

Protokoll Versuch 4:

Analyse der T- und B-Lymphozytendifferenzierung in verschiedenen knockout-Mäusen

Gruppe 4 (Susanne Duncker, Kristin Hofmann)

Einleitung

Wir isolierten Knochenmarks-, Thymus- und Milzzellen aus vier verschiedenen Mausstämmen, um sie mittels FACS-Analyse auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker zu untersuchen.

Material und Methoden

Das verwendete Material und die angewandten Methoden können dem ausgeteilten Skript entnommen werden. Änderungen wurden protokolliert.

Versuchsdurchführung

Zunächst isolierten wir gemäß der Anleitung im Skript Knochenmarks-, Thymus- und Milzzellen aus einer Wildtypmaus (C57Bl/6) und zählten die Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer aus. Unsere Extrakte enthielten folgende Zellmengen:

Organ	Konzentration	Gesamtvolumen
Thymus	1×10^7 Zellen / ml	10 ml
Milz	$8,7 \times 10^6$ Zellen / ml	10 ml
Knochenmark	$5,4 \times 10^6$ Zellen / ml	2 ml

Tabelle 1: aus Organen einer Wildtypmaus isolierte Zellmengen

Mit den isolierten Zellen führten wir eine Immunfluoreszenzfärbung gemäß der Anleitung im Skript (s. Abb. 1) durch.

Färbeprotokoll:

Nummer	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Organ:	KM	KM	Thymus	Milz	Milz	Milz
Antikörper mix 1:	- (Negativ-kontrolle)	B220-F IgM-PE	TCR beta -bio	- (Negativ-kontrolle)	TCR beta -bio	B220-F IgM-PE
Antikörper mix 2:	-	-	CD8-F CD4-PE Strep-Cychr	-	CD8-F CD4-PE Strep-Cychr	-

Abbildung 1: das für die Immunfluoreszenzfärbung eingesetzte Färbeprotokoll

Hierbei stellte Probe 1 die Negativkontrolle dar, Knochenmarkszellen ohne jegliche Immunfluoreszenzfärbung, Probe 2 färbte die im Knochenmark enthaltenen B-Zellen (B-Zell-Rezeptor (BCR) grün, IgM rot), Probe 3 färbte die T-Zellen aus dem Thymus (T-Zell-Rezeptor (TCR) mit Strep-Cychr, CD8 grün, CD4 rot), Probe 4 stellte eine erneute Negativkontrolle mit ungefärbten Milzzellen dar, Probe 5 färbte die T-Zellen aus der Milz (TCR über Strep-Cychr, CD8 grün, CD4 rot) und Probe 6 die B-Zellen aus der Milz (BCR grün, IgM rot). Zusätzlich zu den vorgegebenen Proben 1 bis 6 bereiteten wir noch zwei weitere Proben vor, Probe 7 mit 100.000 Zellen aus der positiven Fraktion von Versuch 2 mit 25 µl B220-FITC (grüne Färbung

des BCR) und Probe 8 mit $1,5 \times 10^6$ Zellen aus der negativen Fraktion von Versuch 2 mit $25 \mu\text{l}$ B220-FITC (grüne Färbung des BCR).

Wir verwendeten je $1,35 \times 10^6$ Knochenmarkszellen, $1,5 \times 10^6$ Thymuszellen und je $1,5 \times 10^6$ Milzzellen. Der erste Färbeschritt wurde nach der Anleitung im Skript durchgeführt (s. Abb. 1). Nach dem ersten Färbeschritt befanden sich die Proben vor der 30minütigen Inkubation noch fünf Minuten außerhalb des Kühlschranks im Licht, was die Fluoreszensintensität beeinträchtigt haben könnte.

Der zweite Färbeschritt sowie die Fixierung der Proben wurden nach Skript durchgeführt (s. Abb. 1), die Messung erfolgte mit einem FACS-Gerät (FACSCalibur). Die Auswertung wurde von uns am Computer durchgeführt.

Ergebnis

Die Originalausdrucke der Auswertung befinden sich im Anhang.

T-Zellen aus der Milz (Probe 5)

Das erste Bild zeigt einen dot plot der Probe der T-Zellen aus der Milz, forward gegen side scatter aufgetragen, sowie das von uns für die Auswertung gesetzte gate. Das Bild darunter zeigt die Werte des gates, FITC-Färbung (CD8⁺-T-Zellen) gegen PE-Färbung (CD4⁺-T-Zellen). Das Gate R2 zeigt die doppelt negativen T-Zellen (DN-T-Zellen), R3 die CD8⁺-T-Zellen, R4 die CD4⁺-T-Zellen, daneben die Auswertung der Häufigkeitsverteilung: 78,7 % aller T-Zellen in der Milz sind demnach DN-T-Zellen, nur 2,91 % CD8⁺-T-Zellen und 16,64 % CD4⁺-T-Zellen. Um zu verifizieren, dass es sich bei den Zellen in den gates um T-Zellen handelt, wurden die gates R2, R3 und R4 noch in ein Histogramm überführt, in dem die Zellzahl gegen die TCR-beta-bio-Färbung, die die T-Zell-Rezeptoren (TCR) färbt.

Die DN-T-Zellen zeigen, wie erwartet, größtenteils eine nur sehr schwache TCR-Expression, bei den CD8⁺-T-Zellen sind nahezu alle TCR-Häufigkeiten vorhanden und bei den CD4⁺-T-Zellen haben die meisten Zellen viele TCR auf ihrer Oberfläche.

B-Zellen aus der Milz (Probe 6)

In der Milz findet die letzte Reifung der unreifen B-Zellen zu reifen B-Zellen statt. Das linke obere Bild zeigt wieder das von uns verwendete gate. Im dot plot darunter, bei dem FITC-Färbung (BCR) gegen PE-Färbung (IgM) aufgetragen ist, sieht man, dass die Zellen entweder weder den B-Zell-Rezeptor (BCR) noch IgM exprimieren (gate R2), also noch unreif sind, oder beides exprimieren (gate R3), also bereits gereift sind, wobei in der Milz nahezu gleich viele Zellen beider Arten vorhanden sind.

B-Zellen aus dem Knochenmark (Proben 2, 7 und 8)

Auch hier wurden im dot plot wieder FITC (BCR) gegen PE (IgM) aufgetragen. Die meisten Zellen (37,56 % in R2) sind wieder doppelt negativ, wie für das Knochenmark als Ort der B-Zell-Reifung auch zu erwarten war, einige (15,43 % in R3) exprimieren nur den BCR, nicht IgM, und 26,21 % aller Zellen sind sowohl für BCR als auch für IgM positiv (R4). In gate R5 befinden sich Zellen, die ungewöhnlich viel BCR exprimieren, aber ca. so viel IgM wie die Zellen in R4.

Das zweite Bild von unten zeigt unsere positive Fraktion aus der MACS-Aufreinigung – man sieht, dass so gut wie alle Zellen den B-Zell-Rezeptor exprimieren, also B-Zellen sind – die MACS-Aufreinigung war also sehr erfolgreich.

Das unterste Bild zeigt unsere negative Fraktion aus der MACS-Aufreinigung – es ist offensichtlich, dass bei der Aufreinigung auch viele B-Zellen (R3, 29,92 %) beim Auswaschen der Säule verloren gingen.

T-Zellen aus dem Thymus (Probe 3)

Im Thymus, wo die T-Zellen reifen, findet man hauptsächlich doppelt positive T-Zellen (DP-T-Zellen), wie die Auswertung zeigt: in gate R2, wo die DN-T-Zellen abgebildet werden, befinden sich nur 3,45 % aller Zellen, in gate R3, in dem nur die FITC-gefärbten CD8⁺-T-Zellen

dargestellt werden, sind nur 2,3 % der Zellen, PE-gefärbt und damit CD4⁺-Zellen in gate R4 sind nur 6,9 % der Zellen. DP-T-Zellen in gate R6 hingegen sind 87,36 % aller analysierten T-Zellen. Um die Expression des TCR mittels TCR-beta-bio zu überprüfen, wurden von gate R2, R3, R4 und R6 noch Histogramme angefertigt. Die DN-T-Zellen in R2 zeigen, genau wie die CD8⁺-T-Zellen in R3, schwache Expressionsraten des TCR. Die CD4⁺-T-Zellen in R4 zeigen bereits eine leicht erhöhte TCR-Expression, und die DP-T-Zellen in R6 exprimieren den TCR sehr deutlich.