

4. Material und Methoden

4.1 Puffer und Medien

PBS:	8g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 0,2g/l KH ₂ PO ₄ , 1,4g/l Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O
PBS/BSA:	PBS +2g/l Rinderserumalbumin
PBA:	PBS/BSA +0,05%NaN ₃
Saponinpuffer:	PBS/BSA +5g/l Saponin
MACS-Puffer:	PBS/BSA +1mM EDTA
„RPMI komplett“:	RPMI +10% FCS hitzeinaktiviert +100U/ml Penicillin +100U/ml Streptomycin +Glutamax-I (0,3mg/ml Glutamin) + 10µg/ml 2-Mercaptoethanol
Erythrozyten-Lyse-Puffer:	10mMKHCO ₃ , 155mM NH ₄ CL, 0,1mM EDTA, pH 7,5

4.2 Antikörper

Für die durchflusszytometrischen Analysen und verschiedene Färbungen wurden die nachfolgenden monoklonalen Antikörper verwendet. Wobei die einzelnen Klone an unterschiedliche Fluorochrome, wie Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerytrin (PE), Indodicarbocyanin (Cy5), Peridinin Chlorophyll (PerCP), Allophycocyanin (APC), bzw. Haptene, wie Biotin (Bio), das an Streptavidin bindet oder an Digoxygenin (Dig), gekoppelt waren.

Als sekundäre Antikörper wurden Streptavidin (SA) gekoppelte Konjugate bzw. ein α Dig-Antikörper, mit den oben genannten Fluorochrome verwendet.

Oberflächenfärbungen

EPITOP	KLON	Herkunft
CD4	GK1.4/	DRFZ
hCD4	TT1	DRFZ
KJ1.26	KJ1.26	DRFZ
CD8	53.67	DRFZ
V β -5	MR9-4	BD-Biosciences
V α -2	B20.1	BD-Biosciences
2C44 (I-A ^d -Lack)		
CD11c	HL3	BD-Biosciences
CD62L	Mel14	DRFZ
MHCII	M5/114	DRFZ

Intrazelluläre Färbungen

EPITOP	KLON	Herkunft
IL-2	S4B6	BD-Bioscience
IL-4	11B11	BD-Bioscience
IL-10	JES5-16E3	BD-Bioscience
TNF α	MP6-XT22	BD-Bioscience
IFN γ	AN18.17.23	BD-Bioscience
CD154 (CD40L)	4F10	Miltenyi Biotech
IL-13	38213.11	DRFZ
IL-17	TC11-18H 10.1	BD-Bioscience
Ova	-	Chemicon

4.3 Molekularbiologische Arbeiten

Alle DNA Präparationen sowie Klonierungen wurden nach den Standardprotokollen der Hersteller durchgeführt und sind daher nicht im Detail beschrieben.

Für die Vermehrung der DNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (DH5 α)¹³⁰ verwendet und wurde in Luria Broth (LB)-Flüssigmedium bzw. auf LB-Platten, unter Zusatz von 100 μ g/ml Ampicillin (Amp) bzw. 30 μ g/ml Kanamycin (Kan) durchgeführt. Zur DNA Präparationen aus *E.coli*-Kulturen sowie aus Agarosegelen wurden Produkte der Firma Quiagen verwendet, wobei die DNA Präparation von größeren Mengen DNA für die Genegun Immunisierung mit dem Endo Free Maxi Kit (Quiagen, Hilden, Germany) durchgeführt wurde. Restriktionsenzyme und Ligasen (New England BioLabs bzw. Boehringer Mannheim) wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Primer für die Klonierung wurden von der Firma TibMolBiol (Berlin) bezogen. Für die PCR-Reaktionen wurde die Pfu-Polymerase verwendet, da es die Polymerase mit der geringsten Fehlerrate ist.

Der ursprüngliche Vektor pcEXV-mlip31 mit der li80-OVA-Sequenz wurde von R. Germain (NIH, New York)¹³¹ freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Folgende Primer wurden für die Amplifikation der li80-OVA-Sequenz verwendet, um geeignete Schnittstellen für die weiteren Klonierungsschritte zu generieren: Primer li80-up: CCG GAA TTC GCC ATG GAT GAC CAA CGC GAC CTC, Primer li80-down: CCG CTC GAG CGG TTA AGG GGA AAC ACA TCT GCC AA. Das Fragment wurde anschließend in den pcDNA3.1+ (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) subkloniert. Die membranOVA-Sequenz wurde von W. Heath¹¹⁵ beschrieben und in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ eingebracht. Beim Vektor p Δ li80-OVA wurde die li80-Sequenz aus dem pli80-OVA Vektor entfernt.

Die folgenden Vektoren wurden zur Herstellung der verwendeten Immunisierungsvektoren verwendet.

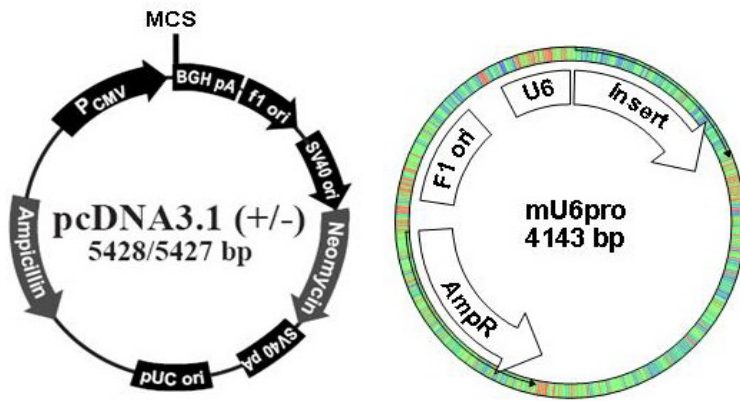


Abb3 Expressionsplasmide

Der Vektor pcDNA3.1+ (Invitrogen) wurde als Basisvektor für pEmpty, pOVA, pli80-OVA, pmOVA, p Δ li80-OVA, pOVA-Lack, pli80-OVA-Lack, pIL-4 und pIL12p70 verwendet.

Der Vektor pmU6pro besitzt den besonderen U6-Promoter, durch den speziell siRNA exprimiert werden kann. Dieser Vektor war Basis für die siRNA-Vektoren pIL12sip35; pIL12sip40 und psiGFP.

4.4 Test der Immunisierungsvektoren *in vitro*

Die klonierten Vektoren wurden vor ihrem Einsatz *in vivo* erst *in vitro* auf Expression und Funktionalität des inserierten Gens getestet. Zur Kontrolle der Ovalbumin-Expression wurde eine Zelllinie, HEK-293T, mittels Metafectene (Biontex, Germany) nach Angaben des Herstellers transfiziert. 24-48h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Ovalbuminexpression intrazellulär mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Tabelle) nachgewiesen und im FACS analysiert.

Die Funktionalität wurde folgendermaßen getestet: Eine MHC-II-positive Zelllinie (B-Zelllinie mit genetischem Background Balb/c) A20 wurde mit den Vektoren pOVA sowie pli80-OVA transfiziert und mit TCR-transgenen CD4⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:2 zusammen, für 3 Tage bei 37°C, kultiviert. Die A20-Zellen wurden vorher mit 60µg/ml Mitomycin behandelt, anschließend 30min bei 37°C inkubiert, dann 4x mit PBS/BSA gewaschen. Mitomycin ist ein Proliferationshemmer, der verhindert, dass die A20-Zellen

die T-Zellen überwachen. Die CD4⁺ T-Zellen wurden vorher mit CFDA-SE markiert (siehe 4.5.3), um deren Proliferation im FACS analysieren zu können.

4.5 Mäuse und Zellen

4.5.1 Verwendete Mausstämme

Für die *in vivo* Experimente wurden Wildtypmäuse (WT) des Inzuchtstammes Balb/c¹³² und C57/Bl6¹³³ verwendet. Weiterhin wurden DO11.10-Mäuse¹³⁴ bzw. OTII-Mäuse¹³⁵ verwendet, die homozygot transgen für den T-Zellrezeptor zur Erkennung des Ova₃₂₃₋₃₃₉-Peptids sind, wenn es von dem I-A^d Klasse-II-MHC-Molekül präsentiert wird. Die TCR-transgenen Th-Zellen der DO11.10 Mäuse, können mit dem Antikörper KJ1.26, und die TCR-transgenen Th-Zellen der OTII-Mäuse, mit den Antikörpern V α 2 und V β 5, die die α - und β -Kette des TCRs erkennen, spezifisch nachgewiesen werden.

Außerdem wurden B-Zell-knockout (JHT^{-/-}) Mäuse¹³⁶ verwendet. Dieser Mausstamm besitzt keine funktionellen B-Zellen, da den JHT^{-/-} Mäusen die J_H-Gensegmente fehlen und dadurch die B-Zellentwicklung in einem frühen Stadium blockiert ist.

Weiterhin wurden MyD88^{-/-} Mäuse¹³⁷ verwendet, denen das intrazelluläre Adaptermolekül MyD88 fehlt. Diese Mäuse sind nicht in der Lage, MyD88-Signale weiterzuleiten.

Alle aufgeführten Mausstämme wurden in der Versuchstierzucht des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin-Marienfelde unter spezifisch-pathogenfreien (SPF-Bedingungen) gezüchtet. Für alle Experimente wurden männliche und weibliche Tiere im Alter von 6-12 Wochen verwendet. Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels zervikaler Dislokation.

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Mäusen und Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen (Sterilwerkbank u.a.) durchgeführt.

4.5.2 Isolation von Lymphozyten

Den Versuchstieren wurden die peripheren lymphatischen Organe (Milz, axiale, mandibuläre, barchiale, mesenteriale und inguinale Lymphknoten) entnommen.

Die entnommenen Milzen wurden durch ein Metallsieb gedrückt und mit sterilem PBS gespült, um eine Einzelzellsuspension herzustellen.

Anschließend wurde die Zellsuspension in ein Kunststoffröhrchen überführt und bei 300g für 10min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in PBS/BSA resuspendiert. Der in diesem Abschnitt beschriebene Vorgang wird im Weiteren als "waschen" oder "Waschschritt" bezeichnet. Alle Versuchsschritte mit lebenden Zellen erfolgen stets auf Eis.

Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse. Dazu wurden die Zellen für 3min auf Eis in Erythrozyten-Lysepuffer inkubiert. Nun wurden die Zellen einmal gewaschen und anschließend durch ein Nylonsieb (Porengröße 70µm) gefiltert, um eventuell entstandene Zellklumpen zu entfernen. Bei der Aufbereitung der Lymphknoten wurde auf eine Erythrozytenlyse verzichtet, da dies hier nicht notwendig war.

Für den Zelltransfer wurden die Zellen der Milz sowie der mandibulären, axialen, mesenterialen und brachialen Lymphknoten aus den TCR-transgenen Mäusen vereint.

4.5.3 Magnetische Zellsortierung und Markierung der Zellen mit CFDA-SE (Carboxy-Fluorescein-Diacetat-succinimidylester)

Für den Transfer naiver TCR-transgenen Th-Zellen, war es notwendig die Zellen nach dem Naivmarker CD62L zu sortieren. Zur magnetischen Markierung wurde die Einzelzellsuspension für 10 min bei 10°C mit anti-CD62L-Beads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die magnetisch markierten Zellen einmal gewaschen und über eine LS-Säule nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Reinheit der sortierten naiven T-Zellen wurde mittels FACS Analyse kontrolliert und betrug nach CD62L Sortierung circa 97%.

Zur Markierung der T-Zellen mit CFDA-SE wurden die Zellen zweimal mit PBS proteinfrei gewaschen und anschließend auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend sind die Zellen für 3min in einer 1µM CFDA-SE (Sigma, St

Louis, MO)/PBS Lösung gefärbt worden. Die Reaktion wurde mit 10%FCS haltigem RPMI Medium abgestoppt und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in entsprechendem Volumen sterilem PBS aufgenommen.

4.5.4 Transfersystem

Die zu transferierenden TCR-transgenen T-Zellen aus DO11.10 Mäusen wurden wie unter 4.5.2 und 4.5.3 beschrieben aufbereitet. Der Transfer von 150 μ l, gefilterter (Pre-separation Filter, Miltenyi Biotech) Zellsuspension erfolgte mittels i.v. Injektion in die Schwanzvene. Dazu wurden die Mäuse unter Rotlicht erwärmt. Die Zellzahl betrug insgesamt circa $3 \cdot 10^7$ Zellen, war aber auf $1 \cdot 10^6$ TCR-transgene Th-Zellen berechnet. Der Transfer wurde immer in Geschlechter-übereinstimmende Tieren durchgeführt.

Bei der Reisolation und Analyse der transferierten TCR-transgenen Th-Zellen, wurden die Milz und die drainierenden Lymphknoten für jedes Tier einzeln analysiert.

4.5.5 Isolierung von Dendritischen Zellen aus Lymphknoten

Inguinale, axiale und brachiale Lymphknoten aus 3-5 Mäusen wurden auf Ein in "RPMI komplett" Medium, das 100mg/ml Collagenase D und 100mg/ml DNase I enthielt, in einem Metallsieb mittels Spritzenstempel zerkleinert. Die Zellsuspension wurde 20min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde ein 5facher Überschuss an 37°C warmen PBS/EDTA zugegeben und für weitere 10min inkubiert. Dann wurden die Zellen durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vereinzelt und über ein Nylonsieb (Porengröße 70 μ m) gegeben. Nun wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS/BSA +5mM EDTA gewaschen und in PBS/BSA aufgenommen. Die so präparierte Zellsuspension wurde für die Liposomenfärbung (siehe 4.6.4) verwandt.

4.6 Durchflusszytometrie/FACS

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode (Handbook Flow-cytometry and Cell-sorting) mit der es möglich ist Zellen, die mit fluoreszenten Substanzen oder Fluorochrom-Antikörperkonjugaten markiert wurden, auf Einzelzellebene sichtbar zu machen. Die markierten Zellen passieren hierbei in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom zwei Laser, einen Argonlaser (488nm) und einen Diodenlaser (635nm). Die Fluorochrome werden dadurch, zum einen zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, zum anderen wird das auftreffende Licht gestreut. Die Streueigenschaften werden durch die Parameter FCS (Vorwärtsstreulicht), das mit der Größe der Zellen in Korrelation steht, und SSC (Seitwärtsstreulicht), das für die Granularität und Membranbeschaffenheit der Zellen steht, bestimmt. Wobei das Vorwärtsstreulicht in einem Winkel von 3°-10° gestreut wird, das Seitwärtsstreulicht in einem Winkel von 90°. Parallel werden durch vier verschiedene Fotodetektoren die Emissionen der Fluorochrome mit denen die Zellen markiert sind gemessen. Die Detektoren messen das emittierte Licht der verschiedenen Farbstoffe folgendermaßen:

FL-1 (530nm): FITC, CFDA-SE, GFP

FL-2 (585nm): PE, Propidiumiodid (PI)

FL-3 (670nm): PerCP, PI

FL-4 (661nm): APC, Cy5.

Über die Anregung mit dem Argonlaser können das Streulicht und die Fluoreszenzen FL-1, FL-2 und FL-3 gemessen werden sowie mit dem Diodenlaser das Licht der Fluoreszenz FL-4.

PI lagert sich in den Kern toter Zellen ein und wird auf Grund der Emission in FL-2 und FL-3 detektiert, wodurch klar tote von lebenden Zellen unterschieden werden kann. Somit können Zelltrümmer durch den FCS und SSC sowie tote Zellen über FL-2 und FL-3 bei der Analyse ausgeschlossen werden. FSC- und SSC-Signale wurden mit linearer, Fluoreszenz-Signale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Bei den Proliferationsmessungen wurden circa 30000-50000 Zellen, bei den Zytokinmessungen circa $1 \cdot 10^6$ Zellen zur Analyse aufgenommen. Durch das Setzen von Analysefenstern konnte die gewünschte Zellpopulation analysiert werden. Die Messungen wurden am FACS Calibur (Becton Dickinson) oder am LSR-II (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der Cellquest PRO Software (Becton Dickinson) oder mit der FloJo Software (Tree Star Inc. Ashland).

4.6.1 *In vivo* Proliferationsassay

Um die Proliferation der transferierten Th-Zellen später untersuchen zu können, wurden sie vorm Transfer mit dem Cell-Tracer Farbstoff CFDA-SE markiert. Die Eigenschaften dieses Farbstoffs machen ihn sehr geeignet, um die Proliferation *in vivo* untersuchen zu können. Die Färbung mit CFDA-SE ist für lange Zeit stabil *in vivo* und kann bis zu 24 Wochen später detektiert werden. Der Farbstoff kann mit dem Durchflusszytometer detektiert werden und hat ein günstiges Anregungs- und Emissionsspektrum (495/525nm). Während der ersten 24h werden circa 99% der Färbung metabolisiert und übrig bleiben gefärbte Proteine mit einer langen (Wochen bis Monate) Halbwertszeit. Diese sind auch nach Teilung der Zelle noch vorhanden, jedoch ist die Intensität der Färbung zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen aufgeteilt. Durch diese Aufteilung der Farbintensität entsteht bei der Proliferation ein Bandenmuster, das die einzelnen Zellgenerationen wieder spiegelt.

4.6.2 Färbungen von Zellen

Oberflächenfärbung:

Um Zellen im Durchflusszytometer analysieren zu können, müssen die Oberflächenmoleküle fluoreszent markiert sein. Dies wird erreicht, indem ein für das gewünschte Oberflächenmolekül spezifischer Antikörper an ein Fluorochrom gekoppelt wird, wodurch dieses Molekül "angefärbt" bzw. im Durchflusszytometer detektiert werden kann.

Für die Färbung von Oberflächenmolekülen wurden die Zellen für 10min auf Eis in der gewünschten PBS/BSA/Antikörperlösung inkubiert, anschließend einmal mit PBS/BSA gewaschen und in circa 300-700µl zur Analyse im Durchflusszytometer aufgenommen. Unmittelbar vor der Messung wurde der Probe der Nukleinsäure-spezifische Farbstoff PI (Propidiumiodid) zugesetzt, um toten Zellen ausschließen zu können. PI färbt spezifisch die toten Zellen an. Dies ist notwendig, da nekrotische Zellen unspezifisch die Antikörper-Konjugate binden können und damit ein falsch positives Signal liefern.

Intrazellulärfärbung:

Die Färbung von intrazellulären oder sekretierten Molekülen erfordert die Permeabilisierung der Membran mit dem Detergenz Saponin, um den Antikörpern das

Eintreten in die Zelle zu ermöglichen. Die T-Zellen mussten vor der intrazellulären Färbung restimuliert werden (siehe 4.6.3), um eine genügende Anzahl färbbarer Moleküle zur Verfügung zu haben und wurden anschließend fixiert.

Die fixierten Zellen wurden einmal mit Saponinpuffer (0,5% Saponinlösung; Sigma-Aldrich, München) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Antikörper/Saponinlösung für 10min bei RT inkubiert und danach mit PBS/BSA gewaschen. Zur Messung wurden die Zellen in circa 300-700µl PBA aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

4.6.3 Restimulation mit PMA/Ionomycin und Fixierung

Bei der 5stündigen Restimulation (bei 37°C in 10% FCS-RPMI Medium) mit 5nM Phorbol-12-Myristat-13Acetat (PMA) und 1µg/ml Ionomycin *in vitro*, wird das *in vivo* erworbene Zytokinprofil der T-Zellen abgerufen. Dabei simuliert PMA eine TCR Stimulation durch Aktivierung des Signaltransduktionsweges des TCR, des weiteren führt Ionomycin zur intrazellulären Calciumfreisetzung wodurch alle T-Zellen aktiviert werden und zur Zytokinproduktion angeregt werden. Dabei würde es zur Sekretion der Zytokine kommen. Um das zu verhindern wird nach 2h der Sekretionsinhibitor BrefeldinA (5µg/ml) hinzugesetzt. Das führt zur Anreicherung aller Zytokine in der Zelle, die dann nach Fixierung intrazellulären anfärbbar sind. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS proteinfrei gewaschen, um Protein zu entfernen, die bei der Fixierung störend wirken könnten.

Die Fixierung der Zellen erfolgt mit 2%iger Para-Formaldehydlösung in der sie für 20 min bei RT inkubiert, nachfolgend mit PBS/BSA/Azid (PBA) gewaschen wurden und in PBA gelagert.

4.6.4 Liposomenfärbung

Zur Färbung von schwach exprimierten Oberflächenantigenen, wie z. B. Ova-Peptid/MHC-II-Komplexe auf APCs, sollten diese mittels Liposomenfärbung detektiert werden. Durch diese Art der Färbung wird ein Verstärkungseffekt dadurch hervorgerufen,

dass in einem Liposom, nicht wie bei einem fluorochromkonjugierten Antikörper 2-10 Fluorochrome gebunden sind, sondern mehrere tausend Farbmoleküle vom Liposom eingeschlossen sind. Mit diesem System können Verstärkungen bis zum Faktor 1000 erzielt werden.

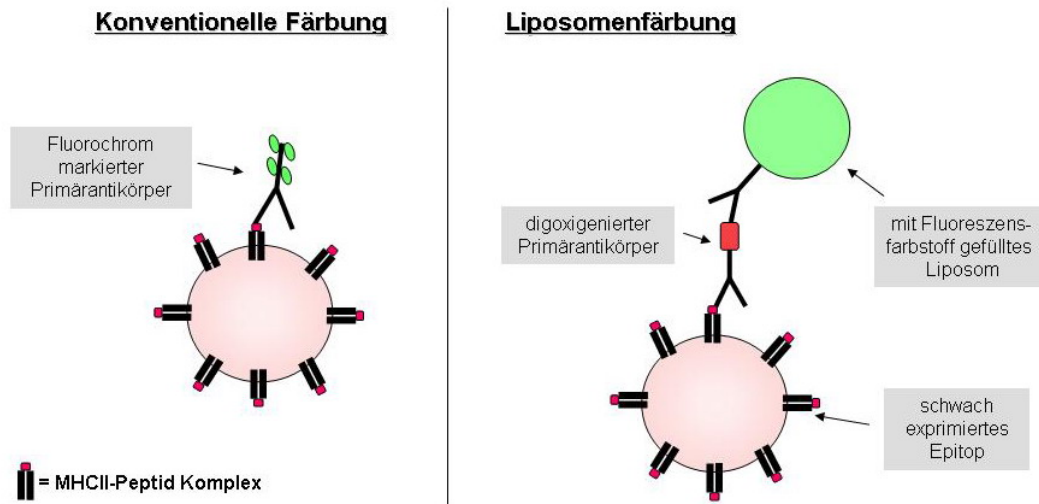


Abb4 Schematische Darstellung einer Liposomenfärbung im Vergleich zur konventionellen Färbung

Liposomen formen einen Hohlraum, der von einer Phospholipid-Doppelschicht begrenzt wird. Durch das Füllen des Hohlraums des Liposoms mit fluoreszente Farbstoff kann eine circa 1000fache Verstärkung des Färbesignals erzeugt werden. Im Vergleich hierzu haben herkömmliche, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper, nur circa 2-10 Farbstoffmoleküle gebunden. Das Liposom kann an einen Antikörper gekoppelt und so als sekundäres Färbereagenz benutzt werden. Ein solches anti-dig-Liposom kann somit an einen digoxiginierten Primärantikörper binden.

Für die Liposomenfärbung werden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen zuerst 5-10 min mit 50 µg/ml Ratten IgG und 50 µg/ml anti-Fcγ Antikörper inkubiert. Anschließend werden sie in 100µl PBS/BSA einer Primärantikörper-Lösung aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Um den Primärantikörper vollständig zu entfernen werden die Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen. Nun werden die Zellen mit 200µl Liposomenlösung 30min, unter ständigem Schütteln auf Eis gefärbt. Anschließend werden die Zellen dreimal mit 3ml PBS/BSA gewaschen und in 300-700µl PBS/BSA, zur durchflusszytometrischen Analyse, aufgenommen.

4.7 DNA Immunisierung

Für die DNA Immunisierung mit der Genegun wurde DNA auf Goldpartikel präzipitiert, die Patronen mit den Goldpartikeln beladen und die Tiere immunisiert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Dazu wurden 25mg 1Micron Gold (Biorad) mit 100µl Spermidin (0,05M in H₂O) versetzt und 10sec ins Ultraschallbad gehalten. Dann wurden 50µg gewünschte Plasmid DNA (in H₂O) zugegeben, es sei denn ein weiterer Vektor für eine Koimmunisierung wurde dazu gegeben, dann wurden je 25µg eingesetzt. Nach dem Durchmischen wurden 100µl CaCl (1M) unter ständigem Vortexen langsam und tröpfchenweise dazugegeben. Nach 15min war der Präzipitationsvorgang abgeschlossen und die Goldpartikel wurden viermal mit 100%igem EtOH (wasserfrei) gewaschen. Nach Zugabe von 3,5ml PVP Lösung waren die Goldpartikel fertig zur Beschichtung auf die Patronen. Dazu wurden die Goldpartikel 3sec ins Ultraschallbad gehalten, gevortext und mittels angeschlossener 10ml Spritze in den dafür vorgesehenen Teflonschlauch (Tefzel Tubing) gesaugt. Dieser wurde nun in die "Tubing-Prep-Station" eingeführt. Nach dem Absetzen des Goldes wurde die Flüssigkeit abgesaugt und der Schlauch, unter Rotation mit einem Stickstoffstrom getrocknet, wodurch sich das Gold gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche verteilt. Danach wurde der Schlauch zugeschnitten und es entstanden ca. 45 Patronen, die bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden konnten. Die Immunisierung erfolgte indem die Goldpartikel per Heliumdruck (400 pounds per square inch = 276,13 N/cm² = 28,15 kg/cm² x 9,81 N/kg) auf die rasierte Bauchhaut der Mäuse geschossen wurden. Dabei wurden wenn nicht anders angegeben drei nicht überlappende Stellen immunisiert.

4.8 Serumantikörperbestimmung

Für die Untersuchung antigenspezifischer Antikörper aus dem Serum der Mäuse, wurden diese dreimal, im Abstand von einer Woche mit 6 nichtüberlappenden Genegun Schüsse immunisiert. Zur Serumgewinnung wurde den Mäusen 10 Tage nach der letzten Immunisierung circa 5 Tropfen Blut, durch Anritzen der Schwanzvene, nach Erwärmung unter Rotlicht entnommen. Das Blut wurde bei RT unverschlossen 5h (bzw. ÜN im Kühlschrank) stehen gelassen. Das klar gewordene überstehende Serum wurde

abgenommen und verbleibende Zellen durch Zentrifugation bei 13000U/min für 10min pelletiert. Der klare Überstand (Serum) wurde wiederum in ein neues Gefäß überführt und konnte nun bei -70°C gelagert werden.

Die Quantifizierung der Ovalbumin-spezifischen Antikörper erfolgte mit dem "Mouse Isotyping Cytometric Bead Array (CBA) Kit" (BD-Bioscience), jedoch mit leicht verändertem Protokoll. Dazu wurde zunächst Biotin (Pierce) an Ovalbumin gekoppelt. Dies geschah durch Zugabe von einem im 25fachen Überschuss Sulfosuccinidyl-6-(biotinamido)-Hexanoat zu Ovalbumin in Boratpuffer pH8,5. Nach 2h wurde freies Biotin über eine Sephadex G-25M Säule (Pharmacia) entfernt.

Das Ovalbumin-Biotin wurde statt der Fluorochrom markierten Antikörper des Kits verwendet und wurde somit antigenspezifisch gemacht. Diesem Schritt schloss sich ein weiterer Färbeschritt an, bei dem Streptavidin-PE wie bei einer konventionellen Sekundärfärbung eingesetzt wurde. Die Konzentration des Ovalbumin-Biotins wurde anhand von Standardseren bestimmt.

4.9 DTH-Reaktion

Die Hypersensibilitätsreaktion wird im Mausmodell entweder im Ohr oder in der Fußsohle durchgeführt und dient dazu, eine Aussage über die Stärke der durch Th1-Zellen vermittelte Entzündungsreaktion treffen zu können. Die Stärke korreliert mit der Fußsohlenschwellung.

Hierbei wurden die Versuchstiere dreimal im Abstand von 1 Woche mit jeweils 6 nicht überlappenden Genegunschüssen immunisiert. Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde die DTH-Reaktion ausgelöst. Hierzu wurde vorher präpariertes Ova-Peptid verwendet. Das Ova-Peptid (1µg/ml) wurde 1:10 mit sterilem PBS verdünnt. Zu dieser Peptidlösung wurde nun im Verhältnis 1:1 Inkomplettes Freund's Adjuvanz (IFA) gegeben. Dieses Gemisch wurde in eine 1ml Spritze aufgezogen und anschließend mehrfach durch eine aufgesetzte 22Gx1¼ Kanüle (TERUMO, Luer) rein- und rausgepresst bis eine sehr zähflüssige, weiße Emulsion entsteht. Für die Injektion ohne das Ova-Peptid wurde die Emulsion mit PBS und IFA (1:1) analog hergestellt.

Vor der Injektion in die Fußsohle wurde die Dicke der Füße gemessen und dieser Wert als „Null-Wert“ festgelegt. Die Injektion in die Fußsohle wurde unter Betäubung

durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse leicht mit Isofluran (Abbott, Ludwigshafen) betäubt. Jedes Tier erhielt 5µl der Emulsion in die Fußsohle injiziert, jeweils links mit Ova-Peptid und rechts die Kontroll'emulsion ohne Ova-Peptid. Die Fußsohlenschwellung wurde nach 24 Stunden erneut gemessen und erfolgte danach 7 Tage lang, im Abstand von 24 Stunden.

4.10 Assay zur Bestimmung antigenspezifischer CD4⁺ CD154⁺

Gedächtniszellen

Zur Bestimmung antigenspezifischer CD154⁺ T-Zellen wurden die Mäuse dreimal im Abstand von einer Woche mit 6 nicht überlappenden Genegunschüsse immunisiert. 10 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die drainierenden Lymphknoten und die Milz entnommen und wie unter Punkt... beschrieben eine Einzelzellsuspension hergestellt. Jedoch wurden die Zellen nach dem letzten Waschschrift in RPMI-komplett resuspendiert. Die Zellzahl wurde auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/200ml eingestellt. Der Zellsuspension wurden zum einen OVA-Protein (250mg/ml) zur antigenspezifischen Restimulation, sowie zur Stimulation (2.Signal) der Th-Zellen der antiCD28-Antokörper (1:1000), zugesetzt. Anschließend wurden je 200ml der Zellsuspension pro 96well verteilt. Die Zellen wurden nun über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Sekretionsinhibitor BrefeldinA wurde für die letzten 6 Stunden Inkubation dazugegeben, um eine intrazelluläre Akkumulation der CD154-Moleküle zu erreichen.

Zur Analyse wurden die Zellen einmal gewaschen, anschließend fixiert und intrazellulär gefärbt (siehe 4.6.3).

4.11 Signifikanztest

Zur Bestimmung der Signifikanzwerte wurde ein Mann-Whitney-Test verwendet. Die erfolgte mit Hilfe der Software Prism (Graphpad Software, Inc., USA) berechnet.