

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Medien, Puffer und Lösungen

Sofern für den Ansatz von Lösungen oder Puffern Wasser verwendet wurde, handelte es sich um durch Umkehrosmose und Ionenaustausch aufgereinigtes Wasser, dessen Leitfähigkeit der doppelt destillierten Wassers entsprach (ELIX- und Milli Q-Wasser, Millipore). Im folgenden wird es als H₂O bezeichnet.

1.1 Zellkultur

Zellkulturmedium

RPMI 1640 mit Glutamax (Gibco) mit 1 mM Natriumpyruvat (Sigma) und 10% (R10) (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS, Gibco). Die Hitzeinaktivierung erfolgte 30 Minuten bei 56°C. Wurden Zell-Stimulierungsexperimente mit nicht-lebenden Erregern durchgeführt, so wurde das Medium zusätzlich mit 100 E/ ml Penicillin und 100 µg/ ml Streptomycin (beides Gibco) versetzt.

Medium für *in vitro* Versuche mit Natürlichen Killer Zellen

Alle *in vitro* Versuche mit isolierten Natürlichen Killer Zellen wurden in einem speziellen Medium, basierend auf R10, durchgeführt. R10 wurde supplementiert mit 20 E/ ml murinem Interleukin 2. Im folgenden wird dieses Medium als R10-I bezeichnet.

PBS-Puffer (phosphate-buffered saline, 1x)

8,00 g NaCl, 0,20 g KCl, 0,20 g KH₂PO₄, 1,15 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O in 1000 ml H₂O. Die Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 7,2 eingestellt, sterilfiltriert (0,22 µm) und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

HBSS-Puffer (Hank´s balanced salt solution, Gibco)

4,87 g Hank´s (5x), 1,00 ml NaHCO₃ (7,5%) in 500 ml H₂O. Die Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 7,0 eingestellt, sterilfiltriert und ist bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

ACK Lysispuffer

Für die Lysis von Erythrozyten. 8,30 g NH_4Cl (0,15 M), 1,00 g KHCO_3 (1 mM), 37,2 mg $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (0,1 mM) in 1000 ml H_2O . Die Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,3 eingestellt, sterilfiltriert (0,22 μm) und ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

PBS-EDTA

0,25% (w/v) Natrium-EDTA in PBS. Die Lösung wird mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt und ist bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

Einfriermedium

Für die Kryokonservierung von Zellen wurde RPMI 1640 mit 20% (v/v) FKS und 10% (v/v) DMSO (Merck) als Gefrierschutz verwendet. Hierzu wurden RPMI 1640 mit 40% (v/v) FKS und RPMI 1640 mit 20% DMSO getrennt angesetzt. Die einzufrierenden Zellen wurden dann in einer 1 : 2 Mischung der beiden Lösungen resuspendiert. Die einzelnen Lösungen sind getrennt bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

1.2 Zellfärbungen

Trypanblau (Gibco)

0,5% (w/v) in gepufferter Salzlösung nach Hank (HBSS). Die Lösung ist bei Raumtemperatur einige Wochen haltbar. Der Farbstoff dringt in alle Zellen ein. Lebende Zellen können den Farbstoff aktiv wieder ausscheiden, während tote Zellen angefärbt bleiben.

Diff Quik[®] (Baxter Dade)

Der Dade Diff Quik-Färbetest ist eine Schnellfärbemethode, deren Ergebnisse mit denen der Pappenheim-Methode (Giemsa-May-Grünwald) gut vergleichbar sind. Die Färbung wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Nachweis der unspezifischen alpha-Naphthylazetat-Esterase

Der Nachweis des Enzyms alpha-Naphthylazetat-Esterase dient der Differenzierung von Monozyten, -blasten und Makrophagen. Der Ester alpha-Naphthylazetat wird durch das Enzym Esterase hydrolysiert, wobei eine Naphtholverbindung entsteht. Dieser gespaltene

Ester wird mit einem Diazoniumsalz zu einem wasserunlöslichen rotbraunen Azofarbstoff gekoppelt. Die Färbung wurde entsprechend den Herstellerangaben (Sigma) durchgeführt.

