten-spezifischer Marker auf; diese Entwicklung entsprach jedoch den Veränderungen, die üblicherweise bei der Kultivierung von Zellen auf mikrobiologischen Schalen beobachtet werden.

#### **4.5.3 Serielle Verdünnung von phagozytierenden Zellen**

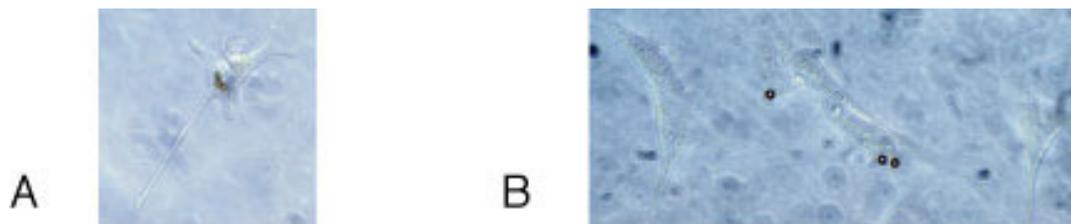
Zu den wesentlichen Merkmalen eines Makrophagen gehört die Eigenschaft, Fremdkörper zu phagozytieren. Auf dem Weg zur Generierung der MPL0- und der MPL5-Makrophagen-Zelllinien wurde deshalb versucht, eine Suspension von Zellen, die zum Teil einen oder mehrere Dynabeads phagozytiert hatten, seriell zu verdünnen. In mehreren Schritten wurde dabei die Suspension so stark verdünnt, dass nach dem Aussäen pro Well einer 96-Well-Platte nur noch eine Zelle enthalten war. Durch Expansion sollten daraus Zellklone entstehen, bei denen es sich sicher um phagozytierende Makrophagen handelt.

Es gelang sowohl die MPL0- als auch die MPL5-Zellen so zu verdünnen, dass sich in jeweils einem Well einer 96-Well-Platte eine einzige Dynabead-phagozytierende Zelle befand. Diese Zellen wurden in den folgenden Tagen beobachtet und fotografiert (Abbildung 4.6). Die Ccr5-positive MPL0-Zelle entwickelte sich nur schlecht und starb nach einigen Tagen ab. Auch die Ccr5-negative MPL5-Zelle zeigte zunächst eine nur sehr schlechte Entwicklung, begann aber nach einigen Tagen zu proliferieren; dabei wurden die phagozytierten Beads auf die Tochterzellen verteilt. Innerhalb von etwa zwei Wochen starb jedoch ein Großteil der Zellen, – unter anderem die Bead-phagozytierende Zelle – ab; etwa fünf überlebten. Diese proliferierten und konnten nach etwa drei Wochen auf eine mikrobiologische 10 cm-Schale ausgesät werden. Durchflusszytometrische Analysen zeigten jedoch leider keine Expression Leukozyten-spezifischer Marker.



**Abbildung 4.5 Phagozytose von *Dynabeads* durch *Ccr5*-negative Zellen nach versuchter Anreicherung *CD11b*-positiver Zellen**

Gezeigt werden MPL5-Zellen einen Tag nach dem Versuch, eine *CD11b*-positive Zellpopulation mit Hilfe von *Dynabeads* anzureichern. *Dynabeads* besitzen einen Durchmesser von  $4,5\ \mu\text{m}$  und sind daher im Lichtmikroskop sichtbar. Gut zu erkennen sind MPL5-Zellen, die zum Teil mehrere *Dynabeads* phagozytiert haben.



**Abbildung 4.6 Durch serielle Verdünnung gewonnener, phagozytierender *Ccr5*-negativer Zellklon**

Abbildung A zeigt eine einzelne, durch serielle Verdünnung gewonnene MPL5-Zelle, die drei *Dynabeads* phagozytiert hatte. Abbildung B zeigt den sich aus dieser Zelle entwickelnden Zellklon nach vier Tagen. Bei der Zellteilung wurden die *Dynabeads* auf die Tochterzellen verteilt.

## 4.6 Analyse der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

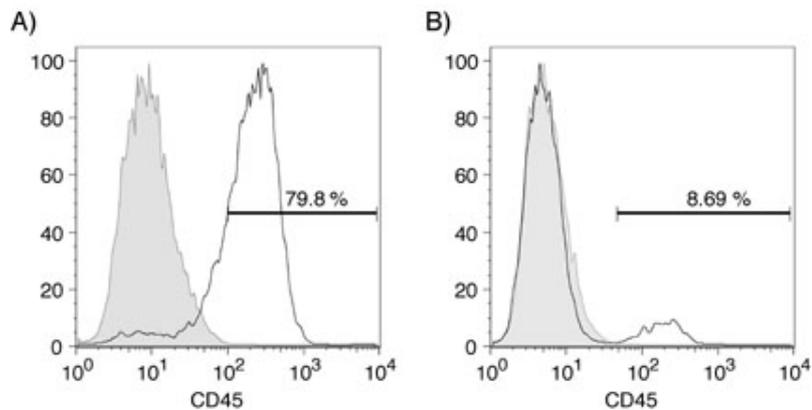
Die Durchflusszytometrie hat sich als geeignetes Verfahren zur genauen Charakterisierung von Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle sehr bewährt. Dabei werden die zu analysierenden Zellen zunächst mit Hilfe eines direkt oder indirekt an ein Fluorochrom gekoppelten Antikörpers markiert. Die eingesetzten monoklonalen Antikörper können sowohl gegen bestimmte Proteine auf der Zelloberfläche als auch gegen intrazelluläre Antigene gerichtet sein. Die so markierten Zellen werden nun einzeln durch eine Messkammer geschleust und dabei durch einen Laserstrahl geleitet. Das Streulicht sowie die Lichtemissionen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich mit Photomultipliern in elektronische Signale umwandeln, die mit Hilfe eines Computers sichtbar gemacht werden können (Janeway et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Antikörper eingesetzt, die gegen Proteine an der Zelloberfläche gerichtet waren. Mittels Durchflusszytometrie sollte überprüft werden, ob es sich bei den neu generierten Zelllinien tatsächlich um Makrophagen-Zelllinien handelte. Bei allen Versuchen wurden J774-Makrophagen, als positive Kontrollen eingesetzt. Zum Teil wurden auch negative Kontrollen mit NIH 3T3-Fibroblasten durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen auf die Expression des allgemeinen Leukozytenmarkers CD45 und des für reife Makrophagen spezifischeren Markers CD11b (Leenen et al., 1994) unter Verwendung direkt markierter Antikörper hin untersucht; dabei sollte gezeigt werden, dass es sich bei den kultivierten Zellen tatsächlich um Leukozyten handelte. Zur negativen Kontrolle dienten anfänglich ungefärbte Zellen. Durch den Nachweis von CD45, auch LCA (*leukocyte common antigen*) genannt, lassen sich Zellen hämatopoetischen Ursprungs (Tchilian et al., 2004) von allen anderen Zellen unterscheiden. CD11b wird in der Regel auf der Zelloberfläche von Granulozyten (Lagasse und Weissman, 1996), Makrophagen (Leenen et al., 1994), Natürlichen Killer-Zellen, Dendritischen Zellen (Varga et al., 2006) und Mikroglia exprimiert.

Bereits zu Beginn der Versuche erwies sich die Expression dieser Marker als sehr variabel und von den verwendeten Kulturschalen abhängig. Zunächst wurden die Zellen auf so genannten Zellkulturschalen kultiviert. Bei deren Herstellung wird die Oberfläche derart behandelt, dass sie sich insbesondere zur Kultivierung adhärenter Zellen eignen. Bei Kultivierung auf Zellkulturschalen verloren beide Zelllinien innerhalb weniger Wochen die Expression von CD45 und CD11b. Abbildung 4.7 zeigt dies exemplarisch für die Ccr5-negative MPL5-Zelllinie. Dieser Verlust ging sogar so weit, dass schließlich keine Expression von Leukozyten-spezifischen Markern mehr nachzuweisen war.

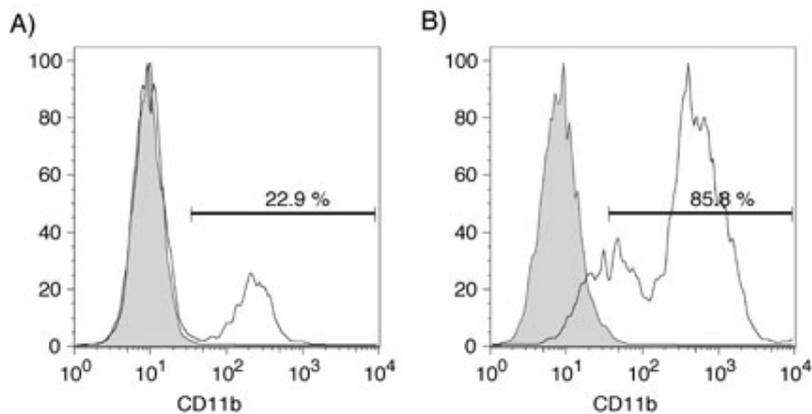
Bei einer Kultivierung auf mikrobiologischen Schalen behielten die Zellen die Expression ihrer Oberflächenmarker und konnten diese sogar noch steigern. In der Regel mussten die Zellen kontinuierlich über Monate hinweg auf mikrobiologischen Schalen kultiviert werden, so dass die Leukozytenmarker wieder in höherem Maße exprimiert wurden. Mikrobiologische Schalen bestehen im Vergleich zu Zellkulturschalen aus unbehandeltem Polystyrol. In Abbildung 4.8 ist dies beispielhaft für die MPL5-Zelllinie anhand der CD11b-Expression dargestellt. Zellen, die zuvor keinerlei Expression Leukozyten-spezifischer Marker gezeigt hatten, blieben jedoch im weiteren Verlauf, auch bei der Kultivierung auf mikrobiologischen Schalen, negativ für CD45 und CD11b.



**Abbildung 4.7 Entwicklung der Expression von CD45 auf Zellen der Ccr5-negativen MPL5-Zelllinie bei Kultivierung auf Zellkulturschalen**

Aufgetragen ist die Anzahl der analysierten Zellen (vertikal) gegen die Stärke der Fluoreszenz für CD45 (horizontal). Helle Kurven: mit FITC-markiertem CD45-Antikörper inkubierte Proben; dunkle Kurven: ungefärbte Zellen zur negativen Kontrolle.

Abbildung A: 80 % der Ccr5-negativen MPL5-Zellen zeigen eine Expression von CD45 wenige Wochen nach Isolierung durch Peritoneallavage. Abbildung B: Nur noch ungefähr 10 % der Zellen sind nach vierwöchiger Kultur auf Zellkulturschalen positiv für CD45.



**Abbildung 4.8 Entwicklung der CD11b-Expression auf Zellen der MPL5-Zelllinie bei Kultivierung auf mikrobiologischen Schalen**

Aufgetragen ist die Anzahl der analysierten Zellen (vertikal) gegen die Stärke der Fluoreszenz für CD11b (horizontal). Hellen Kurven: mit FITC-markiertem CD11b-Antikörper inkubierte Proben; dunklen Kurven: ungefärbte Zellen zur negative Kontrolle.

Abbildung A: 20 % der Zellen exprimieren CD11b nach einer vierwöchigen Kultivierung auf Zellkulturschalen. Abbildung B: Steigerung der CD11b-Expression auf MPL5-Zellen nach kontinuierlicher Kultivierung über sechs Monate hinweg auf mikrobiologischen Schalen.

Nachdem sich mehrere Subpopulationen der MPL0- und der MPL5-Zelllinien gebildet hatten und diese relativ stabil die Marker CD45 und CD11b exprimierten, sollte versucht werden, weitere Makrophagen-spezifische Marker nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden nun Antikörper gegen CD14 und F4/80 verwendet. In der Maus konnte eine Expression von CD14 auf kultivierten Makrophagen- und Monozyten-Zelllinien wie J774- und WEHI-265.1-Zellen, sowie auf Peritoneal-Makrophagen (Ziegler-Heitbrock und Ulevitch, 1993) und Kupffer-Zellen (Matsuura et al., 1994) nachgewiesen werden. Sie ist abhängig von der Stimulation der Zellen und unterscheidet sich vom CD14-Expressionsmuster beim Menschen, wo CD14 auf zirkulierenden Monozyten und Neutrophilen exprimiert wird (Ziegler-Heitbrock und Ulevitch, 1993). Das Maus-F4/80-Antigen wird von den meisten murinen Makrophagen exprimiert und ist ein Marker speziell für adulte Makrophagen (Leenen et al., 1994). Keine Expression dieses Markers findet man auf Lymphozyten oder Neutrophilen Granulozyten.

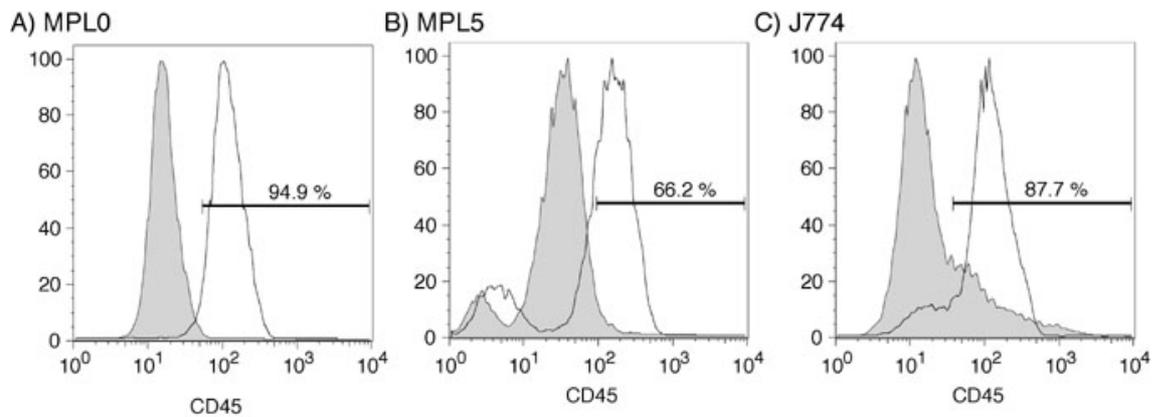
Der Nachweis von CD14 erfolgte über indirekte Färbungen. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einem ungefärbten monoklonalen Ratte-anti-Maus-CD14-Antikörper inkubiert, bevor sich die Inkubation mit dem sekundären Antikörper anschloss. Hierbei handelte es sich um einen mit einem Fluorochrom markierten Antikörper, der seinerseits gegen den Immunglobulin-Typ und die Spezies des primären Antikörpers gerichtet ist. Auch der Nachweis der CD11b-Expression an der Zelloberfläche wurde durchflusszytometrisch zum Teil mittels indirekter Färbungen wiederholt. Für die F4/80-Färbungen wurde ein direkt markierter Antikörper und die dazu passende Isotyp-Kontrolle verwendet

Im Laufe mehrerer Experimente zeigte sich allerdings, dass die Zellen durch den für die indirekten Färbungen verwendeten sekundären Kaninchen-anti-Ratte-Immunglobulin-Antikörper unspezifisch markiert wurden. Die Annahme lag nahe, dass diese Signale durch unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an die Fc-Rezeptoren der Makrophagen vermittelt werden (Coligan, 2006). Mittels zwei verschiedener Methoden sollte nun versucht werden, die unspezifischen Bindungen zu blockieren. Dazu wurden die Zellen zum einen mit einem Überschuss an Maus-Serum vorinkubiert. Dabei sollen die Fc-Rezeptoren durch die im Serum enthaltenen Antikörper blockiert werden (Coligan, 2006). Zum anderen wurde ein kommerziell erhältlicher Fc-Rezeptor-Block eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Ratte-anti-Maus-Antikörper, der gegen CD16/CD32 (Fc $\gamma$ III/II-Rezeptor) gerichtet ist (Gessner et al., 1998) und so unspezifische Bindungen verhindert. Leider zeigten beide Methoden nicht den gewünschten Erfolg.

