

## 2. Patienten, Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv und Kontrollen

Zur Durchführung der Versuche wurde Synovialflüssigkeit und peripheres Blut von HLA-B27-positiven Patienten mit einer *Shigella*-getriggerten ReA verwendet, welche neben klinischer Symptomatik mittels Stuhlkultur, serologisch und/oder positivem Lymphozytenproliferationsassay gesichert wurde. Die Akquisition erfolgte über die rheumatologische Sprechstunde der medizinischen Poliklinik, Universitätsmedizin Berlin, Charité, Campus Benjamin Franklin.

Die Synovialflüssigkeit wurde im Rahmen von diagnostischen Prozeduren bzw. bei Entlastungspunktionen gewonnen.

Patient #	Alter (Jahre)	HLA-B27	Geschlecht	Lokalisation der peripheren Arthritis	Symptomatische Enteritis vor Auftreten der Arthritis	Erregernachweis <i>Shigella flexneri</i>	
						Stuhl	Proliferationsassay
1	46	pos.	w	Knie re., MCP I re.	ja	x	
2	27	pos.	m	Knie, OSG bds., Ellenbogen	ja		x
3	24	pos.	m	Knie, OSG re., Handgelenke bds.	ja		x
4	32	pos.	w	Knie, OSG li.	ja	x	
5	20	pos.	m	Knie re, OSG li.	ja		x

**Tabelle 1:** Charakterisierung der Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA  
w = weiblich, m = männlich, MCP = Metacarpophalangealgelenk, OSG = oberes Sprunggelenk

Für die Untersuchung der T-Zell-Antwort auf ribosomale Proteine stand eine ausreichend große Anzahl synovialer MNZ der Patienten #1 bis #3 zur Verfügung.

Zur Untersuchung der humoralen Immunantwort auf die ribosomalen Proteine wurde Serum aller fünf Patienten mit HLA-B27-positiver *Shigella*-getriggelter ReA verwendet.

Als Kontrollgruppe dienten gesunde, altersgleiche, freiwillige Spender, denen einmalig peripheres Blut zur Gewinnung von Serum abgenommen wurde.

## 2.2 Verwendete Bakterienstämme

Ribosomen und ribosomale Proteine wurden aus *Shigella flexneri 2a 259* präpariert, welche durch Dr. Thomas Adam, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte, zur Verfügung gestellt wurden. Eine Infektion mit dem Serotyp *2a* ist mit dem häufigen Auftreten einer reaktiven Arthritis assoziiert<sup>54, 83-88</sup> und der verwendete Stamm verfügt über das 2 Md-Plasmid pHS-2, welches bei arthritogenen Shigellenstämmen nachweisbar ist<sup>80-82</sup>.

Um präparative und analytische Methoden zu etablieren sowie als Referenz zur Identifikation der ribosomalen Proteine von *Shigella* dienten *Escherichia coli MRE600* und *CAN20*.

## 2.3 Analytische Methoden

### 2.3.1 Photometrische Messungen

Die Konzentration von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und ribosomalen Proteinen lässt sich durch UV-Absorptionsmessungen der betreffenden Lösungen bestimmen.

#### 2.3.1.1 Konzentrationsbestimmung ribosomaler Partikel

Die Konzentration ribosomaler Partikel kann anhand der UV-Absorption der entsprechenden Lösung bei 260 nm abgeschätzt werden. Folgende molare Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{260}$ ) werden zugrundegelegt:

70S :	$\epsilon_{260} = 4,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	= 24 pmol/ $A_{260}$
50S :	$\epsilon_{260} = 2,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	= 36 pmol/ $A_{260}$
30S :	$\epsilon_{260} = 1,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	= 72 pmol/ $A_{260}$

#### 2.3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinlösungen zeigen starke Absorption bei 230 nm. Diese Eigenschaft beruht vor allem auf dem optischen Verhalten der Peptidbindung und ist somit weitgehend unabhängig von der Aminosäuresequenz des Proteins. Die Absorption bei 230 nm variiert vielmehr mit der Anzahl der vorhandenen Peptidbindungen, also mit der Masse an gelöstem Protein.

Erfahrungsgemäß korreliert eine Absorption von 1,0  $A_{230}$  mit einer Proteinkonzentration von etwa 250  $\mu\text{g/ml}$ . Auf dieser Grundlage lässt sich die Konzentration einer unbekanntem Proteinlösung befriedigend abschätzen.

Üblicherweise werden Konzentrationen ribosomaler Proteinlösungen als Stoffmengenkonzentration angegeben. Dabei ist die Angabe in Äquivalenzeinheiten (eu, equivalent units) besonders praktikabel. Die Stoffmengenkonzentration leitet sich über den molaren Extinktionskoeffizienten aus der UV-Absorption der Lösung ab. Es gelten folgende Zusammenhänge:

Äquivalenzeinheiten:

1  $A_{260}$  30S-Untereinheiten enthalten 1 eu TP30

1  $A_{260}$  50S-Untereinheiten enthalten 1 eu TP50

Molare Extinktionskoeffizienten:

$$\varepsilon_{230}(\text{TP30}) = 1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\varepsilon_{230}(\text{TP50}) = 2,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Stoffmengenkonzentrationen:

$$1 A_{230}/\text{ml TP30} = 8 \text{ eu/ml TP30}$$

$$1 A_{230}/\text{ml TP50} = 10 \text{ eu/ml TP50}$$

## 2.3.2 Elektrophoresetechniken

Mit Hilfe der Elektrophorese lassen sich Gemische biologischer Komponenten auftrennen und charakterisieren. Die Separation erfolgt aufgrund des unterschiedlichen Laufverhaltens im elektrischen Feld, welches vor allem durch Nettoladung, Größe und Gestalt der Moleküle bestimmt und daher durch die Wahl der Analysebedingungen gezielt beeinflusst werden kann.

### 2.3.2.1 Diskontinuierliche Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Proteinanalyse nach dem diskontinuierlichen Verfahren erfolgt in einem zweiphasigen Gelsystem unter SDS-denaturierenden Bedingungen (0,1 % w/v). Die Gelmatrix ist mit Tris-HCl, der Elektrophoresepuffer hingegen mit Tris-Glycin gepuffert. In der Sammelgelphase, in die die Proteine zuerst eintreten, herrscht ein pH-Wert von 6,8, Trenngel und Elektrophoresepuffer sind auf pH 8,8 eingestellt. Dieser Aufbau bewirkt ein

Fokussieren der Proteinbanden, was insbesondere beim Auftragen verdünnter Proteinlösungen eine schärfere Auflösung gewährleistet.

Nach Zusammensetzen der Gelkammer (Bio-Rad Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad, München) wird das Trenngel gegossen, dessen Prozentzahl entsprechend der Größe der darzustellenden Proteine zu variieren ist. 10 ml eines 15 % Trenngels bestehen aus 30 % AA/BAA (37,5/1) 6 ml, Tris 1,5 M (**pH 8,8**) 2,5 ml, 10 % w/v SDS 100 µl und MQ 1,4 ml.

Zum Auspolymerisieren wird die Gellösung mit 5 µl TEMED und 50 µl 10 % w/v APS gemischt, 4,5 ml pro Gel zwischen die Platten pipettiert und mit MQ überschichtet. Wenn die Phasengrenzen wieder sichtbar sind, ist die Polymerisation abgeschlossen. Das Wasser wird entfernt und durch Sammelgellösung ersetzt: 10 ml bestehen aus 30 % AA/BAA (37,5/1) 1,7 ml, Tris 1,5 M (**pH 6,8**) 2,5 ml, 10 % w/v SDS 100 µl, MQ 5,7 ml, die mit 5 µl TEMED und 50 µl 10 % w/v APS vermischt werden und auspolymerisieren.

Das zu analysierende Proteingemisch ist zu lyophilisieren, in 10 µl SDS-PAGE-Probenpuffer (SDS 2 % w/v, Tris-HCl (**pH 6,8**) 90 mM, Glycerin 10 % v/v, β-Mercaptoethanol 29 mM, Bromphenolblau 0,1 % w/v) aufzunehmen, 5 min bei 95 °C zu erhitzen und auf das Gel aufzutragen (0,07 A<sub>230</sub> TP 50/TP 30; 0,01 A<sub>230</sub> reines Protein). Es durchläuft bei 75 V das Sammelgel und bei 150 V das Trenngel.

Nach 10 min Färben in Coomassie-Blau-Färbelösung (Coomassie blue R-250 0,25 % w/v, Methanol 50 % v/v, Essigsäure 10 % v/v) erfolgt das Entfärben des Gels in Wasser oder Entfärbelösung (Essigsäure 10 % v/v, Methanol 10 % v/v). Es lassen sich 0,1 µg Protein pro Bande nachweisen. Sollen geringere Proteinmengen detektiert werden, so kann das Gel mit Silbernitrat (nach)gefärbt werden, was zu einer 10 bis 100fach höheren Sensitivität führt. Hierzu wurden kommerziell erhältliche Kits verschiedener Hersteller eingesetzt und die Gele nach Beendigung der Reaktion im Durchlicht fotografiert.

### **2.3.2.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-PAGE)**

Die 2-D-PAGE stellt ein hochauflösendes Verfahren zur Charakterisierung komplexer Proteingemische dar, welches sogar die Trennung von Proteinen gleichen Molekulargewichts erlaubt. Dabei werden Ladungsunterschiede der Proteine ausgenutzt, die aufgrund ihrer differierenden Aminosäuresequenz bestehen. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese lassen sich die ribosomalen Proteine auftrennen und entsprechend

nachweisen<sup>132, 133</sup>. In der ersten Dimension erfolgt die Separierung nach der molekularen Nettoladung der Proteine, wobei bei dem eingestellten pH-Wert von 5,0 alle Proteine positiv geladen sind. In der zweiten Dimension werden die Proteine nach ihrer Größe getrennt (Harnstoff-PAA-Elektrophorese).

Es kamen 2-D-Apparaturen mit folgenden Dimensionen zum Einsatz: 10 x 10 x 0,2 cm, 8 x 7 x 0,2 cm, sowie 3 x 4 x 0,05 cm, allesamt Sonderanfertigungen und Eigentum der AG Ribosomen, Gruppe Nierhaus, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin.

Probenvorbereitung: Für die Analyse komplexer Proteingemische (TP30, TP50) sind jeweils 0,1 A<sub>230</sub>-Einheiten derselben zu lyophilisieren, in 100 µl 2-D-Probenpuffer aufzunehmen und der Elektrophorese zu unterziehen. Bei in Hochsalzpuffern gelösten Proteinen sind die Salze vor der Elektrophorese durch Dialyse gegen 2 % v/v Essigsäure zu entfernen. Enthalten die Proben, wie z. B. ribosomale Untereinheiten, noch rRNA, ist diese vorher abzutrennen: 3 A<sub>260</sub> der zu analysierenden Probe werden mit 5 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> und 100 µl Essigsäure (f.c. 67 % v/v) 45 min bei 4 °C geschüttelt, die gefällte RNA 30 min mit 13000 rpm (Tischzentrifuge) bei 4 °C sedimentiert und der proteinhaltige Überstand mit 750 µl Aceton 2 h bei -20 °C gefällt. Das sedimentierte Protein (30 min, 13000 rpm, 4 °C) kann nach dem Trocknen in 2-D-Probenpuffer aufgenommen werden.

Das folgende Protokoll bezieht sich auf Gele einer Größe von 10 x 10 x 0,2 cm der 2. Dimension.

1. Dimension: Die erste Dimension trennt die Proteine in 4 % PAA-Stabgelen nach Ladung. Pro Gel sind 2 ml der 4 % PAA-Gellösung (Acrylamid 4,0 g, Bisacrylamid 0,1 g, BisTris-HCl (pH 5,0) 1,2 g, Harnstoff 36,0 g, EDTA 0,2 g, MQ ad 100 ml) mit 7 µl TEMED und 20 µl 10 % w/v APS zu versetzen und in das einseitig verschlossene Röhrchen (0,5 x 12 cm) zu füllen. Der Ansatz wird mit einigen Tropfen MQ überschichtet, um anschließend bei 4 °C auszupolymerisieren (30 min). Nach Entfernen der Gummikappen werden die Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt, „oberer Elektrophoresepuffer“ (**10 x**: BisTris-HCl (pH 4,0) 20,9 g, Eisessig 45 ml, MQ ad 1000 ml) in das obere, „unterer Elektrophoresepuffer“ (**10 x**: Kaliumacetat (pH 5,0) 175,7 g, Eisessig 49 ml, MQ ad 1000 ml) in das untere Reservoir eingefüllt und die Proben in 2-D-Probenpuffer (Harnstoff 36 g, Dithiothreitol (1 M) 1,0 ml, „oberer Elektrophoresepuffer“ **10 x** 10 ml, Pararosanilin 50 µg, MQ ad 100 ml) aufgetragen.

Die Separierung erfolgt bei 4 °C für 30 min mit einer Stromstärke von 1 mA pro Gel sowie weitere 2,5-3 h mit 4 mA, bis der Farbmärker das untere Gelende erreicht.

**2. Dimension:** Die zweite Dimension wird in Plattengelen (10 x 10 x 0,2 cm) durchgeführt. Dafür ist die notwendige Anzahl Elektrophoresekammern zusammenzusetzen und mit einem Bodengel abzudichten (150 ml 18 % Harnstoff-PAA, 900 µl TEMED, 7,5 ml 10 % w/v APS). Nach dem Stoppen der 1. Dimension sind pro Kammer 200 ml entgaste 18 % Harnstoff-PAA-Gellösung (Acrylamid 186 g, Bisacrylamid 4,8 g, Harnstoff 372 g, Essigsäure 54 ml, KOH (5 M) 10 ml, MQ ad 1000 ml) mit 1,2 ml TEMED, sowie 4,0 ml 10 % w/v APS zu versetzen und in die Elektrophoresekammer einzufüllen. Die Gele der 1. Dimension werden aus den Röhrrhen gedrückt, auf den Plattengelen positioniert und luftblasenfrei mit 18 % Harnstoff-PAA-Gellösung einpolymerisiert. Nach Entfernen des Bodengels wird 2-D-Elektrophoresepuffer/2. Dimension eingefüllt (Glycin 140 g, Eisessig 15 ml, MQ ad 10 l) und bei 4 °C für 17 h eine Spannung von 70 V angelegt, bis der Farbmärker das untere Gelende erreicht. Es erfolgt die Anfärbung der Gele für 3 h in Coomassie-Färbelösung sowie anschließendes Entfärben über Nacht in Wasser. Zur Dokumentation werden die Gele im Durchlicht fotografiert.

### **2.3.2.3 Mini-2-D-Page in Briefmarkengröße**

Die hochauflösende Mini-2-D-Page mit den Dimensionen 3 x 4 x 0,05 cm bietet gegenüber der herkömmlichen 2-D-Page eine Reihe von Vorteilen:

Neben äußerst kurzen Laufzeiten der Elektrophorese (1. Dimension 15 min, 2. Dimension 90 min) werden nur sehr geringe Nachweismengen an Protein benötigt (100-200 ng pro Einzelprotein bei Anfärbung mit Coomassie-Blau, bei Silberfärbung entsprechend weniger). Auf diese Weise lässt sich innerhalb weniger Stunden eine Proteinpräparation charakterisieren, für deren Analyse sonst mehrere Tage mit sehr viel höheren Verlusten an Protein veranschlagt werden müssen. Die erste Dimension erfolgt ebenfalls in 4 % PAA-Kapillargelen, die zweite in 20,5 % Harnstoff-PAA-Plattengelen. Die benötigten Lösungen sind identisch zu denen der vorbeschriebenen „Makro-2-D“, lediglich die Zusammensetzung der 2-D-Gellösung variiert: Acrylamid 20,5 g, Bisacrylamid 0,52 g, Harnstoff 36,4 g, Essigsäure 5,4 ml, KOH (5 M) 1 ml, MQ ad 100 ml. Das vorliegende Protokoll orientiert sich

an der Arbeit von Brockmüller und Kamp<sup>134</sup>; die Angaben beziehen sich auf einen Ansatz von 20 Gelen, die parallel gefahren werden können.

#### Präparation der Kapillargele (1. Dimension):

In einem kleinen Becherglas werden 10 ml 1. Dimension-Gellösung mit 35 µl TEMED und 70 µl 10 % w/v APS versetzt, durchmischt und die 50 µl-Kapillaren (0,9 mm innerer Durchmesser) aufrecht hineingestellt, so dass sie sich durch Kapillarkräfte auf 2,7 cm auffüllen. Die Polymerisation benötigt 20 min, anschließend verhindert das Übersichten des Bodengels mit MQ vor dem Herausziehen der Kapillaren ein Eindringen von Luftblasen. Nach vorsichtigem Herauslösen der Kapillaren werden sie 5-10 mm oberhalb der Geloberfläche mit einem Glasschneider gekürzt, auf etwaige Luftblasen überprüft, in die Elektrophoresekammer der 1. Dimension überführt und „oberer“ und „unterer“ Elektrophoresepuffer eingefüllt. Beim Spülen der Kapillargele mit „oberem“ Puffer sind Luftblasen unbedingt zu entfernen. Es folgt die Probenbeladung mit einem Volumen von übereinstimmend 2-5 µl pro Kapillare sowie die Elektrophorese (30 V für 5 min, weitere 7-10 min mit 300 V, bis der Farbmärker das Gelende erreicht).

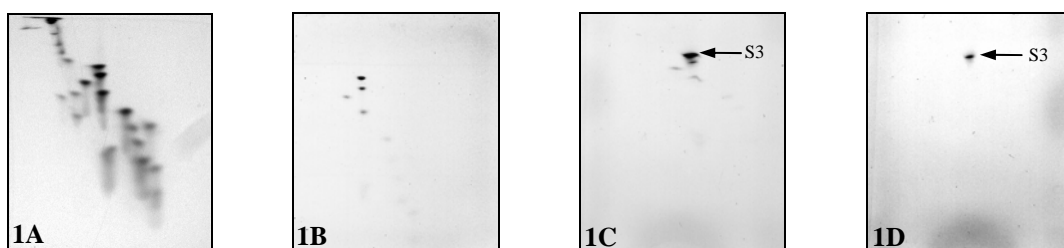
#### Präparation der Mikrogele (2. Dimension):

Der Apparat für die 2. Dimension wird fest zusammengeschräubt, 20 ml 2.Dimension-Gellösung mit 120 µl TEMED und 250 µl 10 % w/v APS versetzt, bis zum „V“ eingefüllt und vorsichtig mit einer Pipette von einer Seite aus mit 4 M Harnstoff in MQ überschichtet. Das Gel sollte 2-3 h (oder über Nacht) bei Raumtemperatur auspolymerisieren. Anschließend wird der Überstand entfernt, durch 0,5 % Agarosegel ersetzt (Agarose 0,5 g, Essigsäure 5,4 ml, KOH (1 M) 1 ml, MQ ad 100 ml, kochen bis die Lösung klar ist, nach Abkühlen bei einer Temperatur von ca. 50 °C verwenden ) und 2 µl des Farbmärkers in einer Ecke hinzugefügt. Die Stabgele der 1. Dimension werden nun mit dem oberen Ende der Kapillare in einen Wachsblock gepresst, wodurch sie sich mit einem Draht und dem Wachs als dämpfendes Polster direkt auf die warme und flüssige Agarose pressen lassen und 10 min einpolymerisieren. Es erfolgt die Elektrophorese mit 100 V für 90 min Nach Entfernen der Gele aus der Gelkammer können diese mit Coomassie-Blau (10 min Färbelösung, 1 h Entfärbelösung bzw. entfärben in Wasser) oder mit Silber angefärbt werden.

### 2.3.3 Identifikation der ribosomalen Proteine von *Shigella*

Die gelelektrophoretische Analyse der T-Zell-Stimulation induzierenden Proteinfractionen erfolgte zunächst durch SDS-PAGE, die vor allem die Identifikation der großen ribosomalen Proteine erlaubt. Da die kleineren ribosomalen Proteine mit diesem Verfahren wegen ihrer teilweise sehr geringen molekularen Größenunterschiede nicht sicher bestimmt werden können, kam hier die 2-D-PAGE zum Einsatz. Nachdem experimentell sichergestellt worden war, dass sich die ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* bei zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung abgesehen von S6 und S7 identisch zu den gut definierten Proteinen von *E. coli* verhalten, erfolgte die Identifikation der zu analysierenden Proteinfractionen von *Shigella* als *E. coli*-Homolog.

Die Analyse einer unbekanntem Proteinfraction von *Shigella*, z. B. TP30-X, erfolgt folgendermassen: Zunächst wird eine 2-D-PAGE nur mit dünn aufgetragenem TP30 von *E. coli* (als Hintergrund) angefertigt; die zweite 2-D-PAGE enthält ebenfalls dünn aufgetragenes TP30 von *E. coli* (als Hintergrund), zusätzlich jedoch die zu analysierende, unbekanntem Proteinfraction von *Shigella*, so dass sich die in der unbekanntem Probe enthaltenen Proteine von *Shigella* deutlich vor dem Hintergrund der bekannten TP30 Proteine von *E. coli* abzeichnen. Eine dritte 2-D-PAGE stellt die zu analysierende Proteinfraction von *Shigella* singularär dar. Durch Übereinanderlegen der Gele lässt sich so eine eindeutige Identifikation vornehmen. Abb. 1 verdeutlicht die Proteinidentifikation anhand eines Beispiels.



**Abb. 1: Schema zur Identifikation der T-Zell-stimulierenden ribosomalen Proteine von *Shigella* als *E.coli*-Homolog anhand des Beispiels von S3.**

**1A:** 2-D-PAGE der TP30 von *E.coli*.

**1B:** 2-D-PAGE der TP30 von *E.coli* als Hintergrund (geringere aufgetragene Proteinmenge als 1A).

**1C:** 2-D-PAGE der TP30 von *E.coli* als Hintergrund plus das zu identifizierende Protein von *Shigella*

**1D:** 2-D-PAGE des zu identifizierende Protein von *Shigella*, einzeln aufgetragen.



### 2.3.4 Immunfärbung „Western Blot“

Durch die Immunfärbung lassen sich einzelne Proteine noch in geringsten Mengen (~ 5 ng) und ungeachtet der Gegenwart anderer Proteinkomponenten spezifisch nachweisen. Sie kann eingesetzt werden, um über den Nachweis von Antikörpern im Serum von Patienten die humorale Immunantwort zu untersuchen.

Die beschriebene Technik beinhaltet die gelelektrophoretische Auftrennung (PAGE) von Proteinen und deren Transfer auf eine Membran, wo sie mit spezifischen Antikörpern komplexieren. Der Nachweis der primären Komplexe erfolgt durch Bindung eines Antikörper-Enzymkonjugats, welches nach Zugabe des Substrates eine Farb- bzw. Lichtreaktion hervorruft<sup>135</sup>.

#### 2.3.4.1 Western Blot der SDS-PAGE

Das Trenngel der SDS-PAGE wird 20 min in 100 ml Transferpuffer (Tris HCl 25 mM, Glycin 190 mM mit 20 % v/v Methanol) äquilibriert und in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale zum „blotting sandwich“ zusammengesetzt. Dieser besteht von der Anode (positiver Pol, durchsichtiges Gitter) zur Kathode (negativer Pol, schwarzes Gitter) aus folgenden Schichten: zwei Lagen Schaumstoff, zwei Filterpapierstreifen (Gel-Blotting-Papier, Schleicher und Schuell, Dassel), zwei Lagen Nitrozellulosemembran (Roche, Mannheim), SDS-PAGE, wieder zwei Filterpapierstreifen und abschließend zwei Lagen Schaumstoff. Die Proteine sind durch die Bindung von SDS negativ geladen und laufen zur Anode. Der Transfer der Proteine auf die Membran („blotting“) erfolgt in einer Blotkammer (Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad, München) unter Eiskühlung bei 4 °C für 2 h bei 100 V (250 mA, Pufferwechsel nach 1 h). Die Membran kann anschließend zur Transferkontrolle mit Ponceau S (0,01 % w/v Ponceau S in 5 % v/v Essigsäure) angefärbt werden.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen ist die Membran mit den transferierten Proteinen für 1 h bis über Nacht mit 1 % w/v fettfreiem Sprühmagermilchpulver (Uelzena, Uelzen) in TBS-Tween 0,05 % v/v zu blockieren. Es schließt sich die Inkubation mit dem primären Antikörper an: 15 ml 1 % w/v fettfreies Milchpulver in TBS-Tween werden mit 150 µl des zu analysierenden Patientenserums vermischt, und die Membran für 2 h darin geschwenkt. Nach 3 x Waschen in 20 ml 1 % w/v fettfreiem Milchpulver in TBS-Tween erfolgt die Inkubation mit einem Peroxidase-gebundenen Ziege anti-human IgG-Antikörper als sekundärer

Antikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti Human IgG, Fc Fragment Specific, Dianova, Hamburg): 4 µl desselben werden mit 15 ml 1 % w/v fettfreiem Milchpulver in TBS-Tween vermischt, die Membran für 1,5 h inkubiert, dann 3 x mit TBS-Tween gewaschen (~ 20 min) und nach sorgfältigem Abtropfen 1 min in Chemiluminescence Blotting Substrate POD (Boehringer Mannheim, Deutschland) geschwenkt. Nach kurzem Trocknen ist die Membran in Zellophan zu hüllen und auf einem Röntgenfilm ca. 30 s zu exponieren.

#### **2.3.4.2 Western Blot der 2-D-PAGE (Harnstoff-PAA-Gel)**

Nach Beendigung der Elektrophorese wird das 2-D-Gel mit den Maßen 8 x 7 x 0,2 cm für 1 h (4 x 15 min) in Transferpuffer (Essigsäure 1 % v/v, β-Mercaptoethanol 6 mM) auf einem Schwenker äquilibriert. In einer Schale mit Transferpuffer erfolgt dann das Zusammensetzen des „blotting sandwich“ von Kathode (minus, schwarzes Gitter) nach Anode (plus, durchsichtiges Gitter): 2 Lagen Schaumstoff, zwei Filterpapierstreifen, 1 PVDF-Membran (Roche, Mannheim), die zuvor in Methanol (Uvasol, Merck, Darmstadt) angefeuchtet und dann in Transferpuffer gespült wurde, 2-D-Gel, zwei Filterpapierstreifen, 2 Lagen Schaumstoff. Es empfiehlt sich nass zu arbeiten, Luftblasen zu entfernen und die Lagen fest zu packen. Nachdem das „sandwich“ in die Blotkammer (Mini Protean 3 Cell, Bio-Rad, München) eingesetzt und mit Rührer und Kühlaggregat versehen wurde, erfolgt der Transfer mit gekühltem Transferpuffer bei 4 °C mit 650 mA für 60 min, Pufferwechsel nach 20 und 40 min.

Die Proteine sind durch den Transferpuffer positiv geladen und laufen zur Kathode.

Nach Beendigung des Transfers wird das „blotting sandwich“ auseinandergenommen, die Membran für 5 min mit TBS-Tween 0,05 % v/v gewaschen, zur Transferkontrolle mit Ponceau S angefärbt, erneut mit TBS-Tween gewaschen und mit einer sterilen, feinen Kanüle die transferierten Proteine markiert. Zur Dokumentation wird die Membran fotografiert.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, folgt die Inkubation mit Blockpuffer (10 % (w/v) Sprühhagermilchpulver (Uelzena, Uelzen) in TBS-Tween) über Nacht auf einem Schwenker bei 4 °C.

Es schließen sich 2 Spülungen mit je 30 ml 10 % Milchpulver in TBS-Tween an, gefolgt von der Inkubation mit dem primären Antikörper. Das zu untersuchende Serum wird zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile 5 min bei 1500 g zentrifugiert, 1:1000 mit 10 %

Milchpulver in TBS-Tween verdünnt (15 µl Serum auf 15 ml 10 % Milchpulver in TBS-Tween) und über Nacht bei 4 °C geschwenkt.

Es folgen 2 Spülungen mit je 30 ml 10 % Milchpulver in TBS-Tween, 2 Waschungen für je 10min mit jeweils 30 ml 10 % Milchpulver in TBS-Tween, sowie die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti Human IgG, Fc Fragment Specific, Dianova, Hamburg) 1:5000 in 10 % Milchpulver in TBS-Tween (3µl sekundärer Antikörper auf 15 ml 10 % Milchpulver in TBS-Tween) für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schwenker. Die Membran wird anschließend 2 x mit je 30 ml 10 % Milchpulver in TBS-Tween gespült, und 2 x für je 10min mit 30 ml 10 % Milchpulver in TBS-Tween gewaschen, gefolgt von 2 Spülungen mit TBS-Tween, um das Milchpulver zu entfernen. Bis zur Applikation des Substrates (ECL Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences, Freiburg) verbleiben die Membranen in TBS-Tween.

Je 1 ml der Lösungen A und B des ECL-Reagenz werden gemischt, die Membran darin 1 min geschwenkt, dann getrocknet, in eine Klarsichtfolie gelegt (Luftblasen vermeiden) und in eine Filmkassette überführt. Es folgt das Auflegen des Films (Kodak X-OMAT AR Film, Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA) mit Standardexpositionszeiten von 90 s, 3 min und 6 min, bei Bedarf entsprechend länger oder kürzer. Der Film wird 2,5 min in Entwicklerlösung (Tetenal Roentogen Röntgen-Rapid-Entwickler, Ott und Wyss AG, Zofingen, CH) entwickelt, mit Wasser gespült und in Fixierlösung (Tetenal Roentogen Superfix-Röntgen-Fixierlösung, Ott und Wyss AG, Zofingen, CH) fixiert.

Benötigte Puffer: Gekühlter Transferpuffer: 100 ml 100 % Essigsäure und 4,2 ml β-Mercaptoethanol ad 10 l MQ.

TBS-Tween (**10 x**): Tris 24,2 g, HCl (32 %) 15,3 ml, NaCl 43,9 g, Tween20 2,5 ml, MQ ad 500 ml, pH 7,6). Blockpuffer: 10 % Milchpulver in TBS-Tween (**1 x**); Tween-Anteil 0,05 % v/v.

### **2.3.4.3 Identifikation der im Western Blot detektierten Antikörper**

Nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer der Proteine der ribosomalen Untereinheiten (TP30, TP50) auf eine PVDF-Membran werden die zur Kontrolle des erfolgreichen Transfers mit Ponceau S angefärbten Proteine auf der Membran alle mit

einer feinen Kanüle markiert und die Membran fotografiert. Es folgen die Inkubationen mit primärem und sekundärem Antikörper.

Bei bekanntem Laufverhalten von TP30 und TP50 von *E. coli* und *S. flexneri* in der 2-D-PAGE erfolgt die Identifikation der in den Patienten- und Kontrollseren detektierten Antikörper durch Übereinanderlegen des Films, der die zu identifizierenden Signale enthält und der mit Kanülenmarkierungen versehenen Membran bzw. durch Übereinanderlegen des Films und des Fotos der Membran, welches die mit Ponceau S angefärbten Proteine zeigt.

### **2.3.5 Lymphozytenproliferationsassay (LPA)**

Der LPA ist ein Verfahren, um die zelluläre Immunantwort zu untersuchen. Es werden MNZ aus Synovia (SFMNZ) oder peripherem Blut (PBMNZ) isoliert, um diese mit beliebigen Antigenen in Kultur zu bringen. Eine spezifische Reaktion der Lymphozyten äußert sich in deren Proliferation auf das entsprechende Antigen<sup>47</sup>.

Zur Durchführung der Methode sind die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen MNZ im Wasserbad bei 37 °C zu erwärmen, in Auftaumedium (inaktiviertes humanes AB Serum (Gibco BRL, Eggenstein) 20 % v/v, Glutamin (Biochrom, Berlin) 1 % v/v, Penicillin (Biochrom, Berlin) 1 % v/v in RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein) aufzunehmen und zu zentrifugieren (10 min, 300 g, 4°C). Nach Entfernen des Überstandes werden die Zellen in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$ /ml in Kulturmedium aufgenommen (inaktiviertes humanes AB-Serum (Gibco BRL, Eggenstein) 10 % v/v, Glutamin 1 % v/v, Penicillin 1 % v/v in RPMI 1640) und auf eine mit den zu analysierenden Antigenen versehene 96-Loch-Platte (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) überführt. Pro Loch werden 5 µg/ml Endkonzentration der zu analysierenden Proteinfraction in 0,7 M PBS (Gibco BRL, Eggenstein) aufgetragen. Es ergibt sich ein Gesamtvolumen von 200 µl/Loch ( $1 \times 10^5$  MNZ/Loch). Die Kultivierung erfolgt über 6 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre.

Die Proliferation lässt sich durch den Einbau von hinzugefügtem <sup>3</sup>H-Thymidin (Amersham International, Buckinghamshire, England) in die DNA der sich teilenden Zellen während der letzten 18 h der Kultur bestimmen<sup>47</sup>. Als Indikator für die Proliferationsfähigkeit der SFMNZ dient Pokeweed-Mitogen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), ein unspezifischer T- und B-Zell-Stimulator.

Nach der Zellernte mit einem halbautomatischen Erntegerät (LKB Wallac, Turku, Finnland), der Trocknung sowie Versetzung der Filtermatten mit Szintillationsflüssigkeit, kann die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Aufnahme als Desintegration pro Minute (cpm) mit Hilfe der Flüssigkeits-Szintillations-Spektroskopie (LKB Wallac) ermittelt werden. Die Ergebnisse lassen sich in Form des Stimulations-Index darstellen, der als Quotient aus Proliferation der Zellen mit Antigen (Stimulus), dividiert durch Proliferation ohne Antigen (Hintergrund), definiert ist. Bei ausreichend vorhandenen Zellzahlen von SFMNZ der Patienten wurde jedes zu untersuchende Antigen in Duplikaten oder Triplikaten angesetzt.

## **2.4 Präparative Methoden**

### **2.4.1 Fermentation von Bakterienzellen**

*Shigella flexneri 2a 259* wurde in einem speziellen, mehrstufigen Fermentationsverfahren von Dr. K. Vanatalu, Talinn, Estland angezüchtet<sup>136</sup>. Das Bakterienwachstum wird anhand der optischen Dichte bei 560 nm überwacht. Die Zellen durchlaufen die Phasen „Batch“, „Fed-Batch“ und „Chemostat“, wobei der Übergang der Zellen von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase verhindert wird. Dadurch zeigt die Kultur bis zu den hohen finalen Dichten logarithmisches Wachstum, was sich in einer erheblich höheren Ausbeute an Ribosomen äußert.

Die im Folgenden beschriebenen Präparationen<sup>137</sup> werden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt, wobei RNase-Kontaminationen zu vermeiden sind. Abbildung 2 verdeutlicht den Ablauf der Präparationen zum Erhalt der gesamten ribosomalen Proteine (TP30 und TP50).

### **2.4.2 Isolierung von 70S-Ribosomen („crude“ 70S)**

Die tiefgefrorenen Bakterienzellen werden zum Auftauen mit 200 ml Tico-Puffer (Hepes-KOH, pH 7,5 (4 °C) 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  6 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  30 mM,  $\beta$ -Mercaptoethanol 4 mM) pro 100 g eingesetzte Zellmasse überschichtet und unter langsamem Rühren suspendiert. Die anschließende Zentrifugation (15 min, 16000 g, 4 °C) liefert ein gereinigtes Bakteriensediment. Dieses wird mit dem doppelten Gewicht w/w Alcoa (A-305 Aluminiumoxid, Serva, Heidelberg) vermischt und in einen Mörser überführt. Der Zellaufschluss erfolgt durch ca. 20 min Reiben im vorgekühlten Mörser. Sobald die Zellen

aufbrechen und die DNA ausläuft, zeigen sich beim Rühren „Fäden“. Nach Zugabe der doppelten Menge v/w Tico-Puffer zum Resuspendieren lässt sich die Zellmasse zu einem hellbeige gefärbten, dickflüssigen Homogenat verarbeiten.

Nachfolgende Zentrifugationen (15 min, 17500 g und 60 min, 32000 g, 4 °C) trennen das Alcoa sowie größere Zelltrümmer und Membranen ab. Der resultierende Überstand wird als „S-32“ bezeichnet und enthält alle löslichen Bestandteile des bakteriellen Zytosols („S-32“: „S“ für supernatant; „32“ für 32000 g). Aus diesem lassen sich sowohl die 70S-Ribosomen durch Ultrazentrifugation (17 h, 68000 g, 4 °C) sedimentieren als auch die S-100 Enzymfraktion gewinnen (siehe unten).

Das bernsteinfarbene ribosomale Pellet wird mit Dissoziationspuffer (Hepes-KOH, pH 7,5 (4 °C) 20 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, NH<sub>4</sub>Cl 200 mM, β-Mercaptoethanol 4 mM) überschichtet (2 ml pro Zentrifugenröhrchen), um anschließend auf einem Schüttler für 3 h zu resuspendieren. Die Lösung zeigt eine milchige Trübung.

Aufgrund der niedrigen Mg<sup>2+</sup> Konzentration des Dissoziationspuffers zerfällt das 70S-Ribosom in seine beiden Untereinheiten. Es schließt sich eine kurze Zentrifugation an, die nicht gelöstes Material abtrennt (15 min, 8000 g, 4 °C). Die Konzentration der präparierten „cruden“ 70S-Ribosomen wird bei 260 nm photometrisch bestimmt, Aliquots von 5000-7000 A<sub>260</sub> in N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

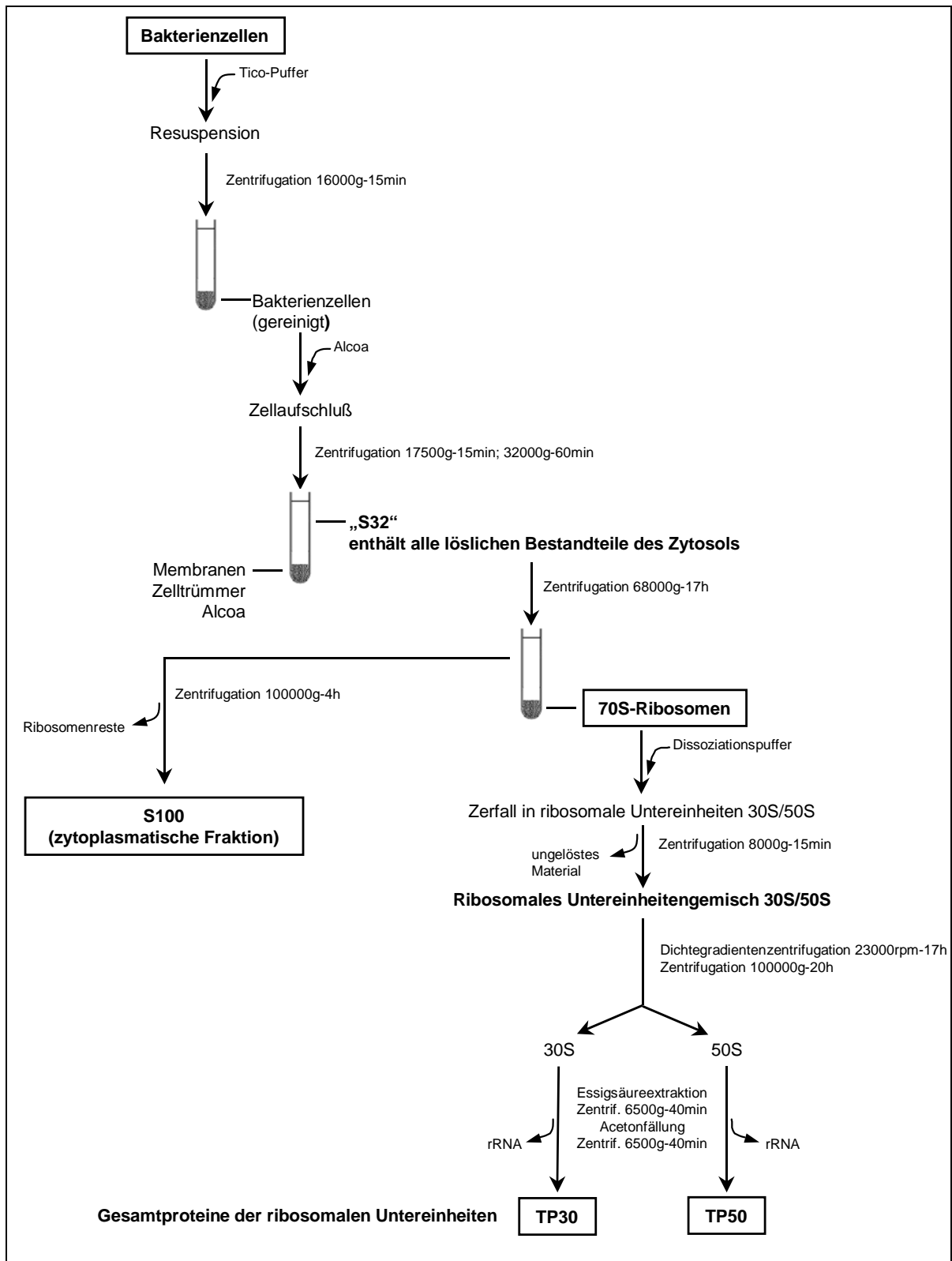


Abb. 2: Schema zur Präparation der gesamten ribosomalen Proteine (TP30 und TP50) von *Shigella* bzw. *Escherichia*.

### **2.4.3 Präparation der S100 Enzymfraktion (zytoplasmatische Fraktion)**

Die Präparation der „cruden“ 70S-Ribosomen und der S-100 Enzymfraktion verläuft weitgehend parallel. Nach Sedimentation der Ribosomen aus dem S-32 verzweigt sich das Protokoll. Der Überstand wird durch eine weitere Zentrifugation (4 h, 100000 g, 4 °C) von eventuell verbliebenen Ribosomen befreit und dreimal gegen ein 100faches Volumen Tico-Puffer für jeweils mindestens 45 min dialysiert, um niedermolekulare Komponenten, wie z. B. Aminosäuren, zu entfernen. Der erhaltene Extrakt (S-100 Enzymfraktion) wird aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Er enthält nach Abtrennung von Membranen und Ribosomen alle löslichen Proteine der Zelle.

### **2.4.4 Analyse ribosomaler Partikel durch Ultrazentrifugation**

Mit dieser Methode lässt sich sowohl die Intaktheit von 70S als auch die Vollständigkeit der Dissoziation von 70S zu 50S und 30S überprüfen.

Dazu sind zunächst 10-30 % w/v Sucrosegradienten aufzubauen (Sucrose UltraPure, Gibco BRL, Eggenstein) und 2 h bei 4 °C stehenzulassen. 1,5-2  $A_{260}$  der Probe werden in Tico-Puffer bei 70S oder Dissoziationspuffer bei 50S und 30S aufgetragen und 17 h bei 70000 g in einem Beckmann SW-40 Rotor zentrifugiert (22000 rpm). Der Gradient wird anschließend über ein Photometer ( $A_{260}$ ) mit Durchflussküvette ausgepumpt. Anhand der erhaltenen Profile lassen sich die Bedingungen für die präparative Zonalzentrifugation optimal bestimmen.

### **2.4.5 Zonalzentrifugation zur Präparation ribosomaler Untereinheiten (30S und 50S)**

Ribosomale Untereinheiten lassen sich aus „cruden“ 70S-Ribosomen isolieren, die nach der Sedimentation aus dem S-32-Überstand in Dissoziationspuffer resuspendiert worden sind. Die Ribosomen liegen dann bereits in dissoziierter Form, d. h. als Untereinheitengemisch, vor. Die präparative Trennung des Gemisches erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation. Dabei werden die Untereinheiten aufgrund ihrer unterschiedlich schnellen Sedimentation im Schwerfeld separiert (die Sedimentationskoeffizienten der kleinen und großen Untereinheit betragen 30S und 50S).

6000-9000  $A_{260}$ -Einheiten „crude“ 70S werden auf einen 2 l-Sucrosegradienten aufgetragen (6-38 % w/v Sucrose in Dissoziationspuffer) und zentrifugiert (17 h, 23000 rpm, Ti15- Zonal-Rotor, 4 °C). Es folgt das Auspumpen des Gradienten bei 3000 rpm, indem der Gradient



durch eine spezifisch schwerere 50 % Sucroselösung verdrängt wird, mit anschließendem Fraktionieren unter kontinuierlicher Absorptionsmessung bei 290 nm. Das erhaltene Absorptionsprofil des Gradienten lässt sich auf der Grundlage von Referenzprofilen interpretieren und die Untereinheiten enthaltenden Fraktionen entsprechend bestimmen. Separates Vereinigen der 30S- und der 50S-Fraktionen sowie nachfolgende Ultrazentrifugation derselben (20 h, 100000 g, 4 °C) liefert die isolierten Untereinheiten in Form klarer Sedimente, wobei das Sediment der 50S-Untereinheit völlig farblos sein sollte, das der 30S-Untereinheiten aber in der Regel gelblich gefärbt ist.

Die isolierten Untereinheiten werden bis zu einer Endkonzentration von etwa 300  $A_{260}/\text{ml}$  in Tico-Puffer resuspendiert, aliquotiert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **2.4.6 Gesamte Proteine der ribosomalen Untereinheiten: TP50 und TP30**

Die Präparation ribosomaler Proteine erfolgt durch Essigsäureextraktion von 30S-beziehungsweise 50S-Untereinheiten<sup>138</sup>. Dabei führt der erniedrigte pH-Wert über veränderte Oberflächenladungen der Komponenten zuerst zur Dissoziation der RNA-Proteinkomplexe, und anschließend durch eine partielle Entladung der Phosphatgruppen in Gegenwart hoher  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen zur Präzipitation der rRNA. Die Proteine dagegen bleiben unter diesen Bedingungen in Lösung. Das rRNA-Präzipitat lässt sich durch Zentrifugation abtrennen und TP30 oder TP50 durch Acetonfällung aus dem Überstand gewinnen.

Eine wässrige Lösung ribosomaler Untereinheiten ( $\leq 300 A_{260}/\text{ml}$  in Tico-Puffer) wird mit 1/10 Volumen einer 1 M  $\text{MgAc}_2$ -Lösung, sowie 2,2 Volumina Essigsäure (100 %) versetzt, für 45 min auf Eis gestellt und alle 10 min vorsichtig durchmischt. Die anschließende Zentrifugation (40 min, 6500 g, 4 °C) trennt die präzipitierte rRNA als hartes weißes Sediment ab und liefert eine essigsaurige Lösung der ribosomalen Proteine. Diese wird nach Zugabe von 5 Volumina gekühltem Aceton (-20 °C) über Nacht ( $\geq 6$  h) bei -20 °C belassen. Die ausgefallenen Proteine werden sedimentiert (40 min, 6500 g, 4 °C) und zur vollständigen Entfernung des Acetons bei Raumtemperatur getrocknet.

Es erfolgt das Resuspendieren der Proteine in Rek-4 (Hepes-KOH, pH 7,5 (4 °C) 20 mM,  $\text{MgCl}_2$  4 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  400 mM,  $\beta$ -Mercaptoethanol 4 mM) sowie die Bestimmung der optischen Dichte bei 230 nm. Anschließend werden die beiden Proteinfractionen (TP30, TP50) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 2.4.7 Chromatographische Trennung ribosomaler Proteine

Die Proteine des Ribosoms werden bei der Präparation der ribosomalen Untereinheiten bereits in zwei Fraktionen, TP30 und TP50, separiert, die sich durch den sequenziellen Einsatz verschiedener chromatographischer Verfahren wie Gelchromatographie, FPLC<sup>138</sup> und RP-HPLC<sup>139</sup> in ihre Einzelkomponenten auftrennen lassen.

Durch den kombinierten Einsatz hochauflösender Ionenaustauschchromatographie (FPLC) und Umkehrphasenchromatographie (RP-HPLC) gelang die für diese Arbeit erforderliche Isolation der einzelnen ribosomalen Proteine.

### 2.4.7.1 Ionenaustauschchromatographie (FPLC)

Geladene funktionelle Gruppen der zu separierenden Proteine gehen reversible Ionenbindungen mit immobilen Austauschergruppen der Säulenmatrix ein, wodurch die Proteine adsorbiert und ungebundene Substanzen durch den Startpuffer von der Säule gespült werden. In der folgenden Phase löst der auf die Säule fließende Elutionspuffer durch Änderung der Ionenstärke die Bindung der Proteine zur Matrix. Die Proteine eluieren in der Reihenfolge der Stärke ihrer Bindung, schwach gebundene Proteine zuerst.

Die zu bearbeitende Proteinfraction (bis zu 30 mg) wird aufgetaut und 3 x jeweils 1 h gegen das 200fache Volumen Rek-4-6U (Hepes-KOH, pH 7,5 (4 °C) 20 mM, MgAc<sub>2</sub> 4 mM, NH<sub>4</sub>Cl 400 mM, EDTA 0,2 mM, β-Mercaptoethanol 4 mM, Harnstoff 6 M) dialysiert, um auftretende Proteinkomplexe zu reduzieren. Es schließt sich eine dreimalige Dialyse (2 x 1 h, 1 x über Nacht) gegen das 200fache Volumen FPLC-Startpuffer an (BisTris-HCl, pH 6,0 (4 °C) 10 mM, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> 10 mM, Methylamin 2 mM, Harnstoff 6 M).

Unter Startpufferbedingungen wird die zu analysierende TP-Fraktion auf eine Kationenaustauschersäule (Mono S 16/10, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bei 4 °C aufgetragen und mit steigender Kaliumionenkonzentration bei einem Elutionsfluss von 1 ml/min unter kontinuierlicher UV-Absorptionsmessung bei 230 nm eluiert.

Die aufgefangenen Fraktionen werden anhand des Chromatogramms geschnitten, vereinigt und ausgiebig gegen MQ dialysiert (2 x 1 h, 1 x über Nacht). Es schließt sich die Bestimmung der optischen Dichte bei 230 nm an, wodurch sich der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen befriedigend abschätzen lässt. Nach dem Überführen in Kolben werden die Proteinfractionen

schockgefroren und lyophilisiert, um bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverarbeitung gelagert zu werden.

#### **2.4.7.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Prinzip der Reversed-Phase-HPLC**

Hydrophobe Anteile der aufzureinigenden Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an die ebenfalls apolaren Liganden der Säulenmatrix adsorbiert. Die Desorption der Proteine von der stationären Phase erfolgt durch Mischungen von Wasser mit organischen Lösungsmitteln, wobei die Elutionskraft zunimmt, je apolarer der Puffer ist.

Die zu separierende Proteinfraction (bis maximal  $300\text{ }\mu\text{g}$  Protein pro Lauf) wird nach Dialyse gegen MQ lyophilisiert, in  $100\text{ }\mu\text{l}$   $2\%$  v/v Essigsäure resuspendiert und unter Startpufferbedingungen (Trifluoressigsäure  $0,1\%$  v/v in MQ) auf die Säule aufgetragen. Die Trennungen erfolgen mit einem Fluss von  $0,5\text{ ml/min}$  bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  auf einer Vydac- $\text{C}_4$ -TP214TP5415-Proteinsäule (VYDAC, Hesperia, CA, USA) unter kontinuierlicher UV-Absorptionsmessung bei  $220\text{ nm}$ . Der Elutionspuffer setzt sich aus Trifluoressigsäure  $0,1\%$  v/v in Isopropanol zusammen.

Folgender Gradient, der in einigen Fällen leicht modifiziert wurde, kam zum Einsatz:  $10\%$  B auf  $55\%$  B in  $250\text{ min}$ , auf  $65\%$  B nach  $275\text{ min}$ , auf  $75\%$  B nach  $285\text{ min}$ .

#### **2.4.8 Separation mononukleärer Zellen für den LPA**

MNZ lassen sich von Erythrozyten, Granulozyten und avitalen Zellen durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten abtrennen.

##### **2.4.8.1 Separation mononukleärer Zellen aus Synovialflüssigkeit**

Nach Verdünnen der Synovialflüssigkeit  $1:5$  v/v in HBSS (Gibco BRL, Eggenstein) sind jeweils  $20\text{ ml}$  auf einen  $15\text{ ml}$  Ficoll-Gradienten bei Raumtemperatur zu schichten und zu zentrifugieren ( $20\text{ min}$ ,  $800\text{ g}$ , Raumtemperatur, ohne Bremse). Die sich in der Interphase anreichernden MNZ werden mit einer Pipette abgenommen, zweimal mit HBSS gewaschen und entweder eingefroren oder für den Lymphozytenproliferationsassay in Nährmedium aufgenommen und die Zellzahl in der Neubauerzählkammer bestimmt.

### **2.4.8.2 Separation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut**

Die Präparation von PBMNZ erfolgt analog der aus Synovia, allerdings wird das Blut initial 1:2 v/v in HBSS verdünnt.