1.3 Puffer für die Antikörperaufreinigung

Alle für die Säulenchromatographie verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert, bei 4°C gelagert und kurz vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt und entgast. Bei 4°C sind die Lösungen mehrere Wochen haltbar.

Bindungspuffer: 20 mM Natrium-Phosphat Puffer, pH 7,0

Stammlösungen von 20 mM Na₂HPO₄ (2,84 g/ 1000 ml H₂O) und NaH₂PO₄ x 1 H₂O (7,79 g/ 1000 ml H₂O) wurden so miteinander vermischt, daß ein pH von 7,0 resultierte.

Elutionspuffer: 100 mM Glycin-HCl Puffer, pH 2,7

0,755 g Glycin (Sigma), 0,585 g NaCl in 200 ml H₂O. Die Lösung wurde mit 0,1 N HCl auf einen pH von 2,7 eingestellt.

Neutralisationspuffer: 1 M Tris-HCl Puffer, pH 9,0

24,20 g Tris in 200 ml H₂O. Die Lösung wurde mit 0,1 N HCl auf einen pH von 9,0 eingestellt.

1.4 Puffer für die Durchflußzytometrie

Färbepuffer

PBS + 1% (v/v) FKS + 0,1 % (w/v) Natriumazid. Die Lösung ist bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

Lagerungspuffer

Cell-Fix (Becton Dickinson). Kurz vor Gebrauch wurde die Stammlösung 1 : 10 mit H₂O verdünnt. Die Stammlösung ist bei Raumtemperatur mehrere Monate haltbar. Angefärbte

Proben in Cell Fix können, dunkel und bei 4°C gelagert, mehrere Tage aufgehoben werden.

1.5 Lösungen für den indirekten „Sandwich“ ELISA

Alle angesetzten Lösungen sind bei 4°C mehrere Wochen haltbar.

Puffer für den ersten Antikörper: 0,1 M Natriumcarbonat Puffer, pH 8,2

0,840 g NaHCO₃ in 100 ml H₂O. Die Lösung wurde mit 1 M NaOH auf einen pH von 8,2 eingestellt.

Verdünnungsmedium für Antigen, zweiten Antikörper und Streptavidin-Peroxidase

PBS mit 10% FKS

Waschpuffer

PBS + 0,05% (v/v) Tween 20

Blockierungspuffer

PBS + 10% FKS

Substratlösung: 2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)

75 mg ABTS (Sigma) wurden in 250 ml 0,1 M Zitronensäure-Monohydrat gelöst und mit 1 N NaOH auf pH 4,35 eingestellt. Aliquots dieser Lösung wurden bei -20°C eingefroren und sind dort mehrere Monate haltbar. Kurz vor Gebrauch wurden die Aliquots innerhalb von fünf Minuten auf Raumtemperatur gebracht und mit 0,03% (v/v) H₂O₂ (Sigma) versetzt.

1.6 Lösungen für den Stickoxidtest (aNO Bestimmung)

Lösung A: 1% (v/v) Sulfanylamid (Sigma) in 5% (v/v) ortho-Phosphorsäure

Lösung B: 0,1% (w/v) N-(1-Naphthyl) Ethylendiamin x 2 HCl in H₂O

Griess-Reagenz: Herstellung aus gleichen Teilen Lösung A und B

Die Lösungen wurden getrennt und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt und sind so mehrere Monate haltbar. Das Griess Reagenz wurde stets frisch angesetzt. NaNO₂ (10 mM) in H₂O gelöst wurde als Nitrit-Standard verwendet. Die Stammlösung ist bei 4°C mehrere Monate haltbar.

1.7 Lösungen für den MTT-Test

MTT Stammlösung: 5 mg/ ml (w/v) 3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5

Diphenyltetrazoliumbromid Thiazylblau (MTT, Sigma) in PBS (lichtgeschützt bei 4°C mehrere Monate haltbar)

SDS Lösung: 20% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS, Serva) in H₂O. Die Lösung wurde mit 1 M CH₃COONa auf pH 4,7 eingestellt.

