

Makrophagen sind mononukleäre Leukozyten, die in der frühen Phase der Immunreaktion eine große Rolle spielen. Sie fungieren hierbei sowohl als Antigen-präsentierende als auch als Effektorzellen. Man findet Makrophagen u.a. im Bindegewebe, in der Leber, der Lunge und in der Milz. Wie auch andere Zellen des Immunsystems tragen Makrophagen auf ihrer Oberfläche verschiedene Rezeptormoleküle, mit denen sie Antigene pathogener Organismen erkennen können. Dazu gehören Moleküle der CD (*clusters of*

Magnetisierte Monozyten

Isolation, Mikroinjektion und Stimulation primärer humaner Monozyten und Makrophagen

Barbara Schell und Stefan Linder

Institut für Kreislaufkrankheiten, Pettenkoferstr. 9, D-80336 München



Barbara Schell ist Diplom-Biologin und arbeitet derzeit als Doktorandin am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München.

bschell@klp.med.uni-muenchen.de

differentiation)-Gruppe wie z.B. CD14, der Rezeptor für bakterielles Lipopolysaccharid (LPS). Der jeweilige Besatz der Zelloberfläche mit verschiedenen CD-Molekülen ist typisch für verschiedene Zellarten des Immunsystems und liefert auch die Basis für deren Aufreini-

auch die Monozyten) in einer deutlich erkennbaren Schicht an (Abb.1). Diese Schicht wird abpipettiert und zur weiteren Aufreinigung mit Magnetbeads inkubiert, die mit monoklonalen anti-human CD14-Antikörpern konjugiert sind (Miltenyi Biotech GmbH). Dadurch werden Zellen, die CD14 auf ihrer Oberfläche tragen (CD14⁺-Zellen), spezifisch markiert. Da v.a. Monozyten und Makrophagen eine starke Expression von CD14 aufweisen, andere Zellen wie Neutrophile aber nur wenig oder kein CD14 auf der Zelloberfläche tragen, werden durch diese Methode monozytäre Zellen angereichert. Wird die Zellsuspension

ausgesät.

Das Kulturmedium (RPMI 1640; PAA Laboratories GmbH) ist so gewählt, daß nur Monozyten überleben und in 5-7 Tagen zu Makrophagen ausdifferenzieren. Diese Entwicklung läßt sich sowohl im Lichtmikroskop als auch mit Hilfe von Fluoreszenz-Färbungen morphologisch nachvollziehen. Frisch ausgesäte Zellen sind klein (ca. 5-10 µm Durchmesser) und unregelmäßig geformt (Abb. 3). Podosomen, punktartige, Aktin-reiche Adhäsionsstrukturen monozytärer Zellen (1), bilden sich ca. 4-6 Stunden nach dem Aussäen und sind zunächst gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 3).

zunächst über eine *MiniMACS*-Säule (Miltenyi Biotech GmbH) gegeben, die in einen Magneten eingespannt ist, werden die magnetisch markierten Zellen zurückgehalten, während die unmarkierten durchfließen. Nach einem Waschschrift werden schließlich die CD14⁺-Zellen ohne Magnet eluiert (Abb.2). Die so aufgereinigten Monozyten (typischerweise ca. 90% der isolierten Zellen) werden in einer Neuenbauer Zählkammer gezählt und auf Coverslips



Stefan Linder, Dr. rer. nat., ist Diplom-Biologe und derzeit Assistent am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München.

stefan.linder@klp.med.uni-muenchen.de

Abkürzungen

- CD: Clusters of differentiation
- F-Aktin: Filamentöses Aktin
- fMLF: Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
- LPS: Lipopolysaccharid
- PBS: Phosphate-buffered saline solution

● Isolation

Prinzip: Primäre humane Monozyten werden aus peripherem Blut isoliert. Die Reinigung erfolgt in zwei Schritten: 1) Abtrennung der mononukleären Zellen und 2) Anreicherung der Monozyten. Zunächst werden die Blutbestandteile im Ficoll-Gradienten (Ficoll Separating Solution, Biochrom KG) nach ihrer Dichte aufgetrennt. Dabei sammeln sich die mononukleären Zellen (u.a.