Eine weitere Möglichkeit zur Verhinderung unspezifischer Bindungen, besteht in der Verwendung von F(ab) $\prime_2$ -Antikörperfragmenten. Ihnen fehlt der Fc-Teil des Antikörpers, so

dass keine Bindung an Fc-Rezeptoren stattfinden kann. Insofern lag die Entscheidung nahe, ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment eines Maus-anti-Ratte-Immunglobulin-Antikörpers einzusetzen. Wurden nun die Zellen ausschließlich mit diesem sekundären Antikörper inkubiert, so zeigten sich keine unspezifischen Signale. Durch die Verwendung geeigneter Isotyp-Kontrollen konnten unspezifische Bindungen des primären Antikörpers überprüft werden.

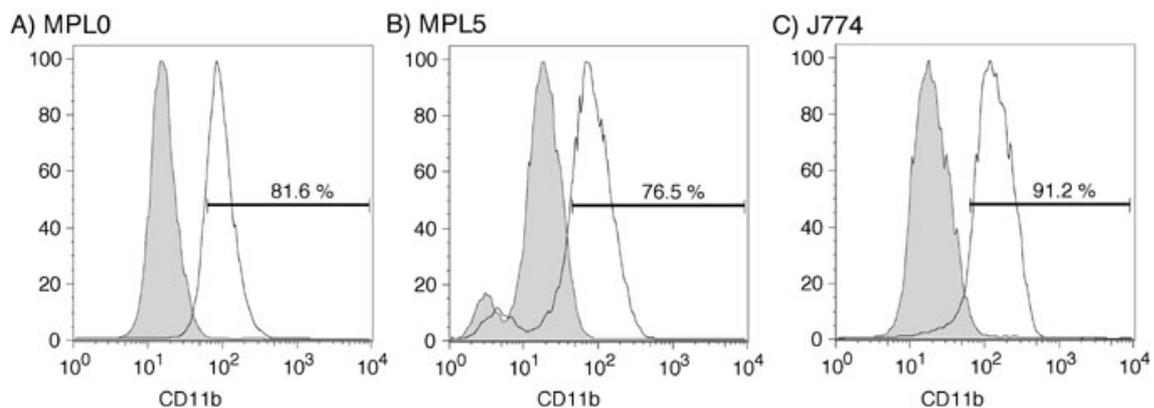
Nachdem die beiden Zelllinien länger als ein Jahr kontinuierlich auf mikrobiologischen Schalen kultiviert worden waren, zeigten sich in der Durchflusszytometrie folgende Ergebnisse: Bei den MPL0-Zellen wurden die Makrophagenmarker CD45, CD11b und F4/80 kontinuierlich von allen Zellen an ihrer Oberfläche exprimiert. Bei der MPL5-Zelllinie exprimierten hingegen nur maximal 80 % der Zellen die für Makrophagen typischen Marker CD45, CD11b und F4/80. Diese Ergebnisse sind in den Abbildung 4.9 bis Abbildung 4.11 wiedergegeben. Bezüglich der Expression von CD14 waren die MPL0-Zellen negativ, während die MPL5- Zellen und vor allem die J774 Zellen CD14 schwach exprimierten.



**Abbildung 4.9 Expression des allgemeinen Leukozytenmarkers CD45 auf Zellen der MPL0- und der MPL5-Zelllinie sowie auf J774-Makrophagen**

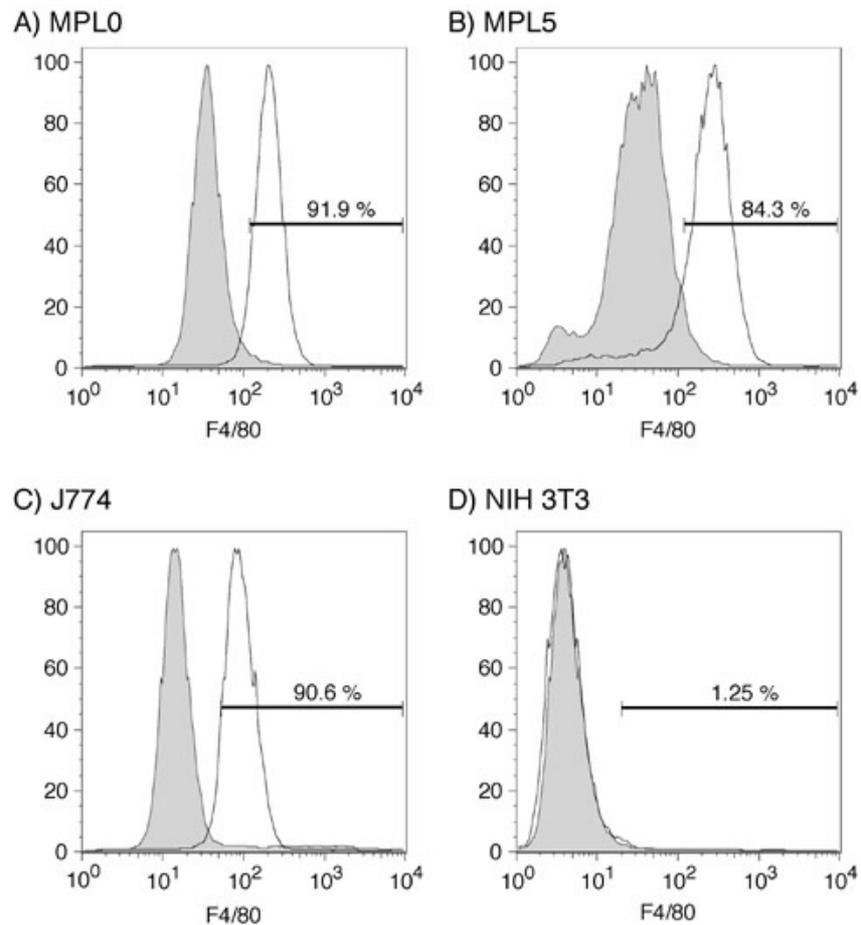
Aufgetragen ist die Anzahl der analysierten Zellen (vertikal) gegen die Stärke der Fluoreszenz für CD45 (horizontal). Helle Kurven: mit FITC-markiertem CD45-Antikörper inkubierte Proben; dunkle Kurven: FITC-markierte IgG2b-Isotypkontrolle.

Abbildung A zeigt im Vergleich zur Isotypkontrolle eine eindeutige Expression von CD45. Die Expression von CD45 durch die MPL5-Zellen (B) ist weniger stark; trotzdem zeigt ein Großteil der Zellen eine CD45-Expression auf der Zelloberfläche. Als positive Kontrolle (C) dienen J774-Zellen, die ebenfalls CD45 exprimierten.



**Abbildung 4.10 Expression des Leukozytenmarkers CD11b auf den MPL0- und MPL5-Zellen sowie auf J774-Makrophagen**

Aufgetragen ist die Anzahl der analysierten Zellen (vertikal) gegen die Stärke der Fluoreszenz für CD11b (horizontal). Helle Kurven: mittels eines Ratten-anti-Maus-CD11b gefärbte Proben; als sekundärer Antikörper dient ein Cy2-markiertes  $F(ab')_2$ -Fragment eines Maus-anti-Ratte-Immunglobulins. Dunkle Kurven: mittels eines Ratten anti-Maus-IgG2b-Antikörpers indirekt gefärbte Isotypkontrollen. Sowohl die MPL0-Zelllinien (A) als auch die zur positiven Kontrolle eingesetzten J774-Zellen (C) zeigen eine deutliche Expression von CD11b. Auch ein Großteil der MPL5-Makrophagen (B) exprimiert CD11b.



**Abbildung 4.11 Expression des für Maus-Makrophagen spezifischen Markers F4/80 auf den MPL0- (A) und den MPL5- (B) Makrophagen sowie auf J774-Makrophagen (C) und NIH 3T3-Fibroblasten (D)**

Aufgetragen ist die Anzahl der analysierten Zellen (vertikal) gegen die Stärke der Fluoreszenz für F4/80 (horizontal). Helle Kurven: mit FITC-markiertem F4/80-Antikörper gefärbte Proben; dunkle Kurven: mit FITC-markiertem IgG2b-Antikörper gefärbte Isotypkontrollen. Sowohl von den MPL0- (A) als auch von den MPL5-Zellen (B) wird F4/80 deutlich exprimiert. Die J774-Makrophagen (C) exprimierten ebenfalls F4/80, während NIH 3T3-Fibroblasten (D) vollständig negativ für F4/80 waren.

Zusätzlich zu den durchflusszytometrischen Analysen auf Makrophagen-spezifische Marker wurden direkte Färbungen gegen die Oberflächenproteine CD3, CD4 und CD8 $\alpha$  sowie gegen CD19 und CD11c durchgeführt. Die Färbung gegen CD19 diente dem Ausschluss von B-Zellen, die Färbung gegen CD3, CD4 und CD8 $\alpha$  dem Ausschluss von T-Zellen.

Sowohl die eigenen Zelllinien als auch die J774-Zellen erwiesen sich im Vergleich zu ungefärbten Zellen als vollständig negativ gegenüber CD19 und CD4. Bei der Färbung gegen CD8 $\alpha$  zeigten sich die J774-Zellen stark positiv, während die eigenen MPL0- und MPL5-Zelllinien nur zum Teil positiv waren. CD3, ein Marker für unreife T-Zellen, konnte auf etwa 70 % der J774-Zellen und auf den eigenen Zelllinien nachgewiesen werden. Auch die Färbungen gegen CD11c waren bei den eigenen Makrophagen-Zelllinien und den J774-Zellen, aber auch bei den NIH 3T3-Zellen positiv. Allerdings könnte es sich bei den positiven Signalen für CD3, CD8 $\alpha$  und CD11c auch um unspezifische Signale zu handeln. Eine genauere Interpretation dieser Daten findet sich in der Diskussion unter Absatz 5.6.2.

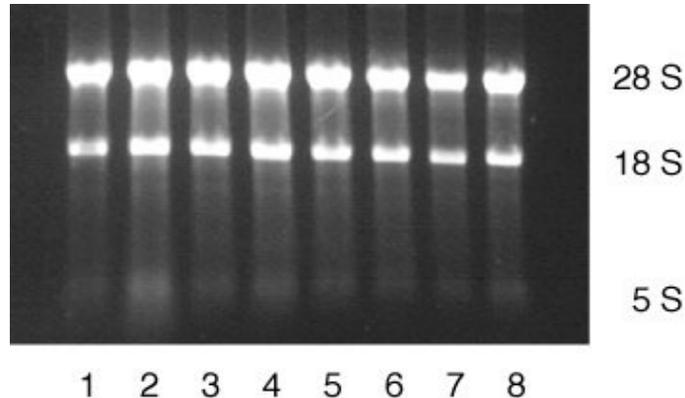
## **4.7 Analyse der Genexpression ausgewählter Gene mit Hilfe von RT-PCR**

Um zusätzliche Hinweise zu erhalten, dass es sich bei den kultivierten Zellen auch tatsächlich um Makrophagen handelte, sollte mit Hilfe von Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) überprüft werden, ob die beiden Zelllinien Makrophagen-spezifische Gene exprimierten. Bei diesem Verfahren wird zunächst die Gesamt-RNA aus den lysierten Zellen extrahiert und anschließend durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese enthält eine Kopie der gesamten, in den Zellen synthetisierten RNA. Durch Analyse der cDNA lassen sich Rückschlüsse auf die Genexpression der Zellen ziehen. Für die Versuche wurden verschiedene, bereits durchflusszytometrisch analysierte, CD11b-positive Subpopulationen der MPL0- und der MPL5-Zelllinien eingesetzt. Alle Experimente wurden mehrfach an unterschiedlichen CD11b-positiven Subzelllinien wiederholt.

### **4.7.1 Isolierung und gelelektrophoretische Auftrennung von RNA aus den Zelllinien**

Die Isolierung von RNA aus den Zellen der verschiedenen Zelllinien erfolgte unter Verwendung eines RNeasy-Mini-Kits von Qiagen. Um sicher zu stellen, dass die aus den Zellen isolierte RNA noch intakt und nicht bereits degradiert war und somit für weitere Analysen verwendet werden konnte, wurde von jeder RNA-Präparation 1  $\mu$ g auf einem MOPS-Agarose-Minigel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid in die RNA ließen sich die Banden auf einem Transilluminator sichtbar machen. Abbildung 4.12 zeigt

exemplarisch anhand eine Fotografie das Ergebnis einer der durchgeführten Gelelektrophoresen.



**Abbildung 4.12 Gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten RNA**

Spur 1: J774-Makrophagen, Spur 2: NIH 3T3-Fibroblasten, Spuren 3-5: Subzelllinien der MPL0-Makrophagen, Spuren 6-8: Subzelllinien der MPL5-Makrophagen  
Aliquots der aus verschiedenen Zelllinien isolierten Gesamt-RNAs wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Qualität der präparierten Gesamt-RNAs zu beurteilen. Alle RNAs zeigten keinerlei Spuren von Degradation. Die 28 S- und die 18 S-rRNA-Banden sind im typischen Verhältnis von 2:1 sichtbar.

#### 4.7.2 Expression der Chemokinrezeptoren Ccr1, Ccr2 und Ccr5

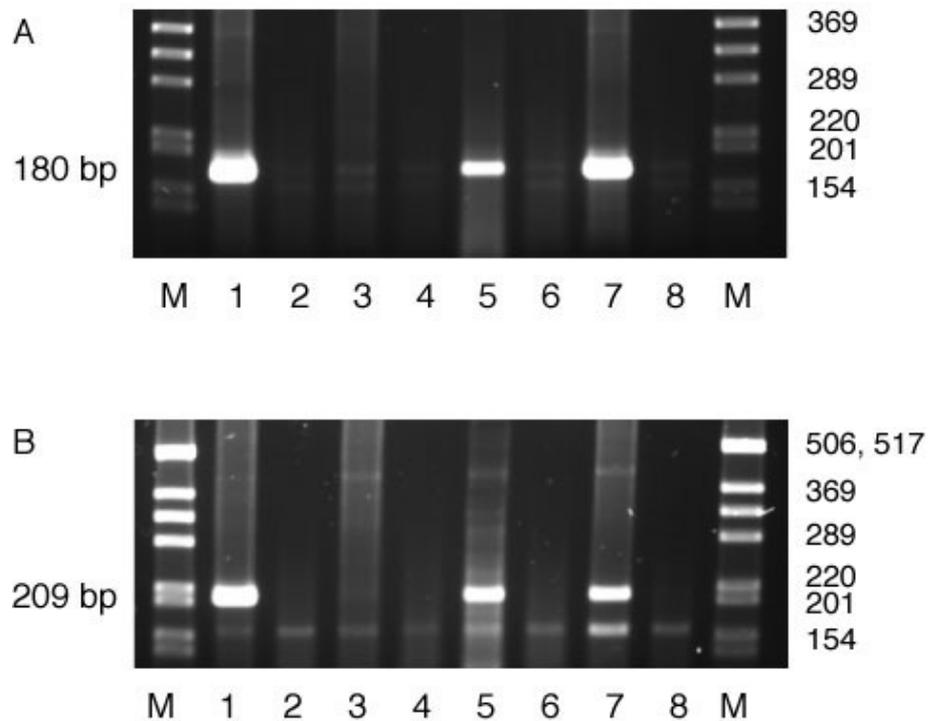
Nachdem die RNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben worden war, wurde die Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente mittels PCR durchgeführt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte dann durch Gelelektrophorese. Durch Einlagerung von Ethidiumbromid in die DNA ließen sich die PCR-Produkte als Banden auf dem Transilluminator sichtbar machen.