1.8 Lösungen und Reagenzien für den Nachweis der Genexpression

Zum Ansetzen der Lösungen wurde nur RNase/DNase freies H₂O verwendet.

Tris-Acetat-EDTA /TAE) Puffer, pH 7,8

Tris	40 mM
EDTA	2 mM
Natriumazid	20 mM
Eisessig	29,6 mM

5 x Puffer für Reverse Transkriptase, pH 8,3

Tris-HCl	250 mM
KCL	375 mM
MgCl ₂	15 mM

10 x Puffer für Taq Polymerase, pH 9,0

Tris-HCl	750 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 mM
Tween 20	0,1% (v/v)

6 x Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25% (v/v)
Xylencyanol	0,25% (v/v)
Glycerin	30% (v/v)

1% Agarose Gel

1g Agarose (Eurobio) wurden in 100 ml TAE Puffer aufgenommen und durch kurzzeitige Erwärmung (Mikrowellen-Ofen) gelöst.

Ethidiumbromid Gebrauchslösung

Zum Färben der Agarosegele wurden 50 µl einer 5 mg/ ml Ethidiumbromid (Sigma) Stammlösung in 300 ml H₂O verdünnt. Die Gebrauchslösung (0,83 µg/ ml) kann mehrmals wiederverwendet werden.

1.9 Lösungen für Proteinbestimmung, SDS-PAGE und Western-Blots

Proteinbestimmung

BioRad Protein Assay

Das Prinzip des Nachweissystems beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an basische oder aromatische Reste von Proteinen: Aufgrund verschiedener Ladungen liegt der Farbstoff zunächst in drei unterschiedlich das sichtbare Licht absorbierenden Formen vor. Durch die Bindung wird eine anionische Form stabilisiert, die bei 630 nm gemessen werden kann. Das 5x konzentrierte Farbstoffreagenz ist ca. ein Jahr bei 4°C haltbar. Kurz vor Benutzung wird das Reagenz filtriert und 1 : 5 (in H₂O oder PBS) verdünnt. Das verdünnte Reagenz ist zwei Wochen haltbar.

Der Proteingehalt wurde anhand einer BSA-Standardreihe ermittelt.

photometrische Messung

im UV Licht bei 280 nm

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Acrylamid Stammlösung (Roth)

Acrylamid 30% (v/v) und N,N-Methylen-Bisacrylamid 0,8% (v/v) in H₂O

nicht reduzierender Probenpuffer (2x)

4% Natriumdodecylsulfat (SDS), 20% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau und 0,125 M Tris-HCl (pH 7,0). Für reduzierenden Probenpuffer wurde zusätzlich 3% 2-Mercaptoethanol verwendet.

Trenngel-Puffer (4x)

36,34 g Tris (Endkonz. 375 mM), 0,4% SDS (w/v), in 200 ml H₂O. Die Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 8,8 eingestellt.

Sammelgel-Puffer (4x)

6,06 g Tris (Endkonz. 125 mM), 0,4% SDS (w/v), in 100 ml H₂O. Die Lösung wurde mit 1 N HCl auf pH 6,8 eingestellt.

Ammoniumpersulfat (APS)

100 mg/ ml in H₂O gelöst, Aliquots sind bei -20°C mehrere Monate haltbar.

TEMED:

N,N,N`N`-Tetramethyl-Ethylendiamin (Serva), Lagerung bei 4°C

Laufpuffer für die Elektrophorese

3,00 g Tris (0,025 M), 14,40 g Glycin (0,192 M), 0,1% SDS (w/v) in 1000 ml H₂O.

Western-BlotsTransferpuffer

3,00 g Tris (0,025 M), 14,4 g Glycin (0,192 M) und 20% (v/v) Methanol in 1000 ml H₂O

Ponceau-Rot Lösung

0,1% (v/v) Ponceau-Rot mit 5% (v/v) Essigsäure in H₂O. Die Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und kann nach Gebrauch wiederverwendet werden.