Ficoll-Gradient

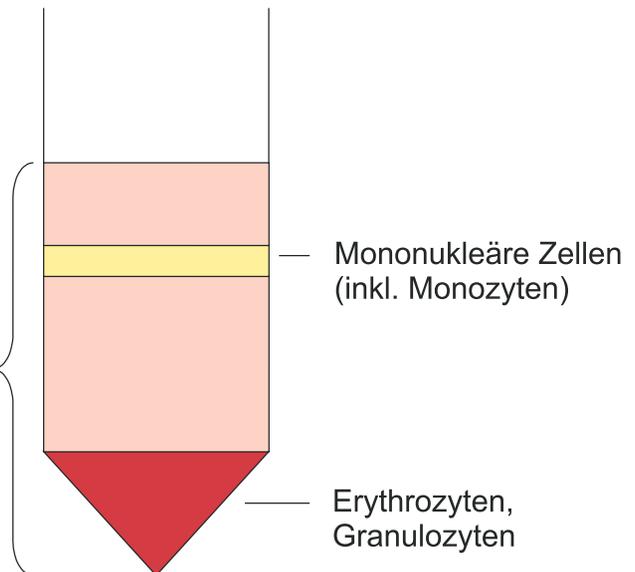


Abbildung 1: Auftrennung der Blutbestandteile im Ficoll-Gradienten. Im Ficoll-Gradienten erfolgt die Auftrennung der Blutbestandteile nach ihrer Dichte. Während z. B. Erythrozyten und Granulozyten (rot) pelletieren, sammeln sich die mononukleären Zellen (also auch Monozyten) in einer deutlich erkennbaren Zwischenschicht (gelb) weiter oberhalb im Gradienten.

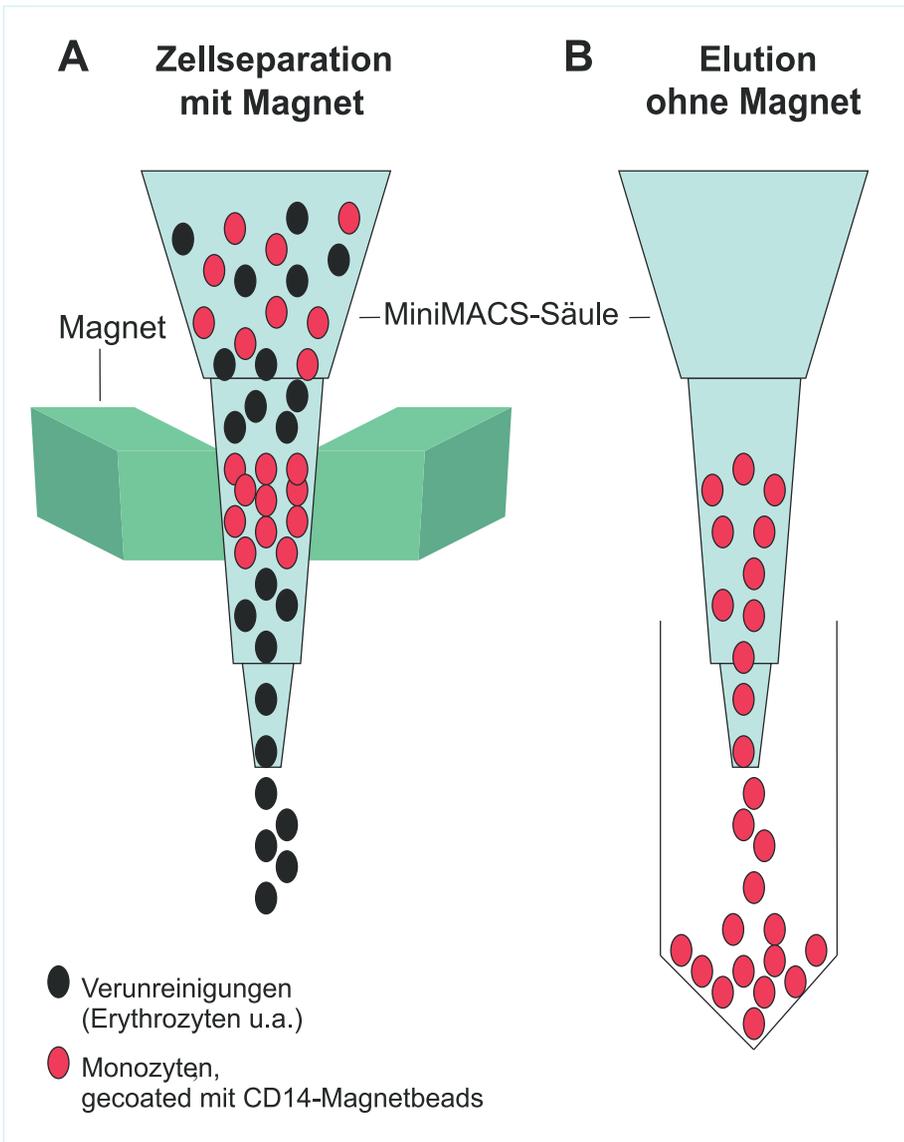


Abbildung 2: Aufreinigung der Monozyten über eine *MiniMACS*-Säule. Monozyten werden durch Inkubation mit anti-CD14-Magnetbeads spezifisch markiert. Wird das Gemisch aus mononukleären Zellen und Verunreinigungen über eine *MiniMACS*-Säule gegeben, die in einen Magneten (grün) eingespannt ist, fließen die unmarkierten Bestandteile (schwarz) durch die Säule durch, während die magnetisch markierten Monozyten (rot) zurückgehalten werden (A). Die Elution der Monozyten aus der Säule erfolgt ohne Magnet (B).

Probleme: Weichen ausdifferenzierte Zellen stark von der beschriebenen Morphologie ab, kann dies zwei Ursachen haben: 1) es handelt sich um Verunreinigungen oder 2) die Makrophagen wurden ungewollt stimuliert. Verunreinigende Zellen können gut identifiziert werden durch das Fehlen der für Makrophagen typischen Podosomen bzw. durch das Auftreten sogenannter Streßfasern, schnurgerader Bündel aus F-Aktin, die z. B. für Endothelzellen typisch sind, in Makrophagen aber nicht vorkommen. Handelt es sich bei den untypisch erscheinenden Zellen dagegen wirklich um Makrophagen, so sind sie wahrscheinlich unspezifisch stimuliert worden. Typische Anzeichen einer Stimulation sind Zell-Elongation und Filopodien-Bildung (2). Dies kann durch zu ruppige Behandlung bei der Isolation geschehen (starkes Auf- und Abpipettieren der Zellpellets, häufiger Kontakt mit Luftsauerstoff, unsanftes Eluieren von der Magnetsäule). Zudem reagieren Makrophagen empfindlich auf Luftkeime, die ins Medium gelangen, sowie auf bestimmte Chargen der

Ausdifferenzierte Makrophagen sind dagegen deutlich größer (ca. 30-50 µm Durchmesser) und radiärsymmetrisch. Die Podosomen finden sich hier vorwiegend in der Zellperipherie (Abb.3). Dabei ist zu beachten, daß die Ausgangs-

population der isolierten Monozyten sehr heterogen ist und daher sowohl Größe als auch Reifungsgrad individueller Zellen v.a. in den ersten Tagen der Kultur sehr unterschiedlich sein können.

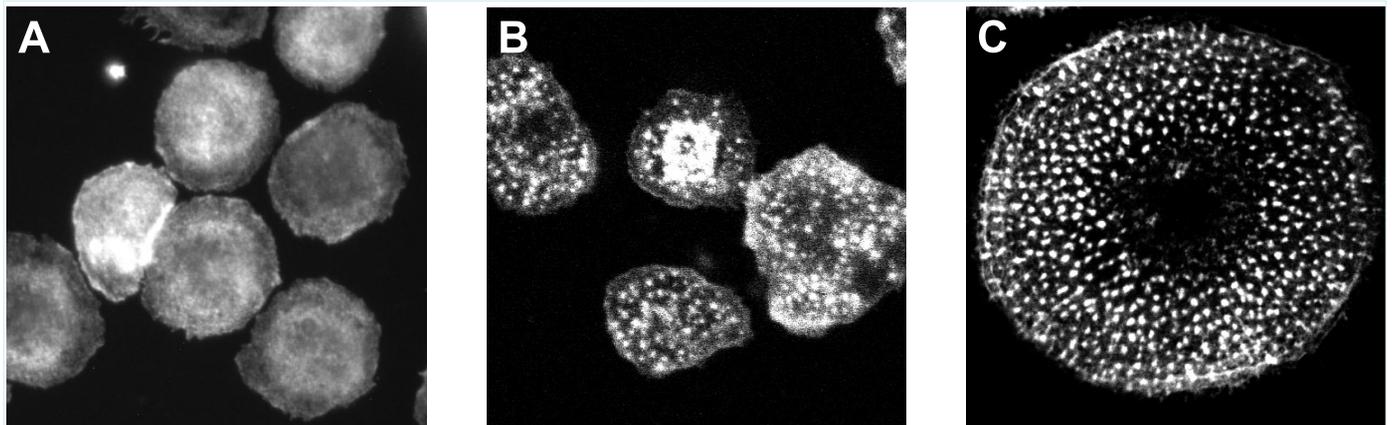


Abbildung 3: Entwicklungsstadien aufgereinigter Monozyten in Kultur. Frisch ausgesäte Makrophagen (A) sind klein und weisen nach 1 h noch keine Podosomen auf. Diese bilden sich erst nach ca. 4-6 h aus und sind nach einem Tag deutlich sichtbar (B). Ausdifferenzierte, unstimulierte Makrophagen (C) sind deutlich größer und radiärsymmetrisch. Während die Podosomen bei den jungen Monozyten noch über die gesamte Zelle verteilt sind, finden sie sich bei den ausdifferenzierten Makrophagen hauptsächlich in der Zellperipherie. Konfokalmikroskopische Aufnahmen, F-Aktin-Färbung mit Alexa 568-Phalloidin, Seitenlänge der Bilder: 50 µm.

Protokoll 1: MONOZYTENPRÄPARATION

- > Blut abnehmen mit 50 ml-Spritzen.
Pro 50 ml-Spritze 500 µl Heparin vorlegen.
- > Falcontube mit 15 ml Ficoll-Lösung vorbereiten,
vorsichtig mit 12,5 ml Blut überschichten (nicht mischen!).
Zentrifugation: 460 g, 30min, RT (hier ohne Bremse, da sonst der Gradient gestört wird).
Mononukleäre Zellen (Abb.1) abpipettieren,
jeweils 2 Samples poolen und auf 50 ml mit kaltem RPMI auffüllen.
Zentrifugation: 460 g, 10 min, 4°C.
- > Waschschrift: Pellets in kaltem RPMI resuspendieren (2 Samples poolen),
mit kaltem RPMI auf 50 ml auffüllen und wie unter 2.) zentrifugieren.
- > Waschschrift wiederholen, aber hier RPMI* (RPMI mit 100 µg/µl Penicillin/
Streptavidin) verwenden.
- > Pellets in je 1 ml kaltem RPMI* aufnehmen,
Zellsuspension in Eppendorfcups transferieren und
2 min bei 4°C, 400 g zentrifugieren.
- > Pellets mit je 400 µl Monopuffer (PBS, 5 mM EDTA pH 7,4, 0,5% humanes
Serumalbumin) resuspendieren,
100 µl Antikörperbeads zugeben, vorsichtig mischen (keine Luftblasen!),
15 min auf Eis inkubieren.
- > Säule mit 500 µl kaltem Monopuffer äquilibrieren und
50 ml Falcontube mit 15-20 ml kaltem RPMI* vorbereiten.
Zellsuspension auf die Säule geben.
Nach dem Durchlauf die Säule mit 500 µl Monopuffer waschen, danach mit 1 ml
Monopuffer schnell in das vorbereitete Falcontube eluieren.
Anschließend Zentrifugation: 10 min, 460 g, 4°C.
- > Überstand abkippen, Pellet in 0,5-2 ml RPMI* (je nach Zelldichte) aufnehmen und
in einer Neuenbauer Zählkammer zählen.
- > Zellen auf Coverslips aussäen (auf Cellocate Coverslips mit einer Dichte von
5x10⁴/Coverslip; auf eckige Coverslips (13,8 x 13,8 mm) die doppelte Menge).
Nach 1,5-2 h 1,5 ml Kulturmedium (RPMI* mit 20% autologem Serum)
hinzufügen.
Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultivieren.
Medium alle 3-4 Tage wechseln.

● **Mikroinjektion**

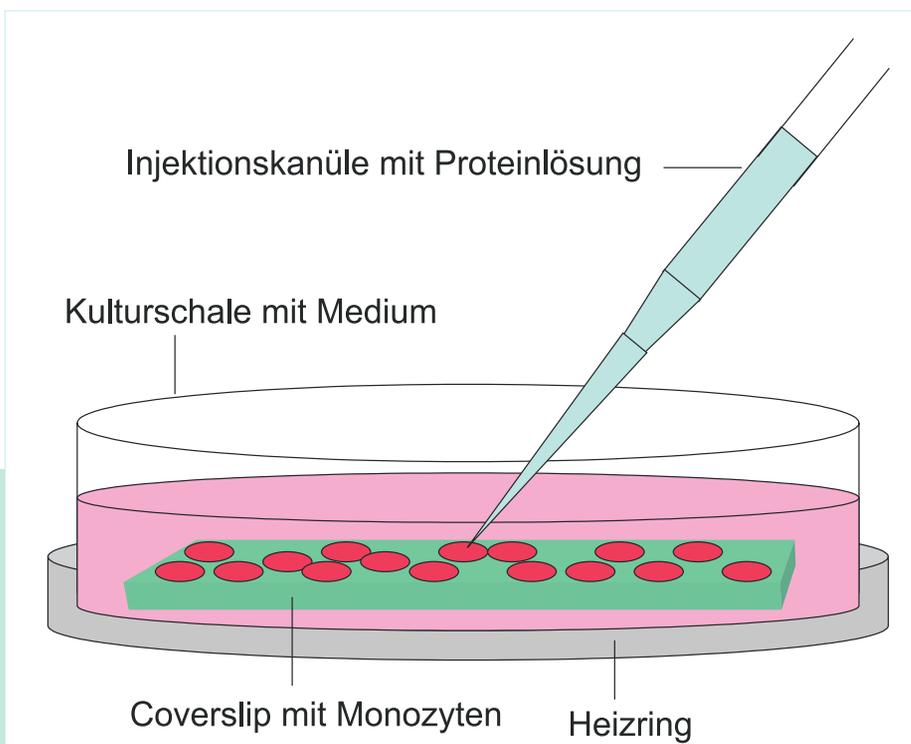
Hintergrund: Eine Mikroinjektionsanlage setzt sich aus einem Mikroskop mit angebautem Mikroinjektionsarm (z.B. Cell Biology Trading, Hamburg) und einem Transjektor (zur Druckerzeugung; Eppendorf) zusammen. In der moderneren Variante wird die Mikroinjektion Computer-unterstützt gesteuert und kann an einem Monitor verfolgt werden. Im Injektionsarm wird die mit Proteinlösung beladene Injektionskanüle eingespannt. Die Injektion selbst erfolgt durch einen Druckpuls, der vom Transjektor und über einen Schlauch an die Kanüle weitergegeben wird. Zunächst muß jedoch ein bestimmter Kompensations- oder Haltdruck gewährleistet sein, um den durch Kapillarkräfte hervorgerufenen Einstrom von Flüssigkeit aus dem Medium in die Kanüle zu verhindern. Der Haltdruck wird so gewählt, daß aus der Kapillare ein permanenter leichter Ausfluß gewährleistet ist. Der eigentliche Injektionsdruck muß nicht nur größer als der Haltdruck, sondern auch höher als der Innendruck der zu injizierenden Zelle sein.

Was ist zu beachten? Es ist essentiell, daß im Mikroskopisch ein (z.B. über ein Wasserbad) beheizbarer Ring eingebaut ist, in den die Zellkulturschale (mit den auf Coverslips ausgesäten Makrophagen) eingesetzt wird (Abb. 4). Dadurch ist gewährleistet, daß die

Coverslips, die Rückstände abgeben (hier hilft nur Austesten). Schließlich kommen noch Spender-abhängige Faktoren ins Spiel (Medikamente: vorher nachfragen, Streß, Rauchen etc.), die zu einer leichteren „Erregbarkeit“ der Zellen in Kultur führen können.

Sind diese versuchstechnischen Klippen umschifft, können die ausdifferenzierten, unstimulierten Makrophagen für nachfolgende Experimente wie z.B. Immunfluoreszenz-Färbungen (3), Mikroinjektion oder Stimulationsversuche eingesetzt werden.

Abbildung 4: Mikroinjektion einer Proteinlösung in Makrophagen. Ein Coverslip (grün) mit ausdifferenzierten Makrophagen (5-7 Tage Kultur; rot) wird in eine Zellkulturschale mit Medium (rosa) gegeben, das von außen beheizt wird. Nach computer-gestützter Einstellung der Injektionskanüle auf die Zellebene können einzelne Zellen gezielt injiziert werden (vgl. Protokoll).



Protokoll 2: MIKROINJEKTION

- > Proteinlösung mit MI-Puffer (50 mM TRIS pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) herstellen (Maximalkonz.: 10 µg/µl, da Lösung sonst zu viskos; oft genügen 0,2-0,5 µg/µl) und 1/10 Vol. Rat-IgG (Stock: 2 mg/ml) zugeben.
Zentrifugation: 30 min, 16000 g, 4°C
Der Zentrifugationsschritt ist zur Entfernung von Aggregaten unbedingt notwendig, da sonst die Kanüle verstopft.
- > Überstand in neues Eppendorfcup.
- > 3 µl Lösung in Femtotip (Eppendorf) füllen und ins Gewinde des Mikroinjektionsarms schrauben.
- > Kulturschale mit ca. 2-4 ml RPMI-Medium ohne Serum in Heizring einsetzen, Coverslip im Strahlengang positionieren (Gitternetzlinien im Sichtfeld), leicht andrücken.
- > Spitze der Injektionskanüle am Bildschirm auf Zellebene einstellen, Zellen mit Maus ansteuern und ca. 30-80 Zellen injizieren.
- > Injizierte Zellen 0,5-1 h bei 37°C nachinkubieren (mögliche Effekte brauchen Zeit, um sich zu entwickeln).
- > Entweder weitere Versuche durchführen (z.B. Stimulation) oder fixieren und färben (3).
- > Injizierte Zellen sind durch den koinjizierten Marker zu erkennen (FITC-Dextran: direkt detektierbar; Rat-IgG: Färbung mit FITC-gekoppeltem anti-Rat-Antikörper).

sein. Zu späteren Zeitpunkten wird die Zelloberfläche zäher, und die Zellen sind nur noch schwer injizierbar.

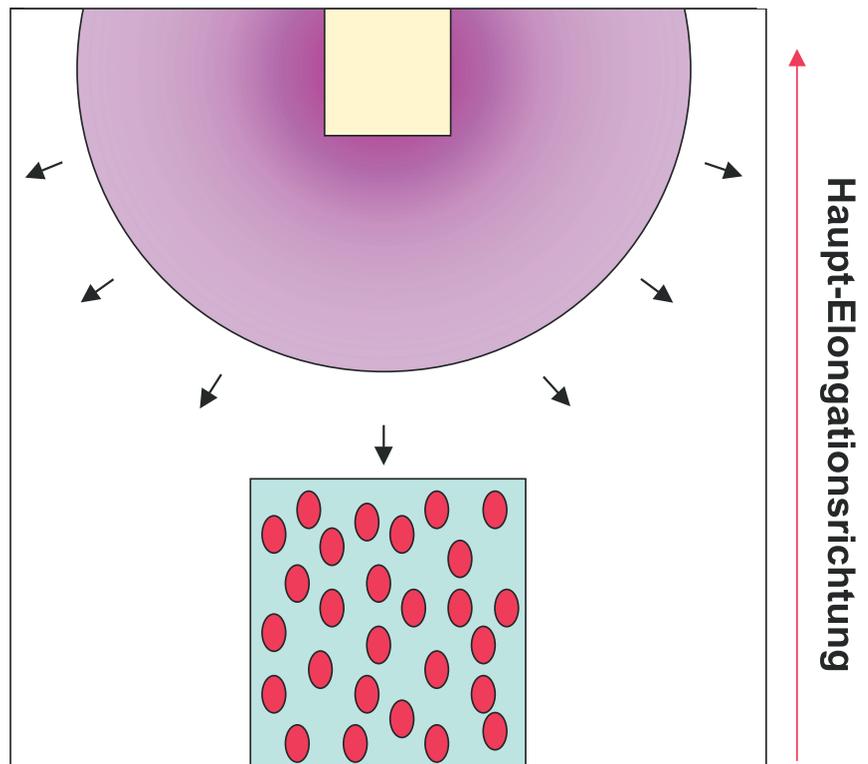
So wird's gemacht: Es ist hilfreich, die Monozyten zur Mikroinjektion auf Celloate Coverslips (Eppendorf) auszusäen. Das eingätzte Raster erleichtert dabei das Auffinden der injizierten Makrophagen. Die Coverslips werden in eine Zellkulturschale mit Medium (RPMI ohne Serum) gegeben, die in den Heizring (37°C) im Mikroskop eingesetzt wird. Die Injektionskanüle wird mit der gewünschten Proteinlösung (plus Markersubstanz, z.B. FITC-Dextran oder Rat-IgG) gefüllt und diese durch ruckartiges Schütteln in die Kanülenspitze befördert. Dabei ist es wichtig, ein Mindestvolumen an Lösung (ca. 3 µl) nicht zu unterschreiten, damit die Flüssigkeit nicht aufgrund von Adhäsionskräften an den Innenrändern der Nadel haften bleibt. Die Kanülenspitze wird mit Hilfe des Computers auf die Zellebene eingestellt. Per Mausklick werden die Zellen einzeln ange-

Zellen konstant bei 37°C gehalten werden. Bei tieferen Temperaturen ziehen sich Makrophagen bis zur Verkrampfung zusammen und lösen sich schließlich vom Untergrund ab.

Makrophagen sind im Gegensatz etwa zu Fibroblasten sehr voluminöse Zellen. Individuelle Makrophagen, die sich im Durchmesser um Faktor 2 unterscheiden, können daher im Volumen bis zu ca. Faktor 10 differieren. Allein diese Überlegung zeigt, daß die Mikroinjektion auf Einzelzell-Ebene nur qualitative und nicht quantitative Aussagen zuläßt. Zur Beurteilung des möglichen Effekts einer injizierten Substanz ist daher eine Statistik unabdingbar (Minimum: je 30-50 injizierte Zellen aus 3 unabhängigen Injektionen). Die injizierten Zellen müssen dabei das gleiche Alter in Kultur aufweisen, da sonst entwicklungsabhängige Faktoren

ins Spiel kommen! Makrophagen, die für Mikroinjektionen vorgesehen sind, sollten zudem nicht älter als 5-7 Tage

Kulturschale von oben



- Agarblock mit Stimulus
- Coverslip mit Monozyten
- Chemoattraktiver Gradient

Abbildung 5: Stimulation von Makrophagen in einem chemoattraktiven Gradienten. Ein Agarblock (gelb), der eine chemoattraktive Substanz enthält, wird in eine Zellkulturschale gegeben, in der sich auf einem Coverslip (blau) kultivierte Makrophagen (rot) befinden. Vom Agarblock ausgehend bildet sich durch Diffusion ein chemoattraktiver Gradient (violett) über die gesamte Kulturschale aus. Die Makrophagen werden durch Kontakt mit dem Gradienten stimuliert und prägen die typischen Merkmale wie Elongation, Umverteilung der Podosomen und Filopodien aus (2). Die Zellen richten sich dabei zumeist auf die Quelle des Gradienten hin aus.

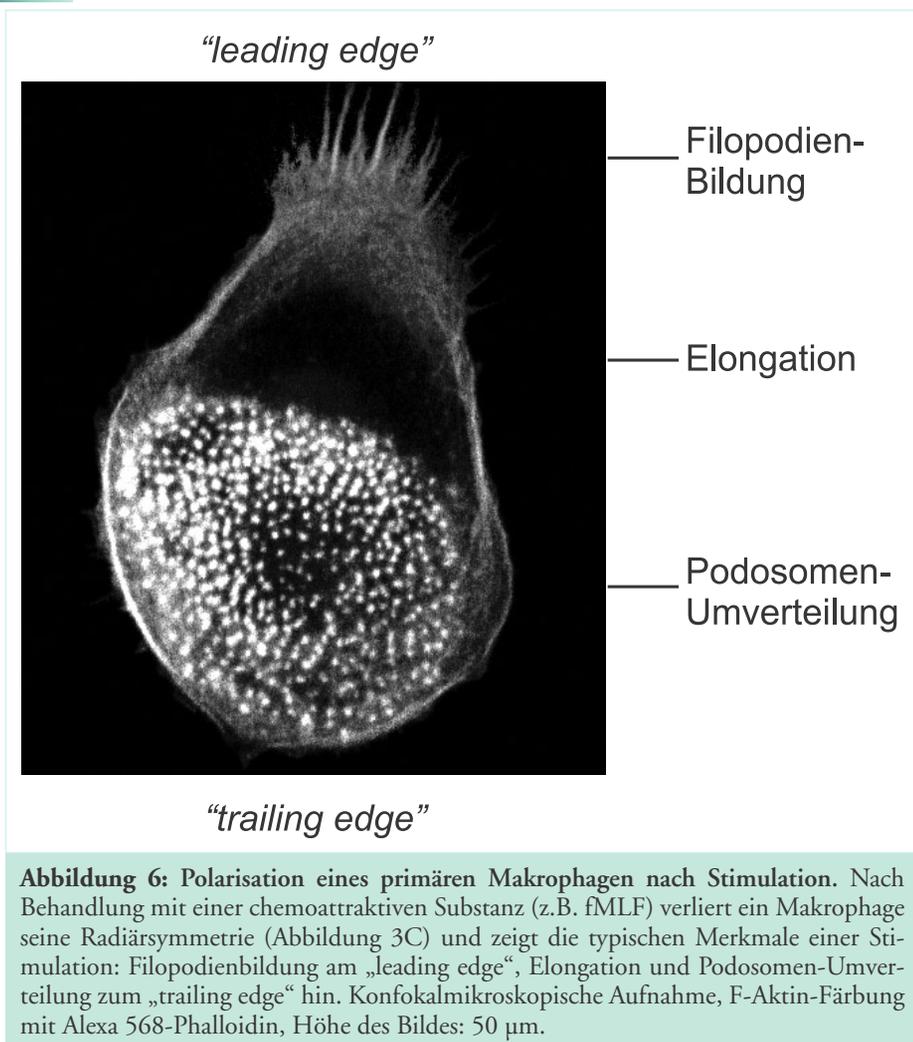


Abbildung 6: Polarisation eines primären Makrophagen nach Stimulation. Nach Behandlung mit einer chemoattraktiven Substanz (z.B. fMLF) verliert ein Makrophage seine Radiärsymmetrie (Abbildung 3C) und zeigt die typischen Merkmale einer Stimulation: Filopodienbildung am „leading edge“, Elongation und Podosomen-Umverteilung zum „trailing edge“ hin. Konfokalmikroskopische Aufnahme, F-Aktin-Färbung mit Alexa 568-Phalloidin, Höhe des Bildes: 50 µm.

sprochen und injiziert (Abb. 4). Der Injektionsdruck (ca. 80-150 hPa) darf dabei nicht unter den Haltedruck (ca. 50 hPa) fallen, da sonst Flüssigkeit in die Kanüle eingesogen statt herausgepreßt wird. Die Menge der injizierten Lösung hängt vom Injektionsdruck und der Injektionszeit ab, d.h., je höher der Druck und je länger die Zeit, in der er aufrechterhalten wird (Minimum: 0,1 Sekunden), desto mehr Volumen wird injiziert. Nach der Injektion sollte man die Zellen in RPMI + 20% Serum ca. 30-60 Minuten nachinkubieren, da einerseits durch zu heftiges Injizieren Schockreaktionen wie z.B. Podosomenverlust auftreten können (4), und andererseits mögliche Effekte der injizierten Proteine Zeit brauchen, um sich zu manifestieren. Anschließend können die Zellen fixiert und Fluoreszenzgefärbt werden (3), um eventuelle Auswirkungen der injizierten Substanz auf die Zellen zu begutachten (z.B. auf das Aktin-Zytoskelett oder die Verteilung anderer zellulärer Proteine). Alternativ kann untersucht werden, welche Auswirkungen die injizierte Substanz z.B. bei der Stimulation von Makrophagen hat.

● Stimulation

Hintergrund: Makrophagen lassen sich mit chemoattraktiven Substanzen wie z. B. dem Peptid fMLF stimulieren. Diese Substanzen fördern die Zellwanderung und führen gleichzeitig zu einer typischen morphologischen Ausprägung der stimulierten Zellen. So reagieren primäre humane Makrophagen auf fMLF-Gabe mit Zellpolarisation, gekennzeichnet durch Elongation, Filopodienbildung am *leading edge* und Umorganisation der Podosomen zum *trailing edge* (2). Stimulationseffekte können sowohl durch einen gerichteten Gradienten (Abb.5) als auch durch diffuse Verteilung einer chemoattraktiven Substanz im Medium erreicht werden. Ersteres ist dabei eher der *in vivo*-Situation nachempfunden, letzteres die „quick and dirty“-Variante.

Was ist zu beachten? Die Fähigkeit von Makrophagen, auf einen definierten Stimulus mit einer entsprechenden (hier: morphologischen) Antwort zu reagieren, ist stark abhängig vom Alter der Kultur (optimal: 5-6 Tage), vom

jeweiligen Spender und auch von dessen „Tagesform“. So kann die zur deutlichen Stimulation nötige fMLF-Dosis bei verschiedenen Makrophagen-Präparationen bis zu Faktor 10 differieren.

So wird's gemacht: Für eine gerichtete Stimulation wird die chemoattraktive Substanz (z.B. fMLF) in einen Agarblock gegossen (1). Dafür werden je 200 µl warme 2% Agar-Lösung, die 50 µg/ml (Endkonzentration) fMLF (Sigma) enthält, in die Vertiefungen einer 96 well-Platte (Nunc) gegossen. Parallel werden die Coverslips mit Makrophagen in eine 8 well-Kulturschale (Nunc) gegeben, kurz mit warmem Medium gewaschen und schließlich mit 2 ml RPMI ohne Serum inkubiert. Der erstarrte Agarblock wird anschließend an einen Rand der Zellkulturschale gelegt, gegenüber dem Coverslip mit den Makrophagen. Die chemoattraktive Substanz breitet sich nun vom Agarblock ausgehend in einem Gradienten aus (Abb. 5). Erreicht der Stimulus die Makrophagen, strecken sich diese vorwiegend zum Agarblock hin. Je nach gewünschtem Grad der Stimulation werden die Zellen 1-6 h inkubiert. Natürlich darf während der Inkubation keinesfalls die Kulturplatte berührt oder erschüttert werden, da dies den Gradienten zerstören würde. Für eine ungerichtete Stimulation wird die chemoattraktive Substanz direkt ins Kulturmedium gegeben (z.B. 1 µl einer 100 µg/ml fMLF-Lösung auf 500 µl Medium). In diesem Fall entsteht kein gerichteter Gradient. Vorteil: es sind nur kurze Inkubationszeiten von 5 Minuten bis 1 Stunde nötig.

Nach erfolgter Stimulation können die Zellen fixiert und Fluoreszenzgefärbt werden (3). So sind dann z.B. in der Aktin-Färbung die typischen Merkmale einer Stimulation wie Elongation, Filopodienbildung und Umverteilung der Podosomen deutlich sichtbar (Abb. 6).

● LITERATUR

1. Linder et al. PNAS, 9648, 1999
2. Linder et al. Imm. Aktuell 1, 52, 2000
3. Hüfner et al. Imm. Aktuell 1, 88, 2001
4. Linder et al. J Cell Sci 113, 4165, 2000

Artikel in IMA Lab-Book

* Katharina Hüfner und Stefan Linder, *Leuchtende Skelette: Fluoreszenzfärbung und Manipulation des Zytoskeletts primärer humaner Makrophagen* 1 (5) 2001 *