Zunächst wurde die Expression von ausgewählten Chemokinrezeptoren in den Zelllinien untersucht. Die CC-Chemokine CCL2/MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1), CCL3/MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ) und CCL5/RANTES vermitteln ihre Wirkung auf mononukleäre Zellen über die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5. Ein Anstieg der Expression der Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 wurde während der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen beobachtet. Parallel dazu nimmt die Expression von CCR2 ab (Kaufmann et al., 2001; Mack et al., 2001). Somit ergibt ein Nachweis gerade dieser Chemokinrezeptoren einen starken Hinweis darauf, dass es sich bei den MPL0- und den MPL5-Zelllinien um Makrophagen handelt.

Die mRNAs für die Chemokinrezeptoren Ccr1 und Ccr2 ließen sich in den MPL0- und den MPL5-Makrophagen sowie in den zur positiven Kontrolle eingesetzten J774-Zellen nachweisen

(Abbildung 4.13). Der Chemokinrezeptor Ccr5 wurde in den MPL0- und den J774-Zellen exprimiert. In den Ccr5-negativen MPL5-Zellen fand erwartungsgemäß keine Expression von Ccr5 statt. Auch in den bei den Versuchen zur negativen Kontrolle eingesetzten murinen NIH 3T3-Fibroblasten konnte wie erwartet keine Chemokinrezeptor-mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 4.14).

In einem zweiten Versuch zum Nachweis der Ccr5-Expression in den Zelllinien wurden den Proben zusätzlich zu den Ccr5-Wildtyp-Primern die Primer für das Ccr5-„Knockout“-Allel zugesetzt. Bei Herstellung der Ccr5-„Knockout“-Mäuse war das Ccr5-Gen durch ein lacZ-Reportergen ersetzt worden, das folglich in den „Knockout“-Mäusen unter der Kontrolle des Ccr5-Promotors transkribiert wird (Luckow et al., 2004). Daher ließ sich auch in den aus den Ccr5-„Knockout“-Mäusen gewonnenen MPL5-Zelllinien eine Bande mit der Fragmentgröße von 223 Basenpaaren und somit eine mRNA-Expression für das Ccr5-„Knockout“-Allel nachweisen (Abbildung 4.15).

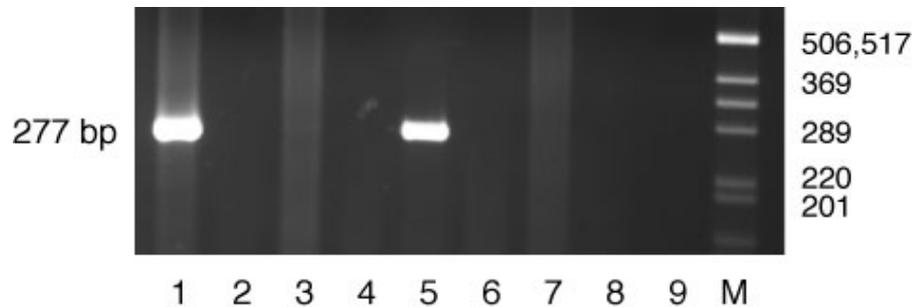


**Abbildung 4.13 Nachweis einer Expression der Chemokinrezeptoren Ccr1 (A) und Ccr2 (B) mittels RT-PCR in MPL0-, MPL5- und J774-Zellen**

Spur 1: J774-Zellen (positive Kontrolle), Spur 3: NIH 3T3-Zellen (negative Kontrolle), Spur 5: Subzelllinie der MPL0-Makrophagen, Spur 7: Subzelllinie der MPL5-Makrophagen; Spur 2, 4, 6, 8: RTminus-Kontrollen, M: 1kb-Leiter als Marker für die Fragmentgrößen

A: Die Banden mit einer Fragmentgröße von 180 Basenpaaren (bp) belegen eine Expression von Ccr1 in den Ccr5-positiven MPL0- und den Ccr5-negativen MPL5-Makrophagen sowie in den J774-Zellen.

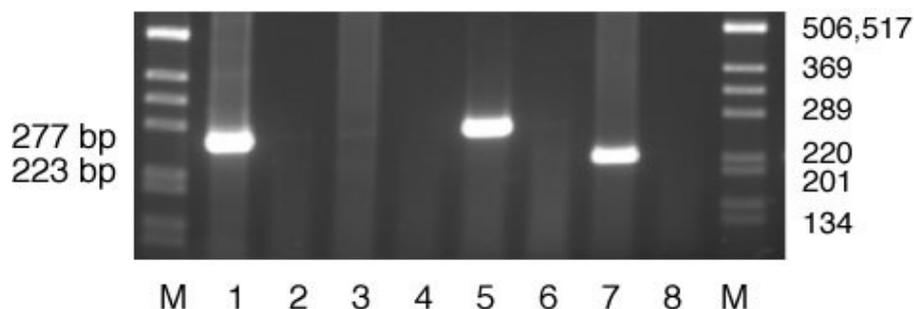
B: Eine Expression von Ccr2 konnte in den MPL0- und MPL5-Makrophagen sowie in den J774-Zellen nachgewiesen werden. Das für das Ccr2-Gen diagnostische PCR-Fragment besitzt eine Größe von 209 Basenpaaren; das Fragment mit einer Größe von etwa 160 Basenpaaren ist als unspezifische Bande nicht zuzordnen. In der NIH 3T3-Fibroblasten-Zelllinie konnte keine Ccr1- und Ccr2-mRNA nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.14 Nachweis einer Expression des Chemokinrezeptors Ccr5 mittels RT-PCR**

Spur 1: J774-Zellen (positive Kontrolle), Spur 3: NIH 3T3-Zellen (negative Kontrolle), Spur 5: Subzelllinie der MPL0-Makrophagen, Spur 7: Subzelllinie der MPL5-Makrophagen; Spur 2, 4, 6, 8: RTminus-Kontrollen, M: 1kb-Leiter als Marker für die Fragmentgrößen

Zum Nachweis einer Expression des Chemokinrezeptors Ccr5 in den MPL0- und den J774-Zellen wurden Polymerasekettenreaktionen unter Verwendung von Primern für das Ccr5-Wildtyp-Gen durchgeführt. In den Ccr5-positiven MPL0-Makrophagen und den J774-Zellen weisen die Banden mit einer Fragmentgröße von 277 Basenpaaren auf die Expression von Ccr5 hin. In den Ccr5-negativen MPL5-Makrophagen wurde der Erwartung entsprechend Ccr5 nicht exprimiert. In den NIH 3T3-Fibroblasten konnte ebenfalls keine Expression des Chemokinrezeptors Ccr5 nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.15 Nachweis einer Expression des Ccr5-„Knockout“-Allels in Ccr5-negativen MPL5-Zellen**

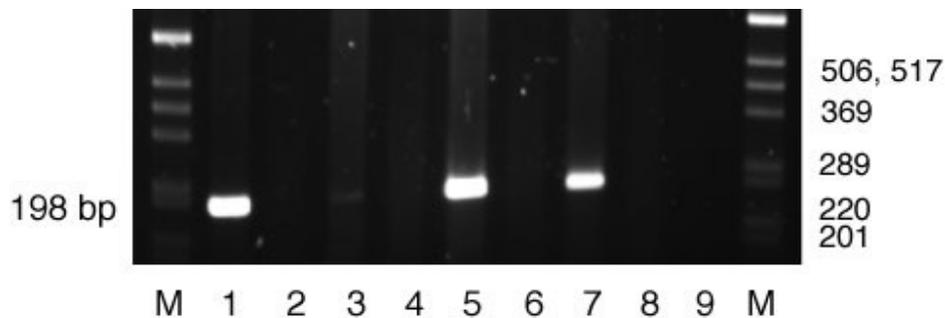
Spur 1: J774-Zellen (positive Kontrolle), Spur 3: NIH 3T3-Zellen (negative Kontrolle), Spur 5: Subzelllinie der MPL0-Makrophagen, Spur 7: Subzelllinie der MPL5-Makrophagen; Spur 2, 4, 6, 8: RTminus-Kontrollen, M: 1kb-Leiter als Marker für die Fragmentgrößen

In einer zweiten, dem Nachweis der Ccr5-Expression dienenden Polymerasekettenreaktion wurden zusätzlich zum Primerpaar für das Ccr5-Wildtyp-Gen jedem Ansatz Primer für das Ccr5-„Knockout“-Allel zugesetzt. Die Bande mit einer Fragmentgröße von 223 Basenpaaren in Spur 7 zeigt, dass in den MPL5-Zellen das Ccr5-„Knockout“-Allel exprimiert wird. Die J774-Zellen (Spur 1) und die Ccr5-positiven MPL0-Zellen (Spur 5) lassen erneut die Expression des Ccr5-Wildtypgens (277 Basenpaare) erkennen. In den NIH 3T3-Zellen (Spur 3) ist erneut keine Ccr5-Expression nachzuweisen.

### 4.7.3 Expression von Lysozym

Im Rahmen der Versuche zur Genexpression wurde überprüft, ob Lysozym von beiden Zelllinien exprimiert wird. Lysozym ist ein antibakteriell wirksames Protein, das vor allem in Hühnereiweiß, Speichel und Tränenflüssigkeit vorkommt. Es katalysiert die Spaltung von Polysaccharidketten in den Zellwänden von Bakterien. Eine Expression dieses Proteins ist spezifisch für myelomonozytäre Zellen; sie tritt am stärksten in reifen Makrophagen auf (Cross et al., 1988; Faust et al., 2000). Daher sollte sowohl in den MPL0- als auch in den MPL5-Zelllinien die mRNA für das Lysozym-Gen mittels RT-PCR nachweisbar sein.

Eine deutliche Expression des Lysozym-Gens ließ sich in den MPL0-, den MPL5- und den J774-Zellen nachweisen. Wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) unter sehr sensitiven Bedingungen bei einer Zyklenzahl von 30 durchgeführt, zeigte sich in den murinen NIH 3T3-Fibroblasten Lysozym-mRNA als schwache Bande. Bei schrittweiser Reduktion der Zyklenzahl auf 25 verschwand diese Bande allmählich. Abbildung 4.16 stellt die Ergebnisse der Lysozym-Expression in den Zelllinien bei einer Anzahl von 25 Amplifikationszyklen dar.



**Abbildung 4.16 Nachweis der Expression von Lysozym durch RT-PCR**

Spur 1: J774-Zellen (positive Kontrolle), Spur 3: NIH 3T3-Zellen (negative Kontrolle), Spur 5: Subzelllinie der MPL5-Makrophagen, Spur 7: Subzelllinie der MPL0-Makrophagen; Spur 2, 4, 6, 8: RTminus-Kontrollen, Spur 9: Wasser-Kontrolle, M: 1kb-Leiter als Marker für die Fragmentgrößen  
Die Banden mit einer Fragmentgröße von 198 Basenpaaren belegen eine Expression von Lysozym in den MPL0- und MPL5-Makrophagen sowie in den J774-Zellen (positive Kontrolle). In den NIH 3T3-Zellen zeigt sich bei Durchführung der PCR bei einer Zyklenzahl von 25 eine schwache Bande.

## 4.8 Phagozytoseassays

Zu den Hauptaufgaben von Makrophagen *in vivo* zählt die Beseitigung von Pathogenen wie beispielsweise Bakterien durch Phagozytose. Um mit Hilfe eines funktionellen Tests zu bestätigen, dass es sich bei beiden Zelllinien um differenzierte Makrophagen handelt, wurden Phagozytoseassays mit jeweils unterschiedlichen MPL0- und MPL5-Subzelllinien durchgeführt. In beiden Versuchen wurden J774- zur positiven sowie NIH 3T3-Zellen zur negativen Kontrolle eingesetzt. In den eigenen Makrophagen-Zelllinien war zuvor durchflusszytometrisch die Expression von CD11b überprüft worden. Beim ersten Versuch wurden Zellen, die zu etwa 50 % und beim zweiten Versuch Zellen, die zu 90 % CD11b-positiv waren, eingesetzt. Zur Phagozytose wurden die Zellen mit DH5 $\alpha$ -Bakterien, einem speziellen *E.coli*-K12-Stamm inkubiert. Der erste Assay wurde mit einem Verhältnis von eingesetzten Bakterien zu eingesetzten Zellen von 20:1, der zweite bei einem Verhältnis von 250:1 durchgeführt.

Nach Inkubation mit den DH5 $\alpha$ -Bakterien wurden die Zellen mehrmals gewaschen und alle extrazellulär verbliebenen Bakterien durch Zugabe eines Gentamicin-haltigen Mediums abgetötet. Die anschließende Lyse der Zellen erfolgte mittels einer Desoxycholat-Lösung. Der Gentamicin-haltige Überstand und die Lysate wurden dann in unterschiedlichen Verdünnungen auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Bakterienkolonien ausgezählt werden. Aus diesen Werten ließ sich für jede Zelllinie die Anzahl der pro 100 000 Zellen phagozytierten Bakterien berechnen. Exemplarisch sollen die Berechnungen anhand von Werten, wie sie sich bei einem Verhältnis von Bakterien zu Zellen von 20:1 ergaben, erläutert werden. Tabelle 4.1 gibt Auskunft über die dabei erzielten Ergebnisse.

**Tabelle 4.1 Anzahl ausgezählter Bakterienkolonien des bei einem Verhältnis von Bakterien zu Zellen von 20:1 durchgeführten Phagozytoseassays**

Zelllinie	J774	NIH 3T3	MPL0	MPL5
Anzahl ausgezählter Zellen	120 000	120 000	150 000	300 000
Bakterienkolonien aus Gentamicin-haltigem Überstand bei einer Verdünnung von 1:10	2	0	5	8
	0	0	14	8
	4	0	3	14
Ausgezählte Bakterienkolonien bei Verdünnung des Lysats von 1:100	30	0	98	134
	21	0	29	67
	35	0	119	43
Ausgezählte Bakterienkolonien bei Verdünnung des Lysats von 1:1000	1	0	10	13
	1	0	0	16
	0	0	10	8

Die Anzahl der in den Mediumüberständen vorhandenen Bakterien blieb in den weiteren Berechnungen unberücksichtigt, da sie im Vergleich zur Anzahl phagozytierter Bakterien etwa um den Faktor  $10^2$  geringer war. Nur die Werte aus der Auszählung der 1:100 verdünnten Lysate wurden weiter verwendet (in Tabelle 4.1 grau unterlegt); die Zahl der Bakterienkolonien aus den 1:1000 verdünnten Lysaten war zu gering und daher zu ungenau.

Da bekannt war, dass die verschiedenen Zelllinien zwischen Tag 1 und Tag 2 des Phagozytoseassays unterschiedlich schnell proliferierten, wurde die genaue Zellzahl am Tag 2 bestimmt, indem eine für diesen Zweck gesondert vorbereitete 6-Well-Platte mit der gleichen Anzahl an Zellen wie sie pro Zelllinie für den Phagozytoseassay eingesetzt worden war, ausgezählt wurde. Die unterschiedlichen Zellzahlen mussten dann bei den weiteren Berechnungen berücksichtigt werden.

Durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor wurde die absolute Anzahl phagozytierter Bakterien berechnet. Daraus ergab sich – unter Berücksichtigung der Zellzahl – im nächsten Schritt die Anzahl der von  $10^5$  Zellen phagozytierten Bakterien (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2 Berechnungen der pro  $10^5$  Zellen einer Zelllinie phagozytierten Bakterien bei einem Verhältnis Bakterien zu Zellen von 20:1**

Zelllinie	J774	NIH 3T3	MPL0	MPL5
Anzahl eingesetzter Zellen	120 000	120 000	120 000	300 000
Ausgezählte Bakterienkolonien bei Verdünnung des Lysats von 1:100	30	0	98	134
	21	0	29	67
	35	0	119	43
Absolute Anzahl phagozytierter Bakterien	3 000	0	9 800	13 400
	2 100	0	2 900	6 700
	3 500	0	11 900	4 300
Mittelwerte	2 867	0	8 200	8 133
Anzahl phagozytierter Bakterien pro 100 000 Zellen	2 500	0	8 167	4 467
	1 750	0	2 417	2 233
	2 917	0	9 917	1 433
Mittelwerte	2 389	0	6 833	2 711

Die Berechnungen beim zweiten, bei einem Verhältnis Bakterien zu Zellen von 250:1 durchgeführten Phagozytoseassay erfolgten analog der Vorgehensweise beim ersten Versuch. Auch hier blieb die Anzahl der in den Mediumüberständen noch vorhandenen Bakterien unberücksichtigt, da sie verschwindend gering ausfiel. Bei der Auswertung wurden diesmal die Werte aus der Auszählung der 1:1000 verdünnten Lysate verwendet (in Tabelle 4.3 grau unterlegt). Die Zahl der Bakterienkolonien aus den 1:100 verdünnten Lysaten war zu groß. Tabelle 4.4 zeigt die weiteren Berechnungen zur absoluten Zahl phagozytierter Bakterien und zur Anzahl der von  $10^5$  Zellen phagozytierten Bakterien.

**Tabelle 4.3 Anzahl ausgezählter Bakterienkolonien des bei einem Verhältnis von Bakterien zu Zellen von 250:1 durchgeführten Phagozytoseassays**

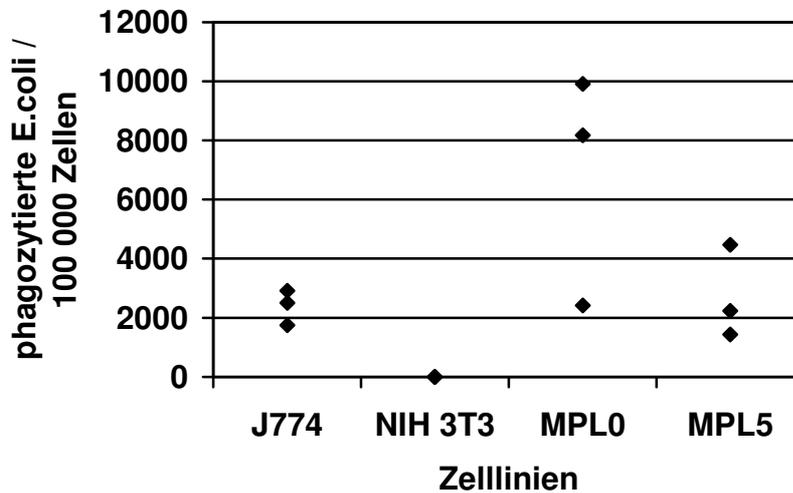
Zelllinie	J774	NIH 3T3	MPL0	MPL5
Anzahl ausgezählter Zellen	75 000	250 000	75 000	75 000
Bakterienkolonien aus Gentamicin-haltigem Überstand bei einer Verdünnung von 1:10	147	2	73	171
	61	3	163	195
	130	0	286	207
Ausgezählte Bakterienkolonien bei Verdünnung des Lysats von 1:100	1 300	18	2 800	1 000
	750	26	2 600	1 000
	1 000	16	3 000	1 000
Ausgezählte Bakterienkolonien bei Verdünnung des Lysats von 1:1000	169	2	224	116
	101	2	251	94
	89	3	314	79

**Tabelle 4.4 Berechnungen der pro 10<sup>5</sup> Zellen einer Zelllinie phagozytierten Bakterien bei einem Verhältnis Bakterien zu Zellen von 250:1**

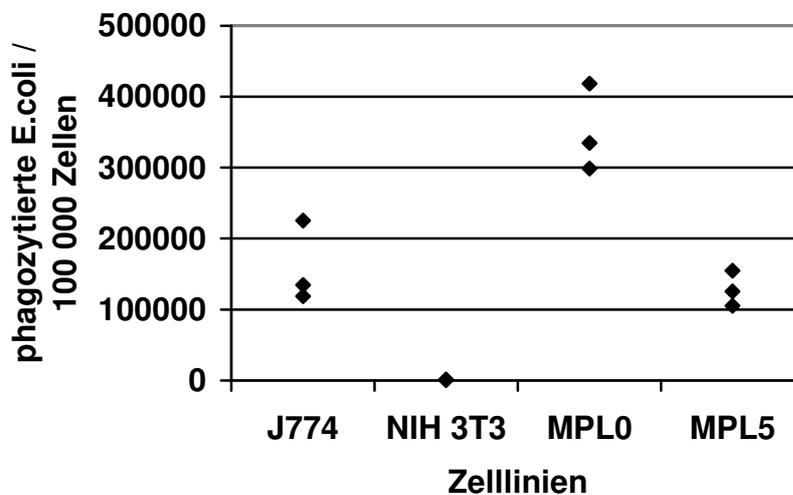
Zelllinie	J774	NIH 3T3	MPL0	MPL5
Anzahl eingesetzter Zellen	75 000	250 000	75 000	75 000
Ausgezählte Bakterienkolonien bei Verdünnung des Lysats von 1:1000	169	2	224	116
	101	2	251	94
	89	3	314	79
Absolute Anzahl phagozytierter Bakterien	169 000	2 000	224 000	116 000
	101 000	2 000	251 000	94 000
	89 000	3 000	314 000	79 000
Mittelwerte	119 667	2 333	263 000	96 333
Anzahl phagozytierter Bakterien pro 100 000 Zellen	225 333	800	298 667	154 667
	134 667	800	334 667	125 333
	118 667	1 200	418 667	105 333
<i>Mittelwerte</i>	<i>159 556</i>	<i>933</i>	<i>350 667</i>	<i>128 444</i>

In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse der Phagozytoseassays grafisch dargestellt. Die Versuche zeigen eindeutig, dass Zellen der MPL0- und MPL5-Zelllinien im Vergleich zu den J774-Zellen mindestens ebenso gute Phagozytose-Eigenschaften aufweisen. Damit ist ein weiteres Mal bewiesen, dass es sich bei beiden Zelllinien mit großer Wahrscheinlichkeit um differenzierte Makrophagen handelt.

A)



B)



**Abbildung 4.17 Ergebnisse der Phagozytoseassays bei einem Verhältnis von Bakterien zu Zellen von 20:1 (A) und von 250:1 (B) in graphischer Darstellung**

Eingesetzt wurden die MPL0- und MPL5-Zelllinien; zur positiven Kontrolle dienten J774-Makrophagen, zur negativen Kontrolle NIH 3T3-Fibroblasten. Die Versuche wurden für jede einzelne Zelllinie parallel an drei Schalen durchgeführt. Umzurechnen war auf die Anzahl der von 100 000 Zellen einer Zelllinie phagozytierten Bakterien. Diese Anzahlen sind als schwarze Punkte in der Abbildung wiedergegeben; jeder Punkt stellt das Ergebnis einer Petrischale dar. Bei dem unteren Wert für die MPL0-Zellen in Abbildung A dürfte es sich um einen Ausreißer handeln; dementsprechend dürfte der Mittelwert wenig aussagekräftig sein.

# 5 Diskussion

## 5.1 Der Einsatz von Zelllinien: Vor- und Nachteile

Um die Funktionen eines bestimmten Zelltyps näher zu charakterisieren, kommen bei *in-vitro*-Experimenten heutzutage häufig Zelllinien zum Einsatz. Im Folgenden sollen Vor- und Nachteile einer Verwendung von Zelllinien näher aufgezeigt werden.

Seit vielen Jahren wird der Einsatz von Tierversuchen in der Forschung kontrovers diskutiert. Durch die Verwendung von Zelllinien lässt sich die Zahl an Tierversuchen jedoch stark reduzieren, da zur Durchführung unterschiedlicher Experimente nicht immer wieder neue Primärzellen aus Tieren isoliert werden müssen. Durch Expansion lassen sich vielmehr in nahezu unbegrenzter Anzahl Zellen gewinnen und für Versuche einsetzen. Ein weiterer Vorteil von Zellkulturen stellt die leichte Handhabung kultivierter Zellen dar. Durch Kryokonservierung können Zellen stabil aufbewahrt werden und die Experimente lassen sich auch nach Jahren wiederholen. Die Möglichkeit, Zellen unter weitgehend standardisierten Bedingungen zu halten, gewährleistet darüber hinaus eine bessere Vergleichbarkeit der in Experimenten gewonnenen Ergebnisse; auch lassen sich die Ergebnisse extrem gut reproduzieren. Die Kulturbedingungen können sehr einfach und schnell variiert und die Auswirkungen dieser Änderungen auf das Verhalten der Zellen leicht beobachtet werden. Von ganz entscheidendem Vorteil ist weiterhin, dass eine Zelllinie eine homogene Zellpopulation darstellt und frei von Verunreinigungen durch andere Zellarten ist. Demgegenüber ist bei Verwendung von Primärzellkulturen zu beachten, dass diese immer aus Mischungen verschiedener Zellarten bestehen. Aufgrund dieser Argumente entstand unter anderem die Idee, eine Ccr5-defiziente Makrophagen-Zelllinie zu generieren und mit Hilfe dieser Zellen die Funktion von Ccr5 in diesem wichtigen Zelltyp genauer untersuchen zu können.

Bei Verwendung von Zelllinien ist allerdings von erheblichem Nachteil, dass die Kulturbedingungen nicht den *in-vivo*-Verhältnissen entsprechen, so dass sich die gewonnenen Ergebnisse nur bedingt auf die Situation im Gesamtorganismus übertragen lassen. Ein großes Problem stellt auch die Dedifferenzierung von Zellen während der Kultur dar. So verlieren sie nach längerer *in-vitro*-Kultivierung einen Teil ihrer morphologischen, physiologischen und biochemischen Charakteristika (Minuth et al., 1996). Auch Differenzierungen in eine andere spezialisierte Zellart wurden beobachtet: So können sich Monozyten unter bestimmten Bedingungen verhältnismäßig schnell in Dendritische Zellen umwandeln (Santini et al., 2000;

Obermaier et al., 2003). Durch Stimulation mit geeigneten Wachstumsfaktoren lassen sich diese Prozesse gezielt beeinflussen.

## 5.2 Verschiedene Ansätze zur Generierung Ccr5-defizienter Makrophagen-Zelllinien

Die Herstellung von Ccr5-defizienten Makrophagen-Zelllinien ist prinzipiell auf verschiedene Weise möglich. Die am häufigsten zur Immortalisierung von Zellen angewendete Methode basiert auf der stabilen Transfektion von isolierten Primärzellen mit einem SV40-T-Antigen-Expressionskonstrukt. Durch die Transfektion werden die Funktionen der Tumorsuppressorgene p53 und Rb in den Zellen zerstört, was zu deren Immortalisierung führt (Strauss und Griffin, 1990; Manfredi und Prives, 1994). Um auf diese Weise Ccr5-defiziente Makrophagen-Zelllinien herzustellen, muss man zunächst Primärzellen aus Peritoneallavage gewinnen; sie werden anschließend stabil mit SV40-TAg transfiziert. In verschiedenen Studien wurde diese Methode bereits erfolgreich zur Herstellung von Makrophagen-Zelllinien angewandt (Mauel und Defendi, 1971; Schwarzbaum et al., 1984; Morgan et al., 1987). Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung immortaler Zelllinien aus Peritoneal-Makrophagen stellt die *in-vivo*-Immortalisierung dieser Makrophagen mit dem J2-Retrovirus dar (Adami et al., 1993). Das murine J2-Retrovirus ist Träger der v-raf- und v-myc-Onkogene und wird bei diesem Verfahren den Mäusen *in vivo* injiziert. Anschließend können die so immortalisierten Peritoneal-Makrophagen isoliert werden. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2001 konnten erstmals immortalisierte Makrophagen-Zelllinien aus Knochenmark durch Ausschalten des *Arf*-Tumorsuppressorgens (Randle et al., 2001) etabliert werden. Dabei kodiert der *Ink4a-Arf*-Lokus für die Proteine p16<sup>Ink4a</sup> und p19<sup>Arf</sup>, die in ihrer Funktion als Tumorsuppressoren in den Zellzyklus eingreifen und so zur Immortalisierung der Zellen führen. Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Immortalisierung von Zellen stellt die Überexpression des Enzyms Telomerase dar (Kim et al., 1994). Die Telomerase verhindert durch Wiederherstellung der Endstücke nach der Zellteilung eine Verkürzung der Chromosomen, was schließlich den Zelltod zur Folge hätte (Alberts, 2001).

## 5.3 Immortalisierung von hämatopoetischen Zellen durch Ausschalten von p53

Einer weiteren Methode zur Immortalisierung leukozytärer Zelllinien liegt die Annahme zugrunde, dass aus p53-defizienten Mäusen gewonnene hämatopoetische Zellen durch das Fehlen des Tumorsuppressorgens p53 immortalisiert werden. Dies konnte im Jahre 1995 von

Metz et. al. an fötalen, blutbildenden Leberzellen von Mäusen gezeigt werden (Metz et al., 1995).

Ausgangspunkt der Hämatopoese ist die pluripotente Stammzelle. Sie besitzt die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, so dass die Zahl der möglichen Zellteilungen theoretisch unbegrenzt ist. Aus ihr hervorgehende Zellen können sich in spezialisierte hämatopoetische Zellen differenzieren und verlieren so die Fähigkeit der Selbsterneuerung (Strauss und Griffin, 1990; Keller, 1992). Durch das Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53 gelingt es, Zellen hämatopoetischen Ursprungs zu immortalisieren; auf diese Weise gewinnen sie die Fähigkeit zur unbegrenzten Vermehrung wieder zurück.

Das Tumorsuppressorgen p53 ist von großer Bedeutung bei der Entstehung einer Vielzahl von Tumoren beim Menschen, beispielsweise bei Tumoren des Darms, der Lunge, der Leber und des blutbildenden Systems (Hollstein et al., 1991). Mutationen in diesem Gen sind prädisponierend und verursachen häufig die Entwicklung spontaner Tumore. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass Mutationen im p53-Gen sehr oft in chronisch entzündetem Gewebe auftreten, beispielsweise bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Lang et al., 1997) oder bei chronischen Gastritiden nach Infektion mit *Helicobacter pylori* (Hibi et al., 1997). Diese Befunde liefern eine mögliche Erklärung, warum Tumore oft als Folge chronischer Infektionen auftreten.