Lösungen für die Färbung und Konservierung von GelenCoomassie Färbelösung

0,125% (w/v) Coomassie-Blau (R-250) in 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol und H₂O wurden unter Rühren gelöst und anschließend filtriert.

Coomassie Entfärber

10% Essigsäure (v/v) und 40% (v/v) Methanol in H₂O

Konservierungslösung

3% (v/v) Glycerin in H₂O

1.10 Lösungen für den spezifischen Nachweis von Immunglobulinen auf Dot- und Western-Blots

Blockierungspuffer

5% (w/v) Magermilch (Neuform) in TBST

Waschpuffer

Tris Puffer (TBS)

8,8 g NaCl (Endkonz. 150 mM), 2,42 g Tris-HCl (20 mM) in 1000 ml H₂O

Tween-TBS (TBST)

TBS mit 0,05% (v/v) Tween 20

Substrat für Peroxidase

Chloronaphtol (Merck)

4-Chloro-1-Naphtol (2,2 mM) und 0,03% (v/v) H₂O₂ in TBS

ECL Reagenz (NEN)

Das Renaissance Chemolumineszenz Substrat wurde gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers eingesetzt.

1.11 Lösungen für die enzymatische Spaltung von Immunglobulinen

Azetat-EDTA Puffer

0,1 M Natriumazetat wird mit konzentrierter Essigsäure auf einen pH von 5,0 eingestellt.

Danach wird die Lösung mit 0,003 M Natrium-EDTA versetzt.

1.12 Medien und Lösungen für die Transfektion pro- und eukaryontischer Zellen

Luria Broth (LB)-Medium (+/- Ampicillin)

1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt (beides Oxoid) und 1% (w/v) NaCl wurden in H₂O gelöst. Für Festmedien wurden 1,5% Agar (Oxoid) hinzugefügt. Das Medium wurde autoklaviert. Das für die Selektion transformierter Bakterien benötigte Ampicillin wurde nach

Abkühlen des Mediums auf unter 56°C in einer Endkonzentration von 50 µg/ ml hinzugefügt.

SOB Medium

10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glukose wurden sterilfiltriert zu autoklaviertem und auf unter 60°C abgekühltem LB Medium gegeben.

Lösung I

50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0 und 10 mM EDTA in H₂O

Lösung II

0,2 N NaOH, 1% (w/v) SDS in H₂O

Lösung III

29,44 g Kalium-Azetat (Endkonzentration 3 M) wurden in 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml H₂O gelöst.

Tris-EDTA (TE) Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA in H₂O

Cytomix (pH 7,6)

120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂ in H₂O. Der pH wurde mit KOH auf 7,6 eingestellt. Kurz vor Gebrauch wurden 2 mM ATP hinzugefügt.

2. Zytokine

Alle Zytokine wurden sofort nach Erhalt nach Vorschrift des Herstellers gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert. Die verwendeten Zytokine sind in **Tab. 3.1** gezeigt.

Tab. 3.1: Verwendete Zytokine

Zytokin	Spezies	Expressionssystem	Herkunft
IL-1β	Maus	<i>E. coli</i>	PeptoTech
IL-10	Maus	<i>E. coli</i>	PeptoTech
IL-12	Maus	Sf 21 Insektenzellen	R&D Systems
IFN-γ	Maus	<i>E. coli</i>	G. R. Adolf (Wien), ursprgl. Genentech
TNF-α	Maus	<i>E. coli</i>	C. Galanos (Freiburg), ursprgl. Knoll AG

