

Praktikum Immunologie

Praktikumshandbuch

Analyse der Proliferation alloreaktiver T-Zellen in Abhängigkeit vom Reifungsstatus dendritischer Zellen

Organisation:

Dr. rer. nat. Verena K. Raker
Abteilung für Experimentelle
und Translationale Immun Dermatologie

rakerv@uni-mainz.de

März 2017

Proliferationstest

Für den Test am Freitag 03.03.2017 (9:30-12 Uhr) werden 6 Gruppen mit 5 Studenten gebildet.

Die Durchführung des Tests erfolgt in der Hautklinik: Klinikgelände, Geb. 401

Treffpunkt: 9:00 Uhr Hautklinik Bibliothek, kurze Einführung zum Praktikum.

Ein Telefon befindet sich am Eingang zu den Laboratorien im 1. Stock.

Telefonnummern der Laboratorien: 2297, 2947, 4284, 4526

Bemerkung: Kittel und festes Schuhwerk sind Pflicht!

Die Betreuung erfolgt durch folgende Mitarbeiter:

- Gr. 1 Verena Raker
- Gr. 2 Matthias Domogalla
- Gr. 3 Janine Schlöder
- Gr. 4 Robert Ose
- Gr. 5 Jonathan Schupp/Franziska Krebs
- Gr. 6 Iris Bellinghausen/Anja Schermann

Zur Messung der T-Zellfunktion in vitro stehen verschiedene Testsysteme zur Verfügung: für zytotoxische T-Zellen z.B. die Messung der Zielzelllyse im ^{51}Cr -Release Assay; für Helfer- bzw. Suppressor-T-Zellen kann deren Einfluss auf die Aktivierung von antikörperproduzierenden Zellen in Kokulturen mit B-Zellen, mit anschließendem Plaque-Test gemessen werden.

Ein weiteres Testsystem ist der Proliferationstest. Gemessen wird hierbei die Zellteilungsrate von T-Zellen auf bestimmte Stimuli, z.B. allogenen Zellen (mixed lymphocyte reaction, MLR) definierte Antigene, Mitogene wie Concanavalin A (ConA) und Phytohämagglutinin (PHA) oder physiologische Wachstumsfaktoren wie Interleukin-2 (IL-2). Zwar wird hier die Funktion (Hilfe, Suppression, Zytotoxizität) der T-Zellen außer Acht gelassen, jedoch ist der Test wegen der Einfachheit der technischen Durchführung und der Genauigkeit der Messung zu einem wichtigen Instrument in der immunologischen Forschung geworden. Der Nachweis der Proliferation erfolgt kalorimetrisch (XTT-Assay).

Für den Test werden folgende zelluläre Komponenten benötigt:

T-Zellen (TC): Als Quelle dienen humane CD4^+ Zellen aus dem humanen peripheren Blut. Die T-Zellen werden mit Hilfe von immunomagnetischen Partikeln (anti- CD4 Antikörper, gekoppelt an magnetische Partikel) in einem Magnetfeld aus aufgereinigten PBMC (periphere mononukleäre Zellen des Blutes) isoliert.

Antigenpräsentierende Zellen (APC): Als Quelle dienen humane dendritische Zellen (DC) unterschiedlicher Reifungsstadien. Die DC wurden aus Blutmonozyten in vitro generiert. Die gereinigten Monozyten des Blutes wurden für 7 Tage mit den Wachstumsfaktoren GM-CSF (Granulozyten-Monozyten Colonie-stimulierender Faktor) und IL-4 (Interleukin-4) stimuliert.

Diese Kultur führt zur Differenzierung der Monozyten in unreife DC (uDC). Ein Teil der iDC wird ab Tag 5 terminal differenziert durch die Zugabe eines Reifungscocktails aus:

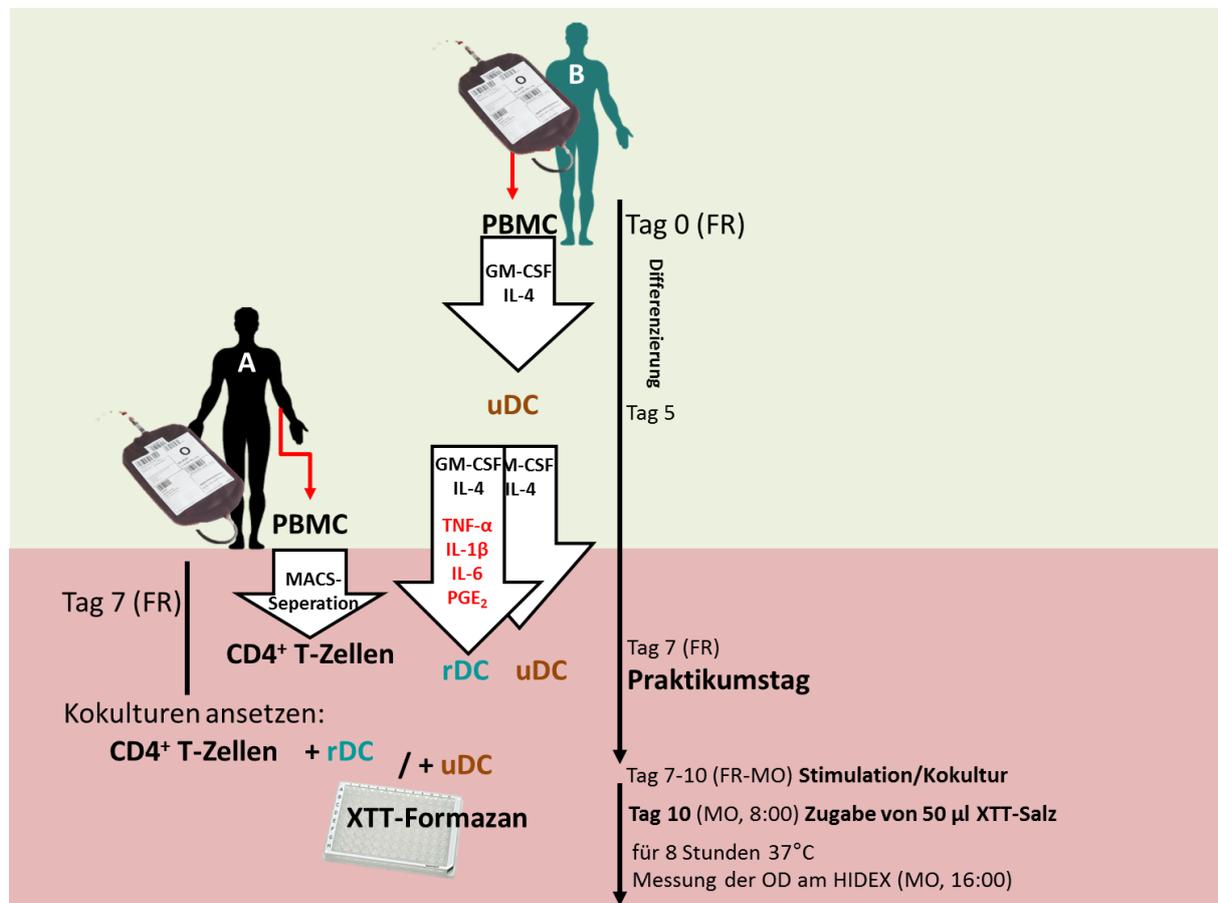
Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α)
 Interleukin-1 Beta (IL-1 β)
 Interleukin-6 (IL-6)
 und Prostaglandin E2 (PGE₂)

Unter diesen Bedingungen erhält man an Tag 7 der Kulturzeit reife DC (rDC).

Antigen: Die Antigenspezifitäten humaner CD4⁺ T-Zellen von freiwilligen Spendern sind nicht bekannt. Wenn man die Proliferation dieser T-Zellen trotzdem antigenspezifisch *in vitro* testen will, stimuliert man die T-Zellen on Spender A mit APC eines Spenders B (allogene MLR). Als allogene APC sollen in unserem Assay uDC und rDC eines Spenders B eingesetzt werden. Durch die Alloreaktivität der CD4⁺T-Zellen sind die eingesetzten DC in diesem Testsystem sowohl APC als auch Antigen.

Ziel des Assays ist es, die stimulatorische Kapazität von uDC und rDC vergleichend zu testen. Der „read out“ in diesem Assay ist die Proliferation der alloreaktiven CD4⁺ T-Zellen von Spender A.

Abb. 1: Versuchsablauf



Durchführung:

Die Gruppen a 5 Personen arbeiten in 2 Untergruppen
(PBMC gewinnen/DC ernten bzw. TC isolieren)

Kulturbedien:

Serumfreies X-VIVO 15 (dieses Medium hat den Vorteil, dass es keine Fremd-Antigene enthält, die von humanen T-Zellen erkannt werden können. D.h. die zu messenden Proliferation der T-Zellen ist alleine auf den allogenen Stimulus zurückzuführen.)

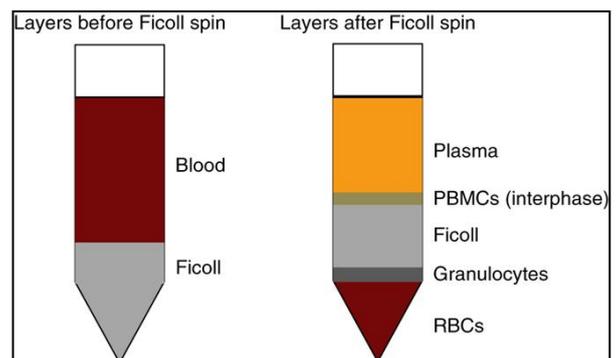
Reagenzien:

- Ficoll (Fa. PAA #J15-004) RT
- PBS (Fa. Gibco #14190 DPBS)
- PBS Eigenherstellung
- MACS Puffer (1x PBS + 0,5% HSA + 3mM EDTA)
- CD4 microBEADS
- 96 well Platte (Flachboden)

A) Aufarbeitung der CD4⁺ T-Zellen :

PBMC-Gewinnung: Überschichten einer Ficollösung mit Blutkonzentrat
-> **Dichte-Gradientenzentrifugation** des Blutkonzentrats zur Gewinnung der PBMC

PBMC befinden sich in der Interphase, Granulozyten und Erythrozyten im Zellsediment.



Durchführung:

1. 15 ml Ficoll / Falcon Tube vorlegen (4 Stück pro Buffy Coat)
2. Blut (Buffy Coat) in 150 ml Becherglas vorlegen und auf 120 ml mit PBS (Fa. Gibco) auffüllen, leicht schwenken=mischen
3. Blutgemisch vorsichtig überschichten (Pipetus auf „min“ und „ex“ stellen), ca. 40-50 ml/ Falcon Tube Gesamtvolumen (jeder Teilnehmer eins, wenn möglich)
4. 30 min. mit 1500 UpM bei RT „ohne Bremse“ zentrifugieren.
Tubes vorsichtig aus Zentrifuge nehmen,
Zentrifuge gleich wieder auf 4°Grad runterkühlen und Bremse einschalten!
Dauert ca. 45 min
5. Gewinnen der PBMCs: Interphase abnehmen: Interphase vorsichtig abziehen und in Falcon Tube überführen, auf 50 ml mit kaltem PBS auffüllen.
6. Zentrifugieren: 10 min., 1500 rpm bei 4° =1. Waschen
7. Überstand dekantieren, alle Pellets vereinigen und auf 50 ml PBS wieder auffüllen, Waschen solange wiederholen bis der Überstand klar ist.
8. Zellzahlbestimmung:
Zellen resuspendieren, Verdünnung mit Trypanblau 1:2 (10µl Zellsuspension und 10µl Trypanblaulsg.).

Die Zellzahl wird in einem der 4 großen äußeren Quadrate (bestehend aus 16 Einzelquadraten) einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

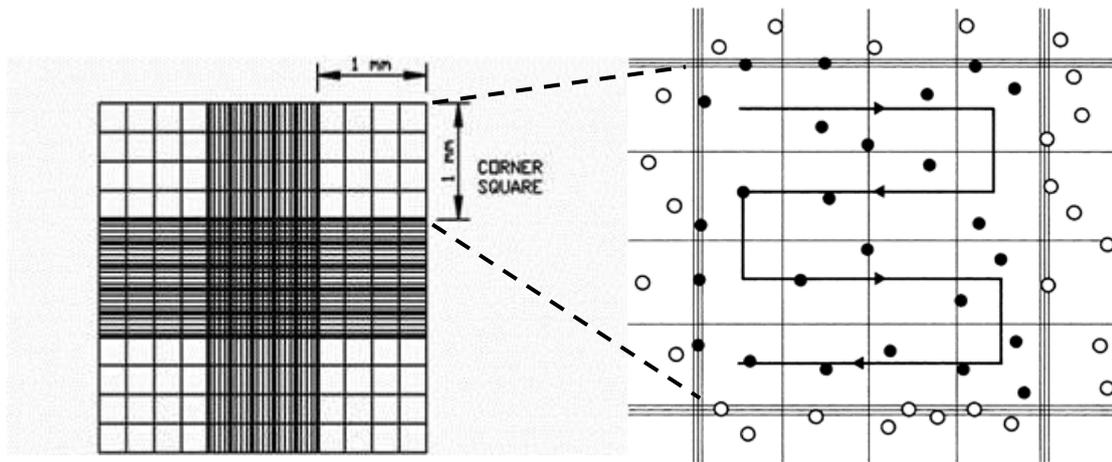


Abb. 3: Tiefe der Kammer: 0,1 mm, Fläche eines Großquadrats: 1mm², Kammerkonstante: 10⁴

Gesamtzellzahl= „gezählt“ x Verdünnung x Volumen der Suspension (ml) x Kammerfaktor (10⁴)

Gesamtzellzahl: _____ 2x10⁷ Zellen entspricht µl: _____

Immunomagnetische Separation von CD4⁺ T-Zellen

Schritte:

- 1.) Markierung der 2x10⁷ PBMC mit CD4-gekoppelten Mikrobeads (Miltenyi)
- 2.) Isolation von CD4⁺ T-Zellen (im Magnetfeld)
- 2.) Eluieren der CD4⁺ T-Zellen aus der Säule (außerhalb des Magnetfeldes)

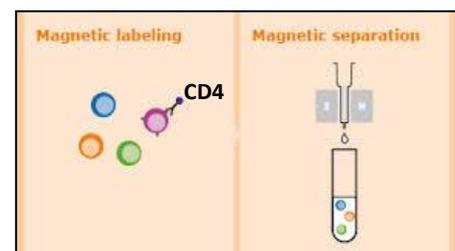
T-Zellanreicherung mit MACS-System

Alle Schritte auf Eis !! zügig arbeiten!!

LS-Säulenvorbereitung:

Becherglas mit MACS-Puffer füllen, Säule eintauchen und mit Stempel Puffer aufziehen und in Flüssigkeit zurückstellen.

MACS-Puffer: 4°, immer wieder kühl stellen.



1. 2x10⁷ PBMC entnehmen mit 5 ml MACS-Puffer waschen und zentrifugieren. Überstand verwerfen
2. **Zellen in 32 µl MACS-Puffer** aufnehmen und gut resuspendieren.
3. **8 µl humane CD4-Beads/ 2x10⁷ Zellen** hinzugeben, gut resuspendieren.
4. für 15 min. bei 4°C (auf Eis und Zeit relativ exakt einhalten) inkubieren.
5. Säule vorbereiten: evt. Luftblasen mit 500 µl MACS-Puffer entfernen.
Säule in Magneten einspannen
6. Zellen auffüllen auf 30 ml MACS-Puffer, zentrifugieren cave: **1200rpm , 10min., 4°C** (sonst könnten sich Teile der Beads lösen!)
7. Pellet in 2ml MACS-Puffer aufnehmen, gut resuspendieren und auf Säule geben und komplett durchlaufen lassen

8. Durchlauf nochmal über Säule geben.
Dann Säulen 2x 2 ml MACS-Puffer spülen (Negativfraktion im Sammeltube- >Abfall)
9. Säulen aus Magneten entfernen und in frisches 15 ml Tube stellen
10. 3 ml kalten MACS-Puffer auf die Säule geben mit Stempel durchdrücken/eluieren,
11. Zellsuspension auf 50 ml mit PBS auffüllen, abzentrifugieren 1500rpm, 10 min.
4°C, absaugen
12. Pellet mit PBS resuspendieren , zählen, zentrifugieren und in entsprechendem Medium und Volumen aufnehmen.
> Kulturansatz

B) Gewinnung der dendritischen Zellen (uDC, rDC, wurden vorbereitet):

- Gradientenzentrifugation zur Gewinnung der PBMC.
- PBMC in RPMI +1% Plasma aufnehmen und in eine 6-well Platte geben:
- **Adhärenz:** Kulturplatten bei 37°C und 5% CO² mindestens 45 Min. inkubieren.
- Anmerkung: während dieser Zeit setzten sich die Monozyten im well ab und binden an der Plattenboden (**Plastikadhärenz ist ein Charakteristikum von Monozyten!**)
- Nach erfolgreicher Adhärenz (Sichtkontrolle im Mikroskop) werden die nicht-adhärenen Zellen (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen) mit PBS abgespült bis ausschließlich Monozyten im well verbleiben (Sichtkontrolle im Mikroskop).
- Zugabe von X-VIVO 15 mit 1,5% Plasma, 1000 U/ml IL-4, 200 U/ml GM-CSF und Inkubation bei 37°C und 5% CO².
- Die Zellen werden an Tag 3 mit X-VIVO 15 + 1,5% Plasma, 100 U /ml IL-4 und 200 U/ml GM-CSF gefüttert.

Für die Differenzierung reife dendritische Zellen (rDC):

DC wurden an Tag 5 geerntet, gezählt und 1×10^6 Zellen pro well (6-well Platte) mit X-VIVO15 + 1,5% Plasma, 1000 U/ml IL-4, 200 U/ml GM-CSF und Reifungscocktail ausgereift.

Reifungscocktail: 10 µg/ml TNF-α, 10 µg/ml IL-1β, 1000 U/ml IL-6, 1 µg/ml PGE₂

Für unreife dendritische Zellen (uDC):

uDC wurden an Tag 5 gefüttert: X-VIVO 15+ 1,5% Plasma, 1000 U/ml IL-4, 200 U/ml GM-CS

Am Praktikumstag (Tag 7 der DC Kultur) werden die ausdifferenzierten DC geerntet:

Kulturplatte mit rDC und uDC im Mikroskop anschauen.

Wie unterscheiden sich uDC und rDC? Größe, Morphologie, Dendriten...

Ernten der DCs:

- Platte 10 Min auf Eis stellen
- Abspülen der DCs mit dem Medium
- Überführen in je 1 frisches 50 ml Tube
- mit kaltem PBS nachspülen
(Kontrolle im Mikroskop wieviel noch anhaftet, evt. wiederholen)
- DC Populationen zählen

Zellausbeuten für den Kulturansatz:

uDC:

rDC:

CD4⁺ T-Zellen:

!! Bitte Zellsuspensionen bei 4°C lagern, da uDC bei RT an die Innenwand adhären und dadurch verloren gehen können!!

Einstellen der Zellsuspensionen:

T-Zellen: 2×10^6 TC/ml

DCs: 1×10^6 DC/ml

Durchführung des Proliferationstests:

	uDC+TC			rDC+TC									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
5x10 ⁴ DC/well	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2,5x10 ⁴ DC/well	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
1,25x10 ⁴ DC/well	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,61x10 ⁴ DC/well	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Blank	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 4: Bitte Pipettierschema beachten und Plattendeckel entsprechend beschriften!

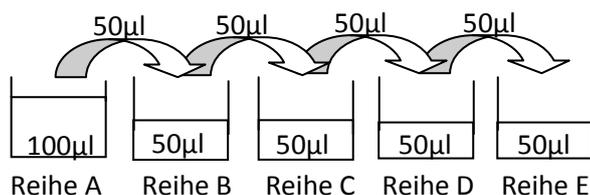
Titration der DC-Populationen:

Reihe A: wells A1-3: jeweils 100 µl uDC-Suspension pipettieren

Reihe A: wells A4-6: jeweils 100 µl rDC-Suspension pipettieren

Reihe B-D: wells A1-6: jeweils 50 µl X-VIVO15 vorlegen,

anschließend 50 µl der DC-Suspension aus Reihe A in B übertragen, resuspendieren, 50 µl aus B in C übertragen, resuspendieren, etc. Vorgang bis Reihe E wiederholen (1:2 Titrationsreihe = Verdünnungsreihe).



Alle Proben werden in Dreifachbestimmung angesetzt, wobei das Endvolumen in allen wells 100 µl beträgt. Blank nicht vergessen! Sollten die Zellzahlen nicht ausreichen:
Duplikate ansetzen oder Zellzahlen entsprechend halbieren.

Zugabe der CD4⁺T-Zellen:

Reihen A-D, wells 1-6: jeweils 50µl der CD4⁺ T-Zellsuspension (1×10^5) pipettieren.

Kontrollen:

A) CD4⁺ T-Zellen alleine

Reihe A, well 7-9: 50µl X-VIVO15 und 50µl der CD4⁺ T-Zellsuspension pipettieren.

B) uDC alleine

Reihe B, well 7-9: 50µl X-VIVO15 und 50µl der uDC-Zellsuspension pipettieren.

C) rDC alleine

Reihe C, well 7-9: 50 µl X-VIVO15 und 50µl der rDC-Zellsuspension pipettieren.

D) Blank

Reihe D, 100 µl Medium als Leerwert (Blank), well 7-9

Optische Beurteilung des Tests:

Die Kulturen werden für mindestens 3 Tage bei 37°C inkubiert und mikroskopisch beurteilt. Aktivierte/proliferierende T-Zellen können optisch von nicht-aktivierten/ruhenden T-Zellen unterschieden werden. Bei positiver Sichtkontrolle (unverkeimt) werden die Testsätze für weitere 8 Stunden mit dem Zusatz von 50 µl XTT-Tetrazoliumsalz kultiviert.

Zugabe von XTT Tetrazoliumsalz (50 µl/well) am Montag um 8:00 Uhr.

Messen der Platten am Montag.

Treffpunkt Kaffeeraum.

Gruppe 1/2: 16:10 Uhr; Gruppe 3/4: 16:20 Uhr, Gruppe 5/6: 16:30 Uhr

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die optische Dichte der Proben mit dem HIDEX sense bestimmt.

Auswertung:

Von je 3 zusammenhängenden Werten wird der Mittelwert vom Photometer ausgegeben. Diese Werte werden auf eventuelle „Ausreißer“ überprüft und den Testsätzen zugeordnet. Aus dem Ergebnis soll geschlossen werden, wie sich die Proliferation der alloreaktiven T-Zellen in Abhängigkeit vom Reifungsstatus (uDC vs. rDC) und dem Verhältnis TC zu APC verhält.

Die Mittelwerte aus den Triplikaten werden in einem Diagramm dargestellt. Siehe Handout!
x-Achse: DC-Zellzahl, y-Achse: counts per minute (cpm).