Die physiologische Rolle des Tumorsuppressorgens p53 besteht in der Regulation des Zellzyklus. Treten Schäden im Genom einer Zelle auf, wird die Proliferation durch p53 gehemmt und die Apoptose der Zelle induziert. Um die genaue Rolle von p53 während der Embryo- und Tumorigenese zu klären, wurden p53-defiziente Mäuse hergestellt. Mäuse mit einer Deletion des p53-Gens entwickeln sich zunächst normal, bei 75 % der Tiere bilden sich aber innerhalb der ersten sechs Lebensmonate Tumore aus (Donehower et al., 1992). Am häufigsten werden dabei maligne Lymphome beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ccr5-negativen MPL5-Makrophagen-Zelllinien durch Isolierung von Zellen aus Ccr5/p53-negativen Mäusen hergestellt. Dazu mussten zunächst Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>+/+</sup>-Mäuse mit Ccr5<sup>+/+</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäusen gekreuzt werden. Die so erhaltenen Ccr5<sup>+/+</sup>/p53<sup>+/+</sup>-Mäuse konnten anschließend miteinander verpaart werden. Aus den daraus gewonnenen Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäusen ließen sich nach Induktion einer Peritonitis mittels Thioglykolat-Injektion durch Peritoneallavage Primärzellen isolieren (siehe dazu auch Abbildung 3.1). Die Ccr5-positiven MPL0-Zellen konnten dementsprechend aus Ccr5<sup>+/+</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäusen gewonnen werden. Anschließend wurden die Zellen in Kultur genommen und permanente Zelllinien etabliert.

Um die Immortalisierung der Zellen und damit das Vorliegen von Zelllinien nachzuweisen, wurden aus einzelnen Zellen über eine serielle Verdünnung Zellklone gezüchtet. Ein weiterer Hinweis auf das Vorliegen von Zelllinien stellt die Tatsache dar, dass beide Zelllinien über zwei Jahre hinweg ununterbrochen in Kultur gehalten werden konnten.

Die hier angewandte Methode zur Immortalisierung von Zelllinien durch Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53 hat gegenüber einer stabilen Transfektion von Primärzellen mit einem SV40-TAg-Expressionskonstrukt entscheidende Vorteile: Bei einer Transfektion mit SV40-TAg wird eine unterschiedliche Anzahl von Kopien des verwendeten viralen Onkogens an verschiedenen Positionen in das Genom der Zellen integriert. Dabei lässt sich nicht vorhersagen, welche Auswirkungen diese unkontrollierte Integration auf das weitere Verhalten der Zellen hat. Die Herstellung einer Ccr5-positiven Kontroll-Zelllinie, die sich von der Ccr5-defizienten Zelllinie ausschließlich durch die Anwesenheit der Chemokinrezeptors Ccr5 unterscheidet, ist mit diesem Verfahren prinzipiell nicht möglich. Demgegenüber haben alle von p53-defizienten Mäusen abgeleitete Zelllinien dieselbe genau definierte Mutation im Genom; somit lässt sich eine Ccr5-negative zusammen mit der Ccr5-positiven Zelllinie leicht herstellen. Beide unterscheiden sich – wie gesagt – nur durch die An- bzw. Abwesenheit des Chemokinrezeptors Ccr5.

Dieser Ansatz, durch das Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53 eine Ccr5-negative Makrophagen-Zelllinie und eine dazu passende Ccr5-positive Kontroll-Zelllinie zu etablieren, stellt eine bei Makrophagen bislang noch nicht eingesetzte Methode dar. Insofern war zu Beginn der Arbeit nicht absehbar, ob die Etablierung der Zelllinien tatsächlich möglich sein würde.

## **5.4 Auswirkungen der p53-Defizienz auf die Zelllinien**

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass das Tumorsuppressorgen p53 bei der Regulation von Entzündungsreaktionen möglicherweise eine wichtige Rolle spielt. Beispielsweise zeigte sich in Experimenten an p53-defizienten Mäusen, dass Autoimmunerkrankungen wie etwa Arthritiden oder Encephalitiden deutlich schwerer verlaufen als bei Wildtyp-Tieren (Yamanishi et al., 2002; Okuda et al., 2003). Auffällig ist außerdem, dass etwa 25 % der p53-defizienten Mäuse an kompliziert verlaufenden Infektionen wie Gastroenteritiden oder Myokarditiden verstarben, noch bevor sie Tumore entwickeln konnten (Donehower et al., 1992). Dies könnte auf einen durch die p53-Defizienz verursachten Defekt im angeborenen Immunsystem hinweisen. Hingegen bleibt das erworbene Immunsystem,

repräsentiert durch die Anzahl an B- und T-Zellen sowie durch die Menge an Immunglobulinen davon unbeeinflusst (Donehower et al., 1992).

Für eine mögliche Erklärung dieser Befunde wäre eine Interaktion zwischen dem Tumorsuppressorgen p53 und dem proinflammatorisch wirksamen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B denkbar (Gu et al., 2002; Gu et al., 2004). NF- $\kappa$ B beeinflusst Entzündungsreaktionen auf molekularer Ebene durch Aktivierung der Transkription von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und anderen (Karin et al., 2002; Komarova et al., 2005). In einer Studie von Komarova et al. (Komarova et al., 2005) wurde der Einfluss des Tumorsuppressorgens p53 auf die Regulation des angeborenen Immunsystems gezielt untersucht. Zunächst konnten die Autoren *in vitro* zeigen, dass p53 die durch NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription verschiedener Gene hemmt. Anschließend ließen sich über *in-vivo*-Experimente nach intraperitonealer Injektion von bakteriellem Endotoxin (LPS) in den Thymusdrüsen von p53-defizienten Mäusen bei vielen Zytokinen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren wie zum Beispiel IL-1, IL-6, IL-12, TNF, Ccr2, Ccr5 und IP-10/CXCL10 erhöhte Spiegel feststellen. Ursache hierfür scheint eine erhöhte Aktivität des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in p53-defizienten Mäusen zu sein. Bei intraperitonealer Injektion letaler Dosen von bakteriellem Endotoxin (LPS) oder chirurgischer Perforation des Zökum zeigten p53-defiziente Mäuse eine signifikant erhöhte Sterblichkeit. Auch war nach Induktion einer Peritonitis die Rekrutierung von Makrophagen in die Bauchhöhle bei den p53-defizienten Mäusen deutlich gesteigert und die Beseitigung von eingewanderten neutrophilen Granulozyten aus der Bauchhöhle verzögert. Mögliche Ursachen hierfür könnten eine reduzierte Fähigkeit zur Phagozytose durch p53-defiziente Makrophagen oder eine verminderte Apoptose der neutrophilen Granulozyten selbst sein. Weiterhin ließ sich *in vitro* zeigen, dass p53-defiziente Makrophagen in der Tat deutlich weniger phagozytieren als Makrophagen aus Wildtyp-Tieren. Zusätzlich wiesen p53-defiziente Leukozyten eine erhöhte Produktion von MPO (Myeloperoxidase) und ROS (reactive oxygen species; radikalische Sauerstoff-Verbindungen) auf. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Tumorsuppressorgen p53 die Funktionen des angeborenen Immunsystems und seiner Zellen stark hemmt. Diese Hemmung erfolgt wohl hauptsächlich durch Interaktionen mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B.

Wie bereits zuvor diskutiert, hat das Fehlen des p53-Gens ein verändertes Verhalten der Makrophagen zur Folge; dies betrifft insbesondere ihre Fähigkeiten zur Migration und Phagozytose. Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Zelllinien wurden durch Ausschalten des p53-Gens immortalisiert. In diesem Zusammenhang stellt sich nun die Frage, welche Auswirkungen die p53-Defizienz auf das Verhalten der Zelllinien insgesamt hat und wie die erzielten Ergebnisse zu interpretieren sind.

Beide Zelllinien sind auf die gleiche Art und Weise durch das Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53 immortalisiert worden. Sie unterscheiden sich demnach lediglich durch die An- beziehungsweise Abwesenheit des Chemokinrezeptors Ccr5. Unterschiede in den an beiden Zelllinien durchgeführten Experimenten können folglich damit erklärt werden. Die in den Phagozytoseassays beobachtete bessere Fähigkeit zur Phagozytose bei Ccr5-positiven MPL0-Zelllinien lässt sich daher möglicherweise auf die Anwesenheit von Ccr5 zurückführen. Allerdings sollten alle mit Hilfe der Zelllinien gewonnenen Ergebnisse immer vor dem Hintergrund, dass das Verhalten der Makrophagen auch durch das Fehlen des p53-Gens beeinflusst sein kann, kritisch hinterfragt werden. Zum Zeitpunkt der Herstellung der MPL0- und MPL5-Zelllinien war jedoch der Einfluss von p53 auf das angeborene Immunsystem und somit auch auf die Funktion von Makrophagen noch nicht bekannt.

## 5.5 Dedifferenzierung der Zellen

Werden Zellen als Zelllinie über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten, ändert sich oft ihr ursprünglicher Phänotyp. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind nicht genau bekannt, aber sicherlich spielen Faktoren eine Rolle, die *in vivo* das Wachstum und die Funktion der Zellen bestimmen und die unter *in-vitro*-Kulturbedingungen fehlen. Dieses Phänomen wird Dedifferenzierung genannt und tritt auf, wenn Zellen maligne entarten oder in Kultur gehalten werden. Dabei kann es sich einerseits um einen adaptiven Prozess handeln, bei dem sich unter den geeigneten Bedingungen der differenzierte Phänotyp wieder herstellt. Andererseits kann aber auch ein selektiver Prozess stattfinden, bei dem eine einzige undifferenzierte Zelle aufgrund ihrer besseren Proliferationsgeschwindigkeit alle anderen überwächst. Eine vollständige Wiederherstellung des differenzierten Phänotyps ist dann auch unter optimalen Kulturbedingungen nicht mehr möglich. Ein weiteres Problem der hier diskutierten Dedifferenzierung stellt die Entwicklung von Zellen mit aneuploidem Chromosomensatz dar. Unter Aneuploidie versteht man Anomalien im Genom einer Zelle; dabei können sowohl chromosomale Fragmente als auch vollständige Chromosomen zusätzlich vorhanden sein oder aber vollständig fehlen. Aufgrund dieser Veränderungen im Genom liegen die Gene in unterschiedlicher Anzahl vor; dadurch kann es zu Änderungen der Expressionsprofile in den Zellen mit der Folge beispielsweise einer möglichen Überexpression bestimmter Gene kommen. (Woo und Poon, 2004).

Es gibt verschiedene Marker, die den Grad der Differenzierung von Zellen anzeigen können, so beispielsweise die Expression verschiedener zellspezifischer Oberflächenproteine oder Enzyme. Die Bildung derartiger Marker kann jedoch reversibel ablaufen und ist häufig von

Wachstumsfaktoren oder den Kulturbedingungen abhängig. Das beste Kriterium für das Vorliegen differenzierter Zellen bildet aber der Nachweis von funktionellen Eigenschaften des entsprechenden Zelltyps (Freshney, 1994).

Zunächst wurden die Zelllinien über mehrere Monate auf Zellkulturschalen kultiviert. Dabei verloren sowohl die MPL0- als auch die MPL5-Zelllinie – wie kontinuierlich durchflusszytometrisch überprüft wurde – die Expression der Leukozyten-spezifischen Marker CD45 und CD11b. Hier stellte sich nun die Frage, ob kontaminierenden Zellen wie beispielsweise Fibroblasten die Makrophagen überwachsen hatten oder ob es sich um eine Dedifferenzierung handelte.

Parallel zur Kultivierung auf Zellkulturschalen wurde mit einer Kultivierung der Zelllinien auf unbehandelten, mikrobiologischen Schalen begonnen. Dabei konnten sie insgesamt über mehr als ein Jahr kontinuierlich auf diesen Schalen in Kultur gehalten werden. Während dieser Zeit wurden die Leukozytenmarker CD45 und CD11b relativ stabil an der Zelloberfläche exprimiert. So zeigten beispielsweise Zellen, die nur 20 % positiv für CD11b waren, nach mehrwöchiger Kulturzeit auf mikrobiologischen Schalen eine CD11b-Expression von 80 %. Infolgedessen ist eine unentdeckte Kontamination der Zellen durch Fibroblasten sehr unwahrscheinlich, denn in der Zwischenzeit hätten die Fibroblasten die Makrophagen überwachsen. Wurden die Zellen allerdings von mikrobiologischen Schalen auf Zellkulturschalen transferiert, verloren sie innerhalb weniger Wochen die Expression von CD45 oder CD11b. Aber auch hier konnte das Phänomen beobachtet werden, dass Zellen, die zunächst nur schwach CD45- oder CD11b-positiv waren, ohne äußere Ursache plötzlich wieder stärker Leukozyten-spezifische Marker exprimierten. Insofern liegt die Annahme nahe, dass es sich bei Zellen, an denen durchflusszytometrisch keine Expression Leukozyten-spezifischer Marker festgestellt werden konnte, um dedifferenzierte und nicht um kontaminierende Zellen handelte.

Damit wurden zur weiteren Charakterisierung der Zellen zusätzliche Experimente wie beispielsweise die Überprüfung der Genexpression der Zellen, vor allem aber funktionelle Charakterisierungen wie Phagozytoseassays notwendig.

## **5.6 Durchflusszytometrische Analysen**

### **5.6.1 Vermeidung unspezifischer Signale**

Ein großes Problem bei durchflusszytometrischen Analysen von Leukozyten, insbesondere von Makrophagen, stellen unspezifische Bindungen der Antikörper an die Fc-Rezeptoren an der Zelloberfläche dar. Die physiologische Aufgabe von Makrophagen besteht darin, Antigene zu

erkennen und zu eliminieren. Bei der antikörperabhängigen, zellulären Immunität erfolgt diese Erkennung über die Bindung von Antikörpern der Klasse IgG an die so genannten Fc-Rezeptoren auf den Makrophagen (Swanson und Hoppe, 2004). Wie der Name bereits sagt, erkennen diese Rezeptoren den Fc-Teil von Antikörpern. Bei durchflusszytometrischen Analysen kann es nun zu dem Problem kommen, dass die Fc-Teile der eingesetzten Antikörper unspezifisch an die Fc-Rezeptoren der Makrophagen binden. Um die mit Hilfe der Durchflusszytometrie gewonnenen Daten richtig zu interpretieren, war demnach von entscheidender Bedeutung, unspezifische Bindungen so weit wie möglich zu vermeiden und geeignete Kontrollen einzusetzen.

Bei allen Versuchen wurden positive Kontrollen mit den J774-Zellen, einer etablierten Makrophagen-Zelllinie, durchgeführt; sie sollten die Makrophagen-spezifischen Antikörper sicher binden. Zur negativen Kontrolle dienten NIH 3T3-Zellen, eine etablierte murine Fibroblastenzelllinie. Bei jeder einzelnen Probe wurden zusätzlich ungefärbte Zellen analysiert; damit konnte das Ausmaß der Autofluoreszenz der Zellen festgestellt werden. Um bei den direkten Färbungen unspezifische Bindungen auszuschließen, wurde dabei zur negativen Kontrolle ein ebenfalls direkt markierter, unspezifisch bindender Antikörper vom gleichen Isotyp eingesetzt. Bei Färbungen mit denen lediglich sicher gestellt werden sollte, dass es sich bei den kultivierten Zellen nicht um andere Leukozytenpopulationen wie beispielsweise B- oder T-Zellen sowie Dendritischen Zellen handelt, wurde aus Zeit- und Geldgründen auf den Einsatz von Isotyp-Kontrollen verzichtet und die gefärbten Proben jeweils nur mit ungefärbten Zellen verglichen („Wasserkontrollen“). Um bei indirekten Färbungen unspezifische Bindungen auszuschließen, wurden die Zellen zunächst nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert und analysiert. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen seitens der primären, ungefärbten Antikörper dienten ungefärbte Antikörper desselben Isotyps.