3. Antikörper

3.1 Funktionelle Experimente

Tab. 3.2: Antikörper für funktionelle Experimente

Antigen	Klon	Spezies	Ig Subtyp	Herkunft
F4/80	F4/80	Ratte	G2b, Hybridom Überstand	S. Gordon (Oxford)
	Cl:A3-1 (F4/80)	Ratte	G2b, aufgereinigt ^a	Serotec
CD11a	H35-89.9	Ratte	G2a, aufgereinigt	D. Männel (Regensburg), ursprgl. M. Pierres (Marseille)
	M17/4	Ratte	G2a, aufgereinigt	Pharmingen
CD11b	M1/70	Ratte	G2b, aufgereinigt	P. Kaye (London), ursprgl. T. Springer (Harvard)
CD16/CD32	2.4G2	Ratte	G2b, aufgereinigt	Pharmingen
CD54	YN1/1	Ratte	G2b, aufgereinigt	D. Männel (Regensburg), ursprgl. F. Takei (Vancouver)
	KAT-1	Ratte	G2a, aufgereinigt	Immunokontakt
CD80	RMMP-2	Ratte	G2a, aufgereinigt	Serotec
CD86	RMMP-1	Ratte	G2a, aufgereinigt	Serotec
I-A ^d /I-E ^d	2G9	Ratte	G2a, aufgereinigt	Pharmingen
Scavenger Rezeptor	2F8	Ratte	G2b, Hybridom Überstand	S. Gordon (Oxford)
irrelevant	R35-95	Ratte	G2a, aufgereinigt	Pharmingen
irrelevant	R35-38	Ratte	G2b, aufgereinigt	Pharmingen

^a Hybridom Überstände wurden mit Hilfe der Affinitätschromatographie durch Kopplung an entweder Protein A Sepharose (IgG2a) oder Protein G Sepharose (IgG2b) aufgereinigt.

3.2 Durchflußzytometrie

Tab. 3.3: Verwendete Antikörper für die Durchflußzytometrie

Zielmolekül	Klon	Spezies	Ig Subtyp	Konjugat	Herkunft
F4/80	Cl:A3-1 (F4/80)	Ratte	G2b	FITC	Serotec
NK Zellen	DX5	Ratte	M	FITC	Pharmingen
PMN	RB6-8C5	Ratte	G2b	FITC	Pharmingen
I-A ^d /I-E ^d	2G9	Ratte	G2a	FITC / PE	Pharmingen
CD3	17A2	Ratte	G2b	FITC	Pharmingen
CD4	H129.19	Ratte	G2a	PE	Pharmingen
CD8a	53-6.7	Ratte	G2a	FITC	Pharmingen
CD11a	M17/4	Ratte	G2a	FITC	Pharmingen
CD11b	M1/70	Ratte	G2b	FITC	Pharmingen
CD19	1D3	Ratte	G2a	PE	Pharmingen
CD45	30-F11	Ratte	G2b	FITC	Pharmingen
CD54	3E2	armen. Hamster	G, 1	FITC	Pharmingen
CD69	H1.2F3	armen. Hamster	G, 1	PE	Pharmingen
CD80	RMMP-2	Ratte	G2a	FITC	Serotec
CD86	RMMP-1	Ratte	G2a	FITC	Serotec
CD119	GR20	Ratte	G2a	Biotin	Pharmingen
irrelevant	A95-1	Ratte	G2b	FITC	Pharmingen
irrelevant	R35-95	Ratte	G2a	FITC / PE	Pharmingen
irrelevant	R4-22	Ratte	M	FITC	Pharmingen
irrelevant	G235-2356	armen. Hamster	G, 1	FITC / PE	Pharmingen

3.3 ELISA

Tab. 3.4 Verwendete Antikörper für den indirekten „sandwich“ ELISA

	Klon	Spezies	Ig Subtyp	Konjugat	Herkunft
IL-1 β					
1. Antikörper	polyklonal	Kaninchen	G		Innogenetics
2. Antikörper	polyklonal	Kaninchen	G	Biotin	Innogenetics
IL-10					
1. Antikörper	JES5.2A5	Ratte	G1		G. Bancroft (London)
2. Antikörper	SXC-1	Ratte	M	Biotin	Pharmingen
IL-12					
1. Antikörper	C15.6	Ratte	G1		Genzyme
2. Antikörper	C17.8	Ratte	G2a	Biotin	Genzyme
IFN- γ					
1. Antikörper	R4-6A2	Ratte	G1		P. Kaye (London)
2. Antikörper	AN-18	Ratte	G2b	Biotin	H. Weltzien (Freiburg)
TNF- α					
1. Antikörper	G281-2626	Ratte	G1		Pharmingen
2. Antikörper	MP6-XT3	Ratte	G1	Biotin	Pharmingen

