

## 2 Geräte und Materialien

### 2.1 Allgemeine technische Geräte

- Auflichtmikroskope Nikon, Tokio, Japan
- Autoklav Gössner Hamburg
- Bestrahlungsanlage Gamma Cell 40 Atomic Energy, Mississauga, Canada
- Brutschränke Jouan, Unterhaching
- Eismaschine Scotsman, Mailand, Italien
- FACSort Becton Dickinson
- Fluoreszenzmikroskop Nikon, Tokyo, Japan
- Fotoeinrichtung Nikon, Tokyo, Japan
- Gefrierschränke Bosch, Stuttgart\*
- Glaswaren Schott, Mainz
- Heizblock Kleinfeld Labortechnik, Berlin
- Kühlschränke Liebherr, Oberhausen
- Lichtmikroskop Leica, Braunschweig
- pH-Meter PHM 62 wiss.techn Werkstätte, Weilheim
- Zentrifugen: Jouan, Unterhaching
- Pipetten:  
Pipettierhilfe „Pipetboy plus“ Integra Biosciences, Fernwald  
Feinpipette „Research“ Eppendorf, Hamburg
- Vortex MS2 Minishaker IKA-Werke GmbH&Co KG,Staufen
- Waagen Sartorius, Göttingen
- Wasserbad GFL, Burgwedel
- Zentrifugen:
- Biofuge Fresco Heraeus, Berlin
- CentriconT-324 Kontron, Neufahrn
- Centrifuge 5410 eppendorf Eppendorf, Hamburg

### 2.2 Geräte und Material für die Zellkultur

#### 2.2.1 Chemikalien und Zusätze

- Dil-Ac-LDL Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- Collagenase II Biochrom KG, Berlin
- DMSO Serva, Heidelberg
- EGM-2 + Zusätze EBM-2 Cell Systems, St.Katharinen

- Ficoll Paque  
Schweden Pharmacia Biotech, Uppsala,
- FKS Biochrom KG, Berlin
- Humanes AB-Serum Sigma, Deisenhofen
- Humanes rekombinantes Interferon  $\gamma$  R&D Systems, Wiesbaden
- Humanes rekombinantes IL-2 Cetus Corp., Emeryville, California, USA
- L-Glutamin Life Technologies, Karlsruhe
- HEPES-Puffersubstanz Sigma, Steinheim
- Natriumazid Sigma, Steinheim
- Natriumchlorid Merck, Darmstadt
- Natronlauge 1 M NaOH Merck, Darmstadt
- RPMI 1640 Biochrom KG, Berlin
- Paraformaldehyd Sigma, Steinheim
- Penicillin Life Technologies, Karlsruhe
- Salzsäure (HCl) Merck, Darmstadt
- Streptomycin Life Technologies, Karlsruhe
- TNF  $\alpha$  R&D Systems, Wiesbaden
- Triton X Serva, Heidelberg
- Trypan Blue Sigma, Steinheim
- Trypsin-EDTA Life Technologies, Karlsruhe

### 2.2.2 Plastikmaterialien

- Kulturflaschen (T 25, T 75)  
Heidelberg Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
- Kulturplatten  
Heidelberg Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
- Einfrierröhrchen Nunc, Roskilde, Dänemark
- Einmalpipetten Greiner, Nürtingen
- Pasteurpipetten Roth, Karlsruhe
- Pippettenspitzen Greiner GmbH, Frickenhausen
- Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml) Eppendorf, Hamburg
- Spritzen (2 - 50 ml) Braun Melsungen AG, Melsungen
- Sterilfilter (0,2  $\mu$ m/0,45  $\mu$ m) Schleicher Schuell, Dassel
- Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) Falcon, Oxnard, USA

### 2.2.3 allgemein verwendete Zusätze, Medien und Puffer

#### Endothelzellmedium

- EGM – 2 und Zusätze Cell Systems, St. Katharinen

- Natriumpyruvat
- L-Glutamin
- Penicillin
- Streptomycin
- Insulin
- Hydrocortison
- Fetales Kalbserum
- $\beta$ -FGF
- EGF

HEPES – Lagerungs- und Transportmedium für Nabelschnüre

- Für 250 ml 11 x konzentrierte Stammlösung:
- 22g NaCl / 825 mg KCl / HEPES 6,454 g / Glucose 25,5 g
- Einstellung auf pH = 7,4 und steril filtrieren

RPMI 1640 – Medium für Lymphozytenkulturen und Zytotoxizitätstest

- RPMI 1640 Basismedium / 2 mM L-Glutamin / 100 U/l Penicillin / 100  $\mu$ g/ml Streptomycin
- Je nach gewünschtem Serumgehalt Zugabe von bis zu 10 % FKS oder AB-Serum

PBS - phosphate buffered saline:

- in 1 l Aqua dest., pH 7,4
- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

2.2.4 vorhandene Zellen

- HUVEC (verschiedene Spender) Cascade Biologics, Portland, Oregon, USA
- Zelllinie B95/8 ATCC

2.2.5 Aufarbeitung humaner Nabelschnüre

- sterilisierte große Schalen zur Aufnahme der Nabelschnüre
- sterile 50 ml Perfusorspritzen
- sterile abgestumpfte Butterflys zur Kannülierung der Nabelschnurvene
- sterile Gefäßklemmen, Scheren und Pinzetten

- steril filtrierter HEPES Puffer für Lagerung, Transport und Aufarbeitung
- 0,2% Collagenase II (Biochrom KG, Berlin) Lösung in Hanks balanced salt solution (HBSS) zum Gewebeverdau

#### 2.2.6 EBV-Transformation humaner Nabelschnurblutlymphozyten

- Überstand der EBV-sezernierenden Zelllinie B/95.8 zur Transformation
- Kulturmedium RPMI 1640 mit 10 % FKS

### 2.3 Geräte und Materialien für Gentransfers

Die adenoviralen Transduktionen wurden unter S2-Bedingungen (laut Gentechnik-Gesetz) durchgeführt. Gearbeitet wurde an nur für S2 Experimente zugelassenen Sicherheitswerkbänken der Klasse II. Sämtliche anfallenden Restmaterialien einschließlich Zellmaterial wurden in Peressigsäure 12 h denaturiert und anschließend autoklaviert. Das Tragen von Sicherheitskleidung einschließlich Handschuhe, Haar- und Mundschutz, waren obligat.

- Zellkulturbänke mit Personenschutz (Sicherheitsklasse II)
- UV-Lampen zur Nachbestrahlung der Arbeitsplätze

#### 2.3.1 Adenovirale Konstrukte

Die Klonierungsarbeiten der einzelnen Konstrukte in das adenovirale Vektorsystem und die Virusproduktion fand unter Leitung von Herrn PD Dr. Thomas Ritter statt [96]. Die Aufreinigungsschritte in der Virusproduktion übernahm Heinz Tanzmann. Es wurden insgesamt 4 verschiedene Konstrukte verwendet:

Adenovirales Konstrukt	Herkunft	Virusgehalt der Stocklösung der verwendeten Charge
Anti MHC I-single variable Fragment-Intrabody (Ad-sFv-Intrabody)	A. Marasco, Boston, USA	$1 \times 10^{11}$ pfu/ml
Adenovirales Konstrukt mit dem EGFP-Reporter gen (AdEGFP)	A. Flügel, München	$1 \times 10^{10}$ pfu/ml
Adenovirales Kontrollkonstrukt mit dem E. Coli $\beta$ -Galactosidase Gen (Ad $\beta$ Gal)	T. Ritter, Institut für Medizinische Immunologie, Berlin	$1 \times 10^{11}$ pfu/ml
Adenovirales Kontrollkonstrukt mit dem $\alpha$ 1-Antitrypsin-Gen (AdAAT)	M. Kay, Stanford, USA	$1 \times 10^{11}$ pfu/ml

### 2.3.2 adenovirale Transduktion

Zur Verbesserung der adenoviralen Transduktionseffizienz wurde der virushaltigen Inkubationslösung das Polykation Hexadimethrinbromid (Polybrene, Sigma, Deisenhofen) in einer Konzentration von 8  $\mu$ g/ml zugesetzt [95]. Der Serumanteil von 2 % im EBM-2 Endothelzellmedium entsprach den Anforderungen für adenovirale Transduktionen im serumarmen Milieu.

Transduktionslösung:

- Virusverdünnung in kaltem 2 % FKS-haltigem (= serumarmem) EBM-2 Medium
- Ansatz jeweils 200  $\mu$ l / well in 24-well-plate oder 2 ml in T-25 Flasche
- Ermittelte HUVEC Zellzahl / Ansatz ca.  $5 \times 10^4$  in 24-well-plate,  $1 \times 10^6$  in T-25 Flasche
- Zugabe von Adenoviruslösung entsprechend einer MOI von 200 Viren (pfu) / Zelle ( $1 \times 10^7$  / 24 well bzw.  $2 \times 10^8$  / T25)
- Zugabe von 8  $\mu$ g/ml Polybrene
- Möglichst kurze Lagerung der Transduktionslösung auf Eis

## 2.4 Geräte und Materialien für Durchflußzytometrie

Die gefärbten Zellen wurden in FACS-Tubes (ICN Biomedicals) in ca. 200  $\mu$ l

Fixierungslösung aufgenommen und anschließend gemessen. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden am FACSort (s.o.) durchgeführt. In Wiederholungsmessungen wurden die Ersteinstellungen für die komplette Untersuchungsreihe beibehalten. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm Cell Quest (Becton Dickinson) für Apple PC oder WinMDI 2.8 für PC ausgewertet und anschließend mit Microsoft Excel und Sigma blot weiterverarbeitet.

#### 2.4.1 Antikörper:

Folgende Antikörper wurden für die Charakterisierung der Zellen verwendet:

AK-Spezifität	Spezies	Markierung	Herkunft
CD 3	Maus	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD 25	Maus	FITC	ImmunoTech, Beckmann-Coulter, Krefeld
CD 8	Maus	PERCP	BD Biosciences, Heidelberg
HLA DR	Maus	PE	BD Biosciences, Heidelberg
HLA A, B, C	Maus	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD 71	Maus	FITC	ImmunoTech, Beckmann-Coulter, Krefeld
CD 54	Maus	FITC	ImmunoTech, Beckmann-Coulter, Krefeld
CD 34	Maus	FITC	ImmunoTech, Beckmann-Coulter, Krefeld
CD 31	Maus	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD 19	Maus	PE	ImmunoTech, Beckmann-Coulter, Krefeld
CD 21	Maus	FITC	ImmunoTech, Beckmann-Coulter, Krefeld
mouse IgG Isotyp-Kontrollen	Maus	FITC, PE	ImmunoTech, Beckmann-Coulter, Krefeld

#### 2.4.2 Lösungen für Durchflusszytometrie:

- FACS Puffer: PBS / 2% FCS / 0,1% Natriumazid
- FACS AK-Lösung: Fluochrommarkierter AK jeweils 10µg auf insgesamt 40µl FACS-Puffer / Ansatz
- Paraformaldehyd-Lösung: 2 % Paraformaldehydlösung s.o. in FACS-Puffer zur Fixierung der Zellen

#### 2.5 Geräte und Materialien für Zytotoxizitätsassays

Für die Zytotoxizitätsassays wurden die beteiligten Zellen zur Inkubation in 96-Loch Rundbodenplatten pipettiert, und die Überstände für die Messungen in 96-Loch Flachbodenplatten überführt.

Die Fluoreszenzintensität in den Zellkulturüberständen wurde mit einem „SpectraFluor“ Fluorimeter der Firma Tecan Group Ltd, Maennedorf, Switzerland ermittelt.

Messparameter:

Excitation: 485 nm; Emission: 535 nm; Integrationszeit: 0; Integrationsstart 20; Blitzanzahl: 3; gain: manuell, ca.80-90; Plattentyp: C-O 96 KT

Lösungen:

- Zum Markieren von Zielzellen: 10 mM Calcein-AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) / serumfreien Kulturmedium ca. 1 ml /  $2 \times 10^6$  Zellen
- Für die TZR-Blockade bei den Effektorzellen: OKT3 Antikörper (Jansen-Cilag, Neuss) je 10µg/ml Effektorzelllösung
- Für die maximale Lyse Calcein markierter Zielzellen: Triton-X 0,9 % im Ansatz