Nach einigen durchflusszytometrischen Untersuchungen hatte sich ergeben, dass bei den indirekten Färbungen der sekundäre polyklonale Kaninchen-anti-Ratte-IgG-Antikörper die Zellen unspezifisch anfärbte. Wurden die Zellen ausschließlich mit dem sekundären Antikörper inkubiert, erhielt man ein stark positives Signal. Daher stellte sich die Frage, wie sich diese unspezifischen Bindungen vermeiden lassen. Nimmt man an, dass die unspezifischen Signale durch Bindung des Antikörpers an Fc-Rezeptoren auf den Zielzellen kommen, so ergeben sich unterschiedliche Ansätze zur Vermeidung dieser unspezifischen Signale. Die erste Möglichkeit besteht darin, durch eine Primärinkubation der Zellen mit Maus-Serum die Fc-Rezeptoren zu blockieren. Dabei binden die Immunglobuline des Serums an die Rezeptoren, so dass diese für unspezifische Bindungen nicht mehr zur Verfügung stehen. Der gefärbte Antikörper bindet dann mit höherer Affinität an das für ihn spezifische Antigen. Bei der zweiten Möglichkeit wird

ein kommerzielles Produkt, der so genannte „Fc-Rezeptor-Block“, verwendet; er besteht aus spezifisch gegen ein Epitop der Fc $\gamma$ III- und Fc $\gamma$ II-Rezeptoren gerichteten Antikörpern. Am besten lassen sich unspezifische Bindungen jedoch durch Verwendung sekundärer Antikörper vermeiden, die als F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente hergestellt wurden. Ihnen fehlt der Fc-Teil, so dass eine Bindung an Fc-Rezeptoren nicht mehr möglich ist (John E. Coligan, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, durch Blockade der Fc-Rezeptoren die unspezifischen Bindungen zu reduzieren. Sowohl die Verwendung eines Überschusses an Maus-Serum als auch der Einsatz des „Fc-Rezeptor-Blocks“ brachten keinen Erfolg; bei Inkubation mit dem „Fc-Rezeptor-Block“ verstärkte sich das Fluoreszenz-Signal sogar. Dieser Befund spricht für den Nachweis von Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und ist als weiterer Hinweis auf das Vorliegen von Makrophagen zu werten. Die unspezifischen Bindungen konnten schließlich erfolgreich durch Verwendung des Maus-anti-Ratte-IgG(H+L)-F(ab')<sub>2</sub>-Fragments vermieden werden.

### 5.6.2 Analyse von Leukozyten- und Makrophagen-spezifischen Markern

Zunächst wurden die Zelllinien auf eine Expression allgemeiner Leukozyten-spezifischer Marker wie CD45 und CD11b hin untersucht. Über die Expression von CD45 lassen sich Leukozyten von Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs eindeutig unterscheiden (Thomas, 1989). Der Marker CD11b wird unterschiedlich stark auf Granulozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Natürlichen Killer-Zellen, Mikroglia und B-Zellen exprimiert. Bei einer Kultivierung der Zellen auf mikrobiologischen Schalen zeigten sowohl die MPL0- als auch die MPL5-Zelllinien eine relativ stabile Expression von CD45 und CD11b, so dass anschließend die Analyse von spezifischeren Markern folgte.

Das Glykoprotein CD14 erfüllt *in vivo* die Aufgabe eines Rezeptors und geht dabei mit dem Komplex aus Lipopolysaccharid (LPS) und dem LPS-bindenden Protein (LBP) eine Bindung ein (Ziegler-Heitbrock und Ulevitch, 1993). Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des Endotoxin-Schocks (Haziot et al., 1996). In der Maus wurde die Expression von CD14 auf Zellen kultivierter Makrophagen- und Monozyten-Zelllinien wie den J774- und WEHI-265.1-Zellen sowie auf Peritoneal-Makrophagen und Kupffer-Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus findet man eine CD14-Expression auch auf Makrophagen und Dendritischen Zellen aus Knochenmark. Die Expression von CD14 ist abhängig von der Stimulation der Zellen, so dass sich das Glykoprotein CD14 nicht auf unstimulierten Makrophagen der Milz, auf Dendritischen Zellen, Neutrophilen oder Blutmonozyten nachweisen lässt. Damit unterscheidet sich dieses Expressionsmuster grundlegend von der CD14-Expression beim Menschen, wo CD14 einen sehr spezifischen Marker für Monozyten und Neutrophile Granulozyten darstellt (Ziegler-

Heitbrock und Ulevitch, 1993). Bei der Analyse auf CD14 zeigte die MPL0-Zelllinie keine und die MPL5-Zelllinie eine nur geringe Expression dieses Markers. Wie oben erläutert spricht dieser Befund allerdings nicht dagegen, dass es sich bei den Zelllinien um Makrophagen handelt. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu überprüfen, ob sich die Expression von CD14 eventuell durch eine Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) induzieren lässt. Zudem ist darauf hinzuweisen, dass die J774-Makrophagen CD14 ebenfalls nur schwach exprimierten.

Das 120 bis 160 kDa große Glykoprotein F4/80 wird von den meisten murinen Makrophagen und Monozyten, vor allem aber auf Peritonealmakrophagen exprimiert; auch hier ist die Expression von der Stimulation der Zellen abhängig (Austyn und Gordon, 1981). Da F4/80 nicht von Lymphozyten und polymorphnukleären Zellen gebildet wird, stellt es daher einen sehr spezifischen Marker für murine Makrophagen dar. Im Vergleich zu den J774-Zellen wurde F4/80 auf den eigenen Zelllinien ebenfalls stark exprimiert; in den Fibroblasten fand erwartungsgemäß keine F4/80-Expression statt. Die starke Expression von F4/80 auf den Zellen der neu generierten Zelllinien liefert somit einen weiteren deutlichen Hinweis darauf, dass es sich hierbei tatsächlich um Makrophagen handelt.

Da die MPL0- und MPL5-Zelllinien auf CD45 und CD11b positiv ansprachen, diese Marker aber auch auf anderen Zellen leukozytären Ursprungs und nicht ausschließlich von Makrophagen exprimiert werden, musste mittels weiterer Färbungen das Vorliegen anderer Leukozytensubpopulationen wie beispielsweise von B- oder T-Zellen ausgeschlossen werden. Demzufolge wurden die Zellen auf die Expression von CD19, CD3, CD4 und CD8 $\alpha$  hin überprüft. Eine Expression von CD19, einem Marker für B-Lymphozyten (Krop et al., 1996), ließ sich sowohl bei den J774-Zellen als auch bei den eigenen Zelllinien durch Vergleich mit ungefärbten Zellen nicht nachweisen. Der gleiche Befund ergab sich für die Expression von CD4, einem Marker für T-Helferzellen. CD3, ein allgemeiner Marker für T-Zellen, war auf etwa 70 % der J774-Zellen und bei den MPL0- und MPL5-Zelllinien nachzuweisen. Da die Proben lediglich mit ungefärbten Zellen der so genannten „Wasserkontrolle“ verglichen wurden, könnte es sich auch um unspezifische Bindungen handeln. Allerdings konnte in einer Studie aus dem Jahr 2004 gezeigt werden, dass beispielsweise auch Peritonealmakrophagen CD4 exprimieren können (Hanna et al., 2001).

CD8 $\alpha$  ist ein weiterer Marker für reife T-Zellen und wird meist als Heterodimer zusammen mit CD8 $\beta$  an der Zelloberfläche exprimiert. Dieser Marker ist allerdings nicht spezifisch für T-Zellen, sondern kann auch von Dendritischen Zellen gebildet werden (Traver et al., 2000; Vremec et al., 2000; Gordon et al., 2005). Bei der Analyse der Zelllinien zeigten sich die J774-

Zellen stark positiv gegenüber CD8 $\alpha$ ; auch die eigenen Zelllinien sprachen zum Teil positiv an. Aus diesem Grund wurde die Expression von CD11c als weiteren Marker für Dendritische Zellen überprüft; er wird zusätzlich zu CD11b und CD8 $\alpha$  (Chirido et al., 2005) von den meisten murinen Dendritischen Zellen, nicht aber von Makrophagen exprimiert. Sowohl die J774-Zellen als auch die eigenen Makrophagen-Zelllinien zeigten im Vergleich mit einer ungefärbten Wasserkontrolle eine schwache Expression von CD11c; allerdings waren auch die NIH 3T3-Zellen in ähnlichem Maße positiv. Aufgrund dieser nicht eindeutigen Befunde ist davon auszugehen, dass es sich erneut um unspezifische Bindungen an die Zellen handelt.

Werden Monozyten in Kultur genommen, können sie innerhalb weniger Stunden bis Tage in Makrophagen oder Dendritische Zellen differenzieren (Obermaier et al., 2003; Leon et al., 2004). Da die bei den hier geschilderten Experimenten eingesetzten Zellen über mehrere Jahre in Kultur gehalten wurden, kann es dabei, wie zuvor ausführlich erläutert, durchaus zu Änderungen im Phänotyp kommen. Insofern besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Expression der Proteine ebenfalls sehr variabel ist und dass sich die Expressionsmuster der Zellen nicht genau auf die Situation *in vivo* übertragen lassen. Allerdings erlaubt die Expression der für Makrophagen typischen Marker CD45, CD11b und F4/80 die Schlussfolgerung, dass es sich bei den MPL0- und den MPL5-Zelllinien tatsächlich um Makrophagen handelt. Darüber hinaus wurden alle Experimente auch parallel an der etablierten und anerkannten murinen Makrophagen-Zelllinie J774 durchgeführt. Die an den eigenen Zelllinien gewonnenen Ergebnisse waren dabei den Befunden aus den Untersuchungen mit den J774-Zellen sehr ähnlich.

## 5.7 Charakterisierungen der Zelllinien mittels RT-PCR und Phagozytoseassays

Wie bereits unter Punkt 5.5 ausführlich dargestellt, neigen Zellen in Kultur dazu, bestimmte biochemische und funktionelle Eigenschaften zu verlieren. Da die an den Zelllinien durchflusszytometrisch nachgewiesene Expression Makrophagen-typischer Marker starken Schwankungen unterlag, wurde mit Hilfe weiterer Methoden gezeigt, dass es sich bei den neu etablierten Zelllinien um differenzierte Makrophagen handelt. Die Zellen sollten selbst nach monatelanger Kultur noch besondere Charakteristika aufweisen, die auch Makrophagen *in vivo* unter physiologischen Bedingungen besitzen.

In beiden Zelllinien konnte über Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) mRNA der Chemokinrezeptoren Ccr1 und Ccr2 nachgewiesen werden. Zusätzlich exprimierten die MPL0-Zellen den Chemokinrezeptor Ccr5. Zu einer gesteigerten Expression von CCR1 und CCR5 kommt es bei der Differenzierung von Monozyten in Makrophagen (Kaufmann et al.,

2001), während CCR2 vor allem von Monozyten exprimiert wird (Brühl et al., 2001; Kaufmann et al., 2001). Weiterhin ließ sich in beiden Zelllinien die Expression von Lysozym nachweisen. Lysozym wirkt antibakteriell und wird von myelomonozytären Zellen exprimiert; die stärkste Expression findet man in reifen Makrophagen (Cross et al., 1988; Faust et al., 2000). Beide Zelllinien zeigten ein für Makrophagen typisches Genexpressionsprofil; dieser Befund ist als weiterer Hinweis zu werten, dass es sich bei den Zellen um Makrophagen handelt.

Zur Hauptaufgabe von Makrophagen *in vivo* zählt die Beseitigung von pathogenen Erregern wie beispielsweise Bakterien. Die Phagozytose spielt dabei eine Schlüsselrolle und stellt einen hoch komplexen Vorgang dar (Aderem und Underhill, 1999). Kann gezeigt werden, dass in Kultur gehaltene Zellen ihre funktionellen Eigenschaften wie zum Beispiel die Phagozytose von Bakterien aufrechterhalten können, so spricht dieser Befund in besonderem Maße für das Vorliegen eines differenzierten Zelltyps. In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Phagozytoseassays zeigte sich, dass die Zellen beider Zelllinien Bakterien in ähnlichem, wenn nicht sogar besserem Maß als die J774-Zellen phagozytierten. Dabei wiesen in beiden Versuchen die MPL0- im Vergleich zu den MPL5-Zellen die besseren Phagozytoseeigenschaften auf.

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei beiden Zelllinien um Makrophagen handelt. Sie weisen Makrophagen-spezifische biochemische und funktionelle Charakteristika auf.

## 5.8 Etablierung von Subzelllinien

Da die MPL0- und die MPL5-Zelllinien im Laufe ihrer Kultivierung in unterschiedliche Richtungen dedifferenzieren können, muss bei Interpretation der Ergebnisse immer berücksichtigt werden, dass die Grundannahme, die beiden Zelllinien unterschieden sich nur durch die An- bzw. Abwesenheit des Chemokinrezeptors Ccr5, unter Umständen nicht mehr gegeben ist.

Im Laufe ihrer Kultivierung hatten sich bei beiden Zelllinien aus den ursprünglich isolierten Primärzellen mehrere unterschiedliche Subpopulationen gebildet. Unter anderem waren sie dadurch entstanden, dass die Zellen unterschiedlich lang auf Zellkulturschalen gehalten und erst später auf mikrobiologische Schalen transferiert worden waren. Wieder andere Zellen wurden beispielsweise für Anreicherungen mit Hilfe magnetischer Beads eingesetzt und sind danach in Kultur belassen worden. Mittels durchflusszytometrischer Analysen ließ sich kontinuierlich der Differenzierungsgrad dieser Subzelllinien bestimmen.

Alle Subpopulationen, die nach längerer Zeit auf mikrobiologischen Schalen den Leukozyten-spezifischen Marker CD11b in hohem Maße an der Zelloberfläche exprimierten, verhielten sich hinsichtlich der Expression Makrophagen-spezifischer, durch RT-PCR nachgewiesener Gene sehr ähnlich. Auch bei der Durchführung der beiden Phagozytoseassays wurden unterschiedliche Makrophagen-Subpopulationen eingesetzt. Aus der Beobachtung, dass die durchgeführten Experimente bei allen CD11b-positiven Subpopulationen ähnliche Ergebnisse zeigten, lässt sich schließen, dass die beiden Zelllinien entgegen obiger Vorbehalte für weitere Experimente eingesetzt und dabei eventuell festzustellende Unterschiede durch die An- bzw. Abwesenheit von Ccr5 erklärt werden können. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse sollten alle Experimente im Vergleich an primären Peritoneal-Makrophagen durchgeführt werden. Bei Subzelllinien, die während der Kultur auf Zellkulturschalen die Expression von CD11b an der Zelloberfläche vollständig verloren hatten, konnte eine CD11b-Expression nicht reinduziert werden. Diese Subpopulationen sollten bei weiteren Versuchen nicht mehr eingesetzt werden.

## 5.9 Ausblick

Nach der Etablierung und Charakterisierung der MPL5-Zelllinie sowie der entsprechenden Ccr5-positiven MPL0-Kontrollzelllinie und dem Nachweis, dass es sich beide Male mit höchster Wahrscheinlichkeit um Makrophagen handelt, gilt es nun die Zelllinien in Versuchen einzusetzen.

In verschiedenen Studien hatten sich Hinweise ergeben, dass ein Fehlen des Chemokinrezeptors Ccr5 Auswirkungen auf das Genexpressionsprofil der Zellen haben könnte. So fiel beispielsweise in einer Studie zu Herztransplantaten eine verminderte Expression verschiedener Matrixmetalloproteinasen wie Mmp3, Mmp12 und Mmp13 auf. Diese verminderte Expression verschiedener Gene konnte allerdings nicht ausschließlich durch die reduzierte Infiltration der Transplantate mit T-Zellen und Makrophagen erklärt werden (Luckow et al., 2004).

Um verschiedene noch offene Fragen zu klären, sollen weitere Experimente an den Zelllinien durchgeführt werden; so können sie beispielsweise für Stimulationsexperimente und anschließend zur Bestimmung von Genexpressionsmustern mittels Ribonuklease-Protection-Assays (RPA) eingesetzt werden. Für diese Fragestellung und die geplanten Experimente eignen sich die beiden in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien besonders gut, da sie sich theoretisch nur durch die An- beziehungsweise Abwesenheit des Chemokinrezeptors Ccr5 unterscheiden. Alle bei diesen Versuchen auftretenden Unterschiede können somit als Effekt von Ccr5 gewertet werden.

Weiterhin ließ sich vor einigen Jahren bei Stimulationsexperimenten an Makrophagen mit Interferon-gamma (INF $\gamma$ ) eine gesteigerte Expression von MCP1/CCL2, MCP2/CCL8 und MCP3/CCL7 nachweisen (Mantovani, 1999). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es geplant, an den eigenen MPL5- und den MPL0-Makrophagen-Zelllinien ebenfalls Stimulationsexperimente durchzuführen. Dabei sind die Zelllinien zunächst mit RANTES/Ccl5, einem wichtigen Liganden des Chemokinrezeptors Ccr5, zu stimulieren. In der Folge sollen zum einen Unterschiede zwischen beiden Zelllinien aufgezeigt, zum anderen aber die Genexpression in den stimulierten Zellen mit dem Genexpressionsmuster von unstimulierten Zellen verglichen werden. Darüber hinaus können die Zellen auch mit eher unspezifischen Stimuli wie LPS oder INF $\gamma$  behandelt werden.

Die beiden Zelllinien könnten in Zukunft dazu dienen, genauere Erkenntnisse über die Rolle des Chemokinrezeptors Ccr5 bei funktionellen Aufgaben von Makrophagen zu gewinnen. So wäre zum Beispiel eine sehr einfache Durchführung von Chemotaxis-Assays mit unterschiedlichen chemotaktisch wirksamen Cytokinen möglich. Auch eignen sich die Makrophagen-Zelllinien zur Klärung der Rolle von Ccr5 bei der Phagozytose von Bakterien. Weitere Phagozytoseassays mit anderen Bakterienspezies sind geplant; beispielsweise könnten die Zelllinien für Versuche mit *Yersinia pestis*-Bakterien eingesetzt werden. In *in-vitro*-Experimenten an primären Makrophagen aus Peritoneallavage wiesen die Ccr5-positiven Makrophagen deutlich bessere Phagozytoseeigenschaften als Makrophagen aus Ccr5-negativen Tieren auf (Elvin et al., 2004). Wie bereits in der Einleitung ausführlich geschildert, stellt sich in obigem Zusammenhang immer wieder die Frage, warum die CCR5 $\Delta$ 32-Mutation in der weißen Bevölkerung kaukasischen Ursprungs so häufig anzutreffen ist. Man spekuliert, dass möglicherweise bei einer der großen Seuchen der vergangenen Jahrhunderte wie beispielsweise Pest oder Pocken diese Mutation für ihre Träger einen Selektionsvorteil darstellte. Somit könnte der Einsatz beider Zelllinien bei Phagozytoseassays mit *Yersinia pestis* oder Pockenviren entscheidend zur Klärung dieser Frage beitragen.

Mit der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode, immortale Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs durch Ausschalten des Tumorsuppressorgen p53 zu generieren, sollte es möglich sein, weitere Zelllinien zu etablieren. So wurden in unserem Labor bereits Zellen aus Knochenmark und Leukozyten aus Blut (PBMC) Ccr5-negativer und Ccr5-positiver Mäuse isoliert und über einige Wochen hinweg kultiviert. In ersten durchflusszytometrischen Analysen zeigten sich die Zellen positiv für verschiedene Leukozytenmarker. Auf diesem Weg wäre es beispielsweise möglich Ccr5-negative T-Zelllinien und dazu korrespondierende Ccr5-positive Kontroll-Zelllinien zu etablieren. Des Weiteren wurde damit begonnen, Makrophagen aus Ccr1/p53-negativen Mäusen durch Peritoneallavage zu isolieren. Nun soll versucht werden,

---

permanente Ccr1-negative Makrophagen-Zelllinien zu etablieren und ihr Verhalten mit MPL0- und MPL5-Zellen zu vergleichen. Zusätzlich ist geplant, aus den in unserem Labor durch Kreuzung hergestellten Ccr1/Ccr5-defizienten Mäusen durch Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53 Ccr1/Ccr5-defiziente Makrophagen-Zelllinien zu generieren.



## 6 Zusammenfassung

Der Chemokinrezeptor CCR5 spielt bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen eine entscheidende Rolle. Da die pathophysiologischen Mechanismen beim Menschen und der Maus sehr ähnlich zu sein scheinen, wurde eine Vielzahl von Mausmodellen entwickelt, um diese Mechanismen besser zu verstehen. Man hofft, dass in Zukunft die damit gewonnenen Erkenntnisse gegebenenfalls auch therapeutisch eingesetzt werden können.

Makrophagen sind Zellen des angeborenen Immunsystems und somit Teil der primären Immunantwort. Des Weiteren stellen Makrophagen eine stark CCR5-exprimierende Zellpopulation dar. Bei Versuchen an Ccr5-defizienten Mäusen lassen sich immer nur kombinierte, durch die Ccr5-Defizienz in allen Ccr5-exprimierenden Geweben verursachte Effekte beobachten. Um die genaue Rolle des Chemokinrezeptors Ccr5 bei Entzündungsprozessen zu klären, erschien es sinnvoll, eine Ccr5-defiziente Makrophagen-Zelllinie zu etablieren. Dabei handelt es sich um eine homogene Zellpopulation, an der sich die genaue Funktion von Ccr5 besser studieren lässt. Ein weiterer Vorteil einer Zelllinie besteht in der leichten Handhabbarkeit der Zellen bei der Kultivierung. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es daher eine Ccr5-negative Makrophagen-Zelllinie und eine entsprechende Ccr5-positive „Kontroll-Zelllinie“ herzustellen.

Die Immortalisierung der neu etablierten Zelllinien erfolgte durch Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53. Da eine derartige Vorhergehensweise bei Makrophagen bisher nicht angewandt worden war, blieb zunächst unklar, ob sich die Makrophagen-Zelllinien auf diese Art und Weise tatsächlich etablieren ließen.

Zur Herstellung der Zelllinien mussten zuerst Ccr5<sup>-/-</sup>- mit p53<sup>-/-</sup>-Mäusen gekreuzt werden. Die daraus resultierenden Ccr5<sup>+/-</sup>/p53<sup>+/-</sup>-Mäuse wurden dann abermals miteinander verpaart. Durch Genotypisierung mittels Polymeraseketterreaktion konnten dann die Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäuse identifiziert werden. Nach intraperitonealer Injektion einer Thioglykolat-Lösung entwickelten die Tiere eine sterile Peritonitis. Durch Peritoneallavage konnten die eingewanderten Leukozyten, bei denen es sich zum überwiegenden Teil um Makrophagen handelte, gewonnen werden. Eine geeignete Ccr5-positive „Kontroll-Zelllinie“ ließ sich auf dieselbe Art und Weise aus p53<sup>-/-</sup>-Mäusen isolieren. Die so gewonnen Primärzellen wurden anschließend in Kultur genommen; durch Langzeitkultivierung und serielle Verdünnung konnten in der Tat permanente Zelllinien etabliert werden. Dabei entstanden sowohl aus der Ccr5-positiven als auch den Ccr5-

negativen Zelllinien mehrere Subzelllinien, die für die anschließende Charakterisierung der Zellen verwendet wurden.

Da es sich bei den Ccr5-negativen MPL5- und den Ccr5-positiven MPL0-Makrophagen-Zelllinien um vollständig neue Zelllinien handelte, mussten zunächst optimale Kulturbedingungen etabliert werden. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Zellen am besten auf unbehandelten mikrobiologischen Schalen unter Verwendung von RPMI-Medium und Zusatz von 10 % FCS entwickelten und einen differenzierten, für Makrophagen typischen Phänotyp aufwiesen.

Erste Charakterisierungen der Zelllinien erfolgten über die Methode der Durchflusszytometrie. Dabei zeigten sowohl die MPL5- als auch die MPL0-Zellen nach kontinuierlicher Kultivierung auf mikrobiologischen Schalen eine starke Expression der bei murinen Makrophagen üblicherweise nachweisbaren Oberflächenproteine CD45, CD11b und F4/80. In beiden Zelllinien konnte die Expression von Lysozym, einem für Makrophagen typischen Enzym, auf RNA-Ebene durch RT-PCR nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte die Expression der Chemokinrezeptoren Ccr1 und Ccr2 auf die gleiche Weise gezeigt werden. Die Ccr5-positiven MPL0-Zellen exprimierten zusätzlich Ccr5. Abschließend wurde bei beiden Zelllinien über einen funktionellen Test die Fähigkeit zur Phagozytose von Bakterien überprüft. Dabei wiesen sowohl die MPL0- als auch die MPL5-Zelllinien exzellente Phagozytose-Eigenschaften auf.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit besteht in der Tat die Möglichkeit, durch Ausschalten des Tumorsuppressorgens p53, immortalisierte Makrophagen-Zelllinien zu generieren. Aufgrund der Charakterisierung der neu etablierten MPL0- und MPL5-Zelllinien handelt es sich dabei mit großer Sicherheit um Makrophagen-Zelllinien. Diese Zelllinien stehen nun für weitere Versuche bereit, um die genaue Funktion des Chemokinrezeptors Ccr5 in Makrophagen und seine Rolle bei Entzündungsreaktionen zu klären.

## 7 Literaturverzeichnis

Adami C, Brunda MJ, Palleroni AV (1993) In vivo immortalization of murine peritoneal macrophages: a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines. *J Leukoc Biol* 53:475-478.

Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.

Ajuebor MN, Aspinall AI, Zhou F, Le T, Yang Y, Urbanski SJ, Sidobre S, Kronenberg M, Hogaboam CM, Swain MG (2005) Lack of chemokine receptor CCR5 promotes murine fulminant liver failure by preventing the apoptosis of activated CD1d-restricted NKT cells. *J Immunol* 174:8027-8037.

Alberts B, Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, Roberts, M.K., Walter, P. (2001) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*: WILEY-VCH.

Aliberti J, Reis e Sousa C, Schito M, Hieny S, Wells T, Huffnagle GB, Sher A (2000) CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nat Immunol* 1:83-87.

Anders HJ, Frink M, Linde Y, Banas B, Wörnle M, Cohen CD, Vielhauer V, Nelson PJ, Gröne HJ, Schlöndorff D (2003) CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J Immunol* 170:5658-5666.

Austyn JM, Gordon S (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11:805-815.

Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Montovani A, Matsushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K (2001) Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Leukoc Biol* 70:465-466.

Baggiolini M, Moser B, Clark-Lewis I (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture. *Chest* 105:95S-98S.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15:675-705.

Banas B, Luckow B, Möller M, Klier C, Nelson PJ, Schadde E, Brigl M, Halevy D, Holthofer H, Reinhart B, Schlöndorff D (1999) Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. *J Am Soc Nephrol* 10:2314-2322.

Belnoue E, Kayibanda M, Deschemin JC, Viguiet M, Mack M, Kuziel WA, Renia L (2003) CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood* 101:4253-4259.

Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T (1997) HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* 3:252-253.

Blanpain C, Libert F, Vassart G, Parmentier M (2002) CCR5 and HIV infection. *Receptors Channels* 8:19-31.

Braunersreuther V, Zerneck A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Burger F, Pelli G, Luckow B, Mach F, Weber C (2007) Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:373-379.

Brühl H, Wagner K, Kellner H, Schattenkirchner M, Schlöndorff D, Mack M (2001) Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. *Clin Exp Immunol* 126:551-559.

Bruinink A, Tobler U, Halg M, Grunert J (2004) Effects of serum and serum heat-inactivation on human bone derived osteoblast progenitor cells. *J Mater Sci Mater Med* 15:497-501.

Charo IF, Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610-621.

Chirido FG, Millington OR, Beacock-Sharp H, Mowat AM (2005) Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *Eur J Immunol* 35:1831-1840.

Coligan JE, Bierer, B. E., Margulies, D. H., Shevach, E. M., Strober, W. (2006) *Current Protocols in Immunology*: WILEY-VCH.

Cross M, Mangelsdorf I, Wedel A, Renkawitz R (1988) Mouse lysozyme M gene: isolation, characterization, and expression studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6232-6236.

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ (1996) Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273:1856-1862.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr., Butel JS, Bradley A (1992) Mice deficient for *p53* are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356:215-221.

Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors *CKR-5*, *CKR-3*, and *CKR-2b* as fusion cofactors. *Cell* 85:1149-1158.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor *CC-CKR-5*. *Nature* 381:667-673.

Drevets DA, Canono BP, Leenen PJ, Campbell PA (1994) Gentamicin kills intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 62:2222-2228.

Duan RS, Chen Z, Bao L, Quezada HC, Nennesmo I, Winblad B, Zhu J (2004) *CCR5* deficiency does not prevent P0 peptide 180-199 immunized mice from experimental autoimmune neuritis. *Neurobiol Dis* 16:630-637.

Dybedal I, Larsen S, Jacobsen SE (1995) IL-12 directly enhances in vitro murine erythropoiesis in combination with IL-4 and stem cell factor. *J Immunol* 154:4950-4955.

Ehlich A, Martin V, Muller W, Rajewsky K (1994) Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells. *Curr Biol* 4:573-583.

Eis V, Luckow B, Vielhauer V, Siveke JT, Linde Y, Segerer S, Perez de Lema G, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Horuk R, Murphy PM, Gao JL, Hudkins KL, Alpers CE, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ (2004) Chemokine receptor *CCR1* but not *CCR5* mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 15:337-347.

Elvin SJ, Williamson ED, Scott JC, Smith JN, Perez de Lema G, Chilla S, Clapham P, Pfeffer K, Schlöndorff D, Luckow B (2004) Evolutionary genetics: Ambiguous role of *CCR5* in *Y. pestis* infection. *Nature* 430:417.

- Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T (2000) Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 96:719-726.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996) HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877.
- Fischereder M, Luckow B, Hoher B, Wüthrich RP, Rothenpieler U, Schneeberger H, Panzer U, Stahl RA, Hauser IA, Budde K, Neumayer H, Krämer BK, Land W, Schlöndorff D (2001) CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival. *Lancet* 357:1758-1761.
- Freshney RI (1994) *Culture of animal cells*, Third edition Edition. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Garred P, Madsen HO, Petersen J, Marquart H, Hansen TM, Freiesleben Sorensen S, Volck B, Svejgaard A, Andersen V (1998) CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 25:1462-1465.
- Gerard C, Rollins BJ (2001) Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2:108-115.
- Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L, Strosberg AD (2001) Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 175:81-92.
- Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE (1998) The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* 76:231-248.
- Glass WG, Liu MT, Kuziel WA, Lane TE (2001) Reduced macrophage infiltration and demyelination in mice lacking the chemokine receptor CCR5 following infection with a neurotropic coronavirus. *Virology* 288:8-17.
- Gomez-Reino JJ, Pablos JL, Carreira PE, Santiago B, Serrano L, Vicario JL, Balsa A, Figueroa M, de Juan MD (1999) Association of rheumatoid arthritis with a functional chemokine receptor, CCR5. *Arthritis Rheum* 42:989-992.
- Gomm JJ, Browne PJ, Coope RC, Liu QY, Buluwela L, Coombes RC (1995) Isolation of pure populations of epithelial and myoepithelial cells from the normal human mammary gland using immunomagnetic separation with Dynabeads. *Anal Biochem* 226:91-99.
- Gordon JR, Li F, Nayyar A, Xiang J, Zhang X (2005) CD8{alpha}+, but Not CD8{alpha}-, Dendritic Cells Tolerize Th2 Responses via Contact-Dependent and -Independent Mechanisms, and Reverse Airway Hyperresponsiveness, Th2, and Eosinophil Responses in a Mouse Model of Asthma. *J Immunol* 175:1516-1522.

- Gu L, Findley HW, Zhou M (2002) MDM2 induces NF-kappaB/p65 expression transcriptionally through Sp1-binding sites: a novel, p53-independent role of MDM2 in doxorubicin resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99:3367-3375.
- Gu L, Zhu N, Findley HW, Woods WG, Zhou M (2004) Identification and characterization of the IKKalpha promoter: positive and negative regulation by ETS-1 and p53, respectively. *J Biol Chem* 279:52141-52149.
- Hanna Z, Rebai N, Poudrier J, Jolicoeur P (2001) Distinct regulatory elements are required for faithful expression of human CD4 in T cells, macrophages, and dendritic cells of transgenic mice. *Blood* 98:2275-2278.
- Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM (1996) Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4:407-414.
- Hibi K, Mitomi H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Okayasu I (1997) Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Pathol* 108:26-34.
- Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253:49-53.
- Huffnagle GB, McNeil LK, McDonald RA, Murphy JW, Toews GB, Maeda N, Kuziel WA (1999) Cutting edge: Role of C-C chemokine receptor 5 in organ-specific and innate immunity to *Cryptococcus neoformans*. *J Immunol* 163:4642-4646.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2001) *Immunobiology*, 5th edition Edition: Garland Publishing, New York.
- John E. Coligan BEB, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober (2005) *Current protocols in Immunology*: John Wiley & Sons, Inc.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW (2002) NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer* 2:301-310.
- Kaufmann A, Salentin R, Gemsa D, Sprenger H (2001) Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages. *J Leukoc Biol* 69:248-252.
- Keller G (1992) Hematopoietic stem cells. *Curr Opin Immunol* 4:133-139.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266:2011-2015.

Komarova EA, Krivokrysenko V, Wang K, Neznanov N, Chernov MV, Komarov PG, Brennan ML, Golovkina TV, Rokhlin OW, Kuprash DV, Nedospasov SA, Hazen SL, Feinstein E, Gudkov AV (2005) p53 is a suppressor of inflammatory response in mice. *Faseb J* 19:1030-1032.

Krop I, de Fougerolles AR, Hardy RR, Allison M, Schlissel MS, Fearon DT (1996) Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19. *Eur J Immunol* 26:238-242.

Lagasse E, Weissman IL (1996) Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197:139-150.

Lang SM, Heinzlmann M, Stratakis DF, Teschauer W, Loeschke K (1997) Detection of Ki-ras mutations by PCR and differential hybridization and of p53 mutations by SSCP analysis in endoscopically obtained lavage solution from patients with long-standing ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 92:2166-2170.

Leenen PJ, de Bruijn MF, Voerman JS, Campbell PA, van Ewijk W (1994) Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 174:5-19.

Leibo SP, Mazur P (1971) The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology* 8:447-452.

Leon B, Martinez del Hoyo G, Parrillas V, Vargas HH, Sanchez-Mateos P, Longo N, Lopez-Bravo M, Ardavin C (2004) Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. *Blood* 103:2668-2676.

Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, de la Rua C, Ferrari M, Ferrec C, Glover G, Grinde B, Guran S, Kucinskas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G (1998) The *deltacr5* mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet* 7:399-406.

Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T, Ding Y, Santavirta S, Ceponis A, Lopez-Otin C (1997) Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) in human rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 40:1391-1399.

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-377.

Lovelock JE, Bishop MW (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183:1394-1395.

Luckow B, Joergensen J, Chilla S, Li JP, Henger A, Kiss E, Wieczorek G, Roth L, Hartmann N, Hoffmann R, Kretzler M, Nelson PJ, Perez de Lema G, Maier H, Wurst W, Balling R, Pfeffer K, Gröne HJ, Schlöndorff D, Zerwes HG (2004) Reduced intragraft mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp3, Mmp12, Mmp13 and Adam8, and diminished transplant arteriosclerosis in Ccr5-deficient mice. *Eur J Immunol* 34:2568-2578.

Luster AD (1998) Chemokines - chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338:436-445.

Mack M, Brühl H, Gruber R, Jaeger C, Cihak J, Eiter V, Plachy J, Stangassinger M, Uhlig K, Schattenkirchner M, Schlöndorff D (1999) Predominance of mononuclear cells expressing the chemokine receptor CCR5 in synovial effusions of patients with different forms of arthritis. *Arthritis Rheum* 42:981-988.

Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AE, Plachy J, Brühl H, Frink M, Anders HJ, Vielhauer V, Pfirstinger J, Stangassinger M, Schlöndorff D (2001) Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol* 166:4697-4704.

Manfredi JJ, Prives C (1994) The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1198:65-83.

Mantovani A (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 20:254-257.

Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB (1997) Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 16:100-103.

Matsuura K, Ishida T, Setoguchi M, Higuchi Y, Akizuki S, Yamamoto S (1994) Upregulation of mouse CD14 expression in Kupffer cells by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 179:1671-1676.

Mauel J, Defendi V (1971) Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40. *J Exp Med* 134:335-350.

Mecsas J, Franklin G, Kuziel WA, Brubaker RR, Falkow S, Mosier DE (2004) Evolutionary genetics: CCR5 mutation and plague protection. *Nature* 427:606.

Metz T, Harris AW, Adams JM (1995) Absence of p53 allows direct immortalization of hematopoietic cells by the myc and raf oncogenes. *Cell* 82:29-36.

- Minuth WW, Kloth S, Aigner J, Sittinger M, Rockl W (1996) Approach to an organo-typical environment for cultured cells and tissues. *Biotechniques* 20:498-501.
- Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967) Culture of normal human leukocytes. *Jama* 199:519-524.
- Morgan C, Pollard JW, Stanley ER (1987) Isolation and characterization of a cloned growth factor dependent macrophage cell line, BAC1.2F5. *J Cell Physiol* 130:420-427.
- Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, Hamada H, Asakura H, Ishikawa H, Matsushima K (2003) Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 4:154-160.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145-176.
- Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A (2003) Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online* 5:197-203.
- Okuda Y, Okuda M, Bernard CC (2003) Regulatory role of p53 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 135:29-37.
- Patel L, Charlton SJ, Chambers JK, Macphee CH (2001) Expression and functional analysis of chemokine receptors in human peripheral blood leukocyte populations. *Cytokine* 14:27-36.
- Pegg DE (2002) The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med* 20:5-13.
- Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D (2001) Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 12:1369-1382.
- Randle DH, Zindy F, Sherr CJ, Roussel MF (2001) Differential effects of p19(Arf) and p16(Ink4a) loss on senescence of murine bone marrow-derived preB cells and macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9654-9659.
- Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem* 254:2669-2676.

Rot A, von Andrian UH (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22:891-928.

Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1996a) Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35:3362-3367.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyltermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M (1996b) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-725.

Santini SM, Lapenta C, Logozzi M, Parlato S, Spada M, Di Pucchio T, Belardelli F (2000) Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* 191:1777-1788.

Schwarzbaum S, Halpern R, Diamond B (1984) The generation of macrophage-like cell lines by transfection with SV40 origin defective DNA. *J Immunol* 132:1158-1162.

Seeger S, Nelson PJ, Schlöndorff D (2000) Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11:152-176.

Shahrara S, Proudfoot AE, Woods JM, Ruth JH, Amin MA, Park CC, Haas CS, Pope RM, Haines GK, Zha YY, Koch AE (2005) Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES. *Arthritis Rheum* 52:1907-1919.

Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M (1998) Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 62:1507-1515.

Strauss M, Griffin BE (1990) Cellular immortalization--an essential step or merely a risk factor in DNA virus-induced transformation? *Cancer Cells* 2:360-365.

Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ (2004) Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172:4410-4417.

- Swanson JA, Hoppe AD (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 76:1093-1103.
- Tchilian EZ, Dawes R, Hyland L, Montoya M, Le Bon A, Borrow P, Hou S, Tough D, Beverley PC (2004) Altered CD45 isoform expression affects lymphocyte function in CD45 Tg mice. *Int Immunol* 16:1323-1332.
- Thomas ML (1989) The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* 7:339-369.
- Tokuyama H, Ueha S, Kurachi M, Matsushima K, Moriyasu F, Blumberg RS, Kakimi K (2005) The simultaneous blockade of chemokine receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 by a non-peptide chemokine receptor antagonist protects mice from dextran sodium sulfate-mediated colitis. *Int Immunol* 17:1023-1034.
- Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL (2000) Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290:2152-2154.
- Uphoff CC, Meyer C, Drexler HG (2002) Elimination of mycoplasma from leukemia-lymphoma cell lines using antibiotics. *Leukemia* 16:284-288.
- Varga G, Balkow S, Wild MK, Stadtbaeumer A, Krummen M, Rothoefl T, Higuchi T, Beissert S, Wethmar K, Scharffetter-Kochanek K, Vestweber D, Grabbe S (2006) Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DC is inhibitory for full T cell activation. *Blood*.
- Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839.
- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K (2000) CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164:2978-2986.
- Walz DA, Wu VY, de Lamo R, Dene H, McCoy LE (1977) Primary structure of human platelet factor 4. *Thromb Res* 11:893-898.
- Ward RL (1979) Destruction of bacterial viruses in serum by heat and radiation under conditions that sustain the ability of serum to support growth of cells in suspended culture. *J Clin Microbiol* 10:650-656.
- Woo RA, Poon RY (2004) Gene mutations and aneuploidy: the instability that causes cancer. *Cell Cycle* 3:1101-1103.

Wysocki CA, Burkett SB, Panoskaltsis-Mortari A, Kirby SL, Luster AD, McKinnon K, Blazar BR, Serody JS (2004) Differential roles for CCR5 expression on donor T cells during graft-versus-host disease based on pretransplant conditioning. *J Immunol* 173:845-854.

Yamamoto M, Tsukamoto T, Sakai H, Shirai N, Ohgaki H, Furihata C, Donehower LA, Yoshida K, Tatematsu M (2000) p53 knockout mice (-/-) are more susceptible than (+/-) or (+/+) mice to N-methyl-N-nitrosourea stomach carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:1891-1897.

Yamanishi Y, Boyle DL, Pinkoski MJ, Mahboubi A, Lin T, Han Z, Zvaifler NJ, Green DR, Firestein GS (2002) Regulation of joint destruction and inflammation by p53 in collagen-induced arthritis. *Am J Pathol* 160:123-130.

Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R (1998) Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 160:4018-4025.

Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ (1993) CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 14:121-125.

Zlotnik A, Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.



# Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserum-Albumin
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
°C	Grad Celcius
CCL	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i> (human)
Ccl	<i>chemokine (C-C motif) ligand</i> (murin)
CCR	<i>chemokine (C-C motif) receptor</i> (human)
Ccr	<i>chemokine (C-C motif) receptor</i> (murin)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
dGTP	Desoxy-Guanintriphosphat
dTTP	Desoxy-Tyrosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

---

FACS	<i>fluorescent associated cell sorter</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fötales Rinderserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Interferon-induzierendes Protein
HCl	Salzsäure
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
KCl	Kaliumchlorid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> -Medium
LPS	Lipopolysaccharid
MOPS	3-N-Morpholino-Propansulfonsäure
M	molar (mol/l)
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
M-CSF	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NF-κB	<i>nuclear factor- κB</i>
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxyd
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PS	Polystyrol
PCR	Polymerasekettenreaktion
RANTES	regulated on activation normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure

---

R-PE	R-Phycoerythrin
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute 1640-Medium</i>
SV40	Simian Virus 40
TBE	Tris-Borat-EDTA
u	units
VE-Wasser	voll-entsalztes Wasser



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **Generierung und Charakterisierung von Makrophagen-Zelllinien aus $Ccr5^{-/-}/p53^{-/-}$ - und $p53^{-/-}$ -Mäusen**

in der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik Innenstadt unter der Leitung von Herrn Professor Dr. D. Schlöndorff selbständig durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Zitierungen anderer wissenschaftlicher Arbeiten sind unter Angabe der Quelle als solche kenntlich gemacht.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation vorgelegt.

München, den 16. Mai 2007



## Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Detlef Schlöndorff, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik Innenstadt zu erstellen sowie für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Weiterhin darf ich mich an dieser Stelle bei Herrn Dr. Bruno Luckow für seine ausgezeichnete Betreuung und für die wertvolle Hilfe bei der Planung und Durchführung der Versuche bedanken. Auf Herrn Dr. Luckow geht das Thema meiner Arbeit zurück; er überließ mir die durch Peritoneallavage gewonnenen und in einer frühen Passage eingefrorenen MPL0- und MPL5-Zellen – ganz herzlichen Dank!

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Herrn Professor Dr. Wolfgang Siess, dem Sprecher des Graduiertenkollegs GRK 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft, für die Aufnahme und Förderung meiner Arbeit durch das GRK 438.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Guillermo Pérez de Lema für seine tatkräftige Unterstützung und Hilfe gerade zu Beginn meiner Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dipl.-Biol. Stefan Dehmel, der das Projekt nach Abschluss meiner Arbeiten übernommen hat.

Frau Silvia Chilla danke ich für ihre exzellente technische Unterstützung bei den Versuchen, insbesondere bei der Zellkultur, der Genotypisierung der Zelllinien mittels PCR und der Analyse der Genexpression durch RT-PCR.

Frau Alexandra Wechselberger bin ich für ihre Hilfe bei den durchflusszytometrischen Analysen der Zelllinien zu Dank verpflichtet.

Ganz herzlich danke ich an dieser Stelle allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, die durch das freundliche und hilfsbereite Miteinander zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.



# Lebenslauf

Marie-Christine Elisabeth Becker

geb. am 15. September 1981 in Marburg/Lahn

Eltern: Prof. Dr. Gerd und Dr. Elisabeth Becker

## Schulbildung

August 1987 bis Juni 2000  
Grundschule Stuttgart-Vaihingen  
Fanny-Leicht-Gymnasium, Abitur in Stuttgart-Vaihingen

## Hochschulbildung

Studium der Humanmedizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Oktober 2000 bis September 2002  
Vorklinischer Studienabschnitt und Physikprüfung  
Oktober 2002 bis August 2003  
Erster klinischer Studienabschnitt und erstes Staatsexamen  
Oktober 2003 bis März 2006  
Zweiter klinischer Studienabschnitt und zweites Staatsexamen  
April 2006 bis April 2007  
Praktisches Jahr und drittes Staatsexamen  
Abschluss des Studiums am 24. April 2007

## Praktisches Jahr (PJ)

Chirurgie am Stadtpital Waid, Zürich, Schweiz  
Innere Medizin in der Medizinischen Klinik III am Klinikum  
Großhadern, LMU München  
Anästhesie und Intensivmedizin in der Klinik für Anästhesiologie  
am Klinikum Großhadern, LMU München

## Dissertation

September 2003  
Beginn der experimentellen Arbeiten für die Dissertation zum  
Thema „Etablierung und Charakterisierung von Makrophagen-  
Zelllinien aus p53<sup>-/-</sup>- und Ccr5<sup>-/-</sup>/p53<sup>-/-</sup>-Mäusen“  
Dezember 2003 bis April 2005  
Doktorandenstipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs  
GRK 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“  
März 2005  
Teilnahme am 3. Symposium des Graduiertenkollegs GRK 438  
„Vaskuläre Biologie in der Medizin“ in Herrsching/Ammersee