4. spezifische Oligonucleotidsequenzen („Primer“)

Tab. 3.5: Verwendete Primer

	Sequenz	Größe des Fragments (bp)	Referenz
IL-1 β ^a	sense (5'-) GCAACTGTTCTGAACTCA antisense (5'-) CTCGGAGCCTGTAGTGCAG	382	Montgomery 1991
IL-10 ^a	sense (5'-) TACCTGGTAGAAGTGATGCC antisense (5'-) CATCATGTATGCTTCTATGC	256	Song 1996
IL-12 ^a	sense (5'-) CGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG antisense (5'-) CTTCATCTGCAAGTTCTTGGGC	312	Gazzinelli 1993a
IFN- γ ^b	sense (5'-) TACTGCCACGGCACAGTCATTGAA antisense (5'-) GCAGCGACTCCTTTTCCGCTTCCT	405	Stratagene
TNF- α ^b	sense (5'-) ATGAGCACAGAAAGCATGATC antisense (5'-) TACAGGCTTGCTCACTCGAATT	276	Stratagene
iNOS ^a	sense (5'-) CATGGCTTGCCCTGGAAGTTTCTCTTCAAAG antisense (5'-) GCAGCATCCCCTCTGATGGTGCCATCG	754	Gazzinelli 1993b
HPRT ^a	sense (5'-) GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG antisense (5'-) GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT	362	Doherty 1996
F4/80 ^c	sense (5'-) TAGTAGAAGCTTAGTACGATGTGGGGCTTTTGG CTGCTCCTCTTCTGGGGCTTCAG antisense (5'-) TAGTAGTCTAGAGAAAGGATGTAAACCCATCTTG GAAGTGG	757	McKnight 1996

^a die Primer wurden von TIB Molbiol bezogen

^b die Primer wurden von Stratagene bezogen

^c die Primer wurden freundlicherweise von Dr. Andrew J. McKnight, Sir William Dunn School of Pathology, Oxford, England, zur Verfügung gestellt

5. Plasmide

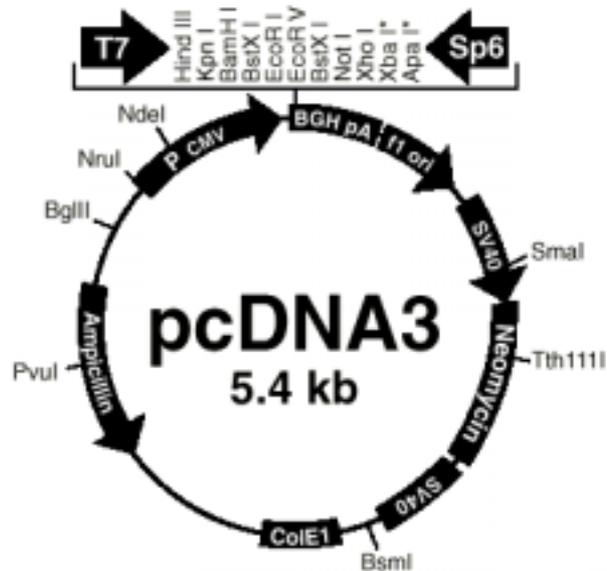


Abb. 3.1: pcDNA3 Plasmid (Invitrogen)

6. Restriktionsenzyme und -puffer

Die Zusammensetzung der Puffer für den Restriktionsendonuklease-Verdau unterschied sich nach Art des jeweiligen Enzyms. Für eine zu verdauende Probe (1 μg DNA) wurde das Enzymgemisch in einem Gesamtvolumen von 5 μl angesetzt. Die Enzyme wurden in einer Aktivität von ca. 0,25 E/ Probe eingesetzt, wobei 1 E der Menge des Enzyms entspricht, die gebraucht wird, um 1 μg DNA in einer Stunde bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 50 μl zu schneiden. **Tabelle 3.6** gibt eine Übersicht über die verwendeten Restriktions-Endonukleasen.

Tab. 3.6: Verwendete Restriktionsendonukleasen^a

Enzym	Puffer Stammlösungen (10 x)
<i>EcoR1</i>	100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0,025% (v/v) Triton X-100, pH 7,5
<i>HincII</i>	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 100 µg/ ml BSA, pH 7,9
<i>XbaI</i>	10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 100 µg/ ml BSA, pH 7,9
<i>HindIII</i>	10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1mM DTT, pH 7,9
<i>BglII</i>	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9

^a Die Restriktionsenzyme wurden von New England Biotechnology bezogen.

7. Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in liegenden Zellkulturflaschen (Falcon) bei 37°C, 6% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in einem Brutschrank (Heraeus) kultiviert.

7.1 RAW 264.7 Zellen

Diese Zelllinie wurde aus dem Aszites eines Tumors generiert, der durch Injektion des Abelson LeukämieVirus in BALB/c Mäuse induziert wurde. Phänotypisch ähnelt sie murinen Monozyten und Makrophagen. Die Linie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. N. Masihi, Robert-Koch Institut, Berlin, zur Verfügung gestellt.

7.2 P3X63Ag8.653 Zellen

Dieser Subklon geht auf die Linie P3K zurück, die aus dem in BALB/c Mäusen mit Mineralöl induziertem MOPC-21 Plasmazytom isoliert und in Zellkultur genommen wurde. Die verwendete Zelllinie ist in Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HAT) Medium nicht lebensfähig und wird für Zellfusionen verwendet. Die Linie wurde freundlicherweise

von Herrn Dr. H. Schäfer, Robert Koch-Institut, Berlin, zur Verfügung gestellt.

8. Versuchstiere

8.1 Mäuse

Mäuse wurden nach Geschlechtern getrennt gehalten und für die Versuche durch zervikale Dislokation getötet.

C.B-17 scid/scid (severe combined immunodeficiency), SCID-Mäuse

Acht bis 12 Wochen alte männliche und weibliche C.B-17 SCID Mäuse (Bosma *et al.*, 1983) wurden von der Zentralen Versuchstierzucht (ZVZ, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) bezogen. Die Tiere wurden im Tierstall des Robert Koch-Institutes in einem separaten Raum in Käfigen mit Filterhauben (Uno) unter einer Klasse I Werkbank mit horizontalem Laminarstrom gehalten. Käfige, Streu, Futter und Trinkwasser wurden vor Verwendung sterilisiert, die Filterhauben nur unter einer Klasse II Sicherheitswerkbank entfernt. Die SCID Mutation wurde von der ZVZ nach der Methode von Gordon *et al.* (1991) überprüft.

BALB/c Mäuse

Männliche und weibliche BALB/c Mäuse wurden im Alter von sechs bis 12 Wochen von der ZVZ bezogen und im Tierstall des Robert Koch-Institutes gehalten.

129/SV x C57 Bl/6J Mäuse (wildtyp und F4/80 -/-)

Die Generierung der F4/80 -/- („Knock outs“, KO-) Mäuse wurde von H.-H. Lin (Oxford, England) wie folgt durchgeführt (pers. Mitteilung): Als Konstrukt wurde ein aus einer 129/SV Genbank erhaltener Klon mit den Exons eins und zwei des F4/80 Gens verwendet, wobei Exon eins für die ersten zehn Aminosäuren des Signalpeptides kodiert, welches für den Export des fertigen Proteins an die Zelloberfläche verantwortlich ist. Dieses 1,8 kbp große Genfragment wurde so in einen pSA β gal-Neo Vektor kloniert, daß die kodierende Sequenz von Exon eins deletiert wurde. Nach Linearisierung wurde das Konstrukt durch Elektroporation in murine CJ7 embryonale Stammzellen geschleust. Nach 14 Tagen Kultivierung auf röntgenbestrahlten embryonalen Fibroblasten wurden die transfizierten

Stammzellen durch G 418 Geneticin Selektion gewonnen. Jeweils 15 Stammzellen wurden in C57Bl/6J Blastozysten injiziert und in die Uteri von scheinchwangeren Weibchen implantiert. Die Nachkommen sind fertil und zeigen ein normales Gewicht und eine dem Wildtyp entsprechende Lebenslänge. Die histologische Untersuchung ergab keine Auffälligkeiten in Bezug auf die Organgröße und zelluläre Zusammensetzung von Leber, Lunge, Niere, Knochenmark, Herz, Thymus und Lymphknoten. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte keine Expression von F4/80 in den genannten Geweben, wobei alle anderen Makrophagen-spezifischen Oberflächenmoleküle normal exprimiert waren. Die zelluläre Zusammensetzung des peripheren Blutes war ohne Befund. Nach intraperitonealer Injektion mit inaktivierten *Cryptosporidium parvum* Organismen konnte eine normale Granulombildung beobachtet werden. Männliche und weibliche 129/SV x C57 Bl/6J Mäuse wurden im Tierstall der Sir William Dunn School of Pathology (Oxford, England) gehalten. Vor jedem Versuch wurde die F4/80 Deletion durch eine PCR überprüft.

8.2 Ratten

Rattus norvegicus familiaris (Stamm Wistar)

Männliche und weibliche Wistar Ratten wurden von der ZVZ bezogen und im Tierstall des Robert Koch-Instituts gehalten. Für die Infektion mit *Pneumocystis carinii* wurden ca. 200 g, für die Immunisierung mit murinen NK Zellen ca. 600 g schwere Tiere verwendet. Für die Herstellung von *P. carinii*-infizierten Lungen wurden Ratten mit Kortisonazetat (Fortecortin , Merck, 2 – 4 mg/ Trinkwasser) und einer proteinreduzierten Diät (maximal 10% Protein, ssniff) immunsuppressiv behandelt (Bartlett *et al.*, 1988). Zur Vorbeugung gegen bakterielle Infektionen wurde zusätzlich 500 mg/ Liter Tetracyclin-HCl (ICN) in das Trinkwasser gegeben. Der Infektionsverlauf wurde anhand des Verlustes von Körpergewicht sowie von Dyspnoe und des Gesamteindrucks protokolliert. Nach ca. 12 Wochen wurden die Tiere mit Kohlendioxid getötet.

9. Erreger

9.1 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)

Stamm EGD Serotyp 1/2b. BALB/c Mäuse wurden jeweils mit 4×10^3 koloniebildenden Einheiten (colony forming units, cfu) von *L. monocytogenes* Bakterien/ 250 µl intravenös infiziert. Nach zwei Tagen wurde die Milz steril entnommen und homogenisiert. Die isolierten Bakterien wurden über Nacht bei 36°C in Tryptikase-Soja-Bouillon (Oxoid) im Schüttelwasserbad inkubiert. Um Mediumanteile zu entfernen wurden die Bakterien dreimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 2.000 x g, 15 Minuten, Raumtemperatur). Zur Zählung der lebenden Bakterien wurden sie in verschiedenen Verdünnungen auf Tryptikase-Soja-Agar ausgesät und die cfu bestimmt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Um die Bakterienzahlen, die nach dem Einfrieren tatsächlich in den Experimenten eingesetzt wurden, möglichst genau zu bestimmen, wurde ein Aliquot der Listerien nach dem Auftauen noch einmal in verschiedenen Verdünnungen auf Tryptikase-Soja-Agar ausgesät und die cfu bestimmt. Verluste lebender Bakterien durch den Vorgang des Einfrierens und Auftauens konnten somit erkannt werden. Ungefähr 95% der eingefrorenen Listerien waren nach dem Auftauen noch viabel.

9.2 Hitzegetötete *Listeria monocytogenes* (*hkLm*)

Ein Teil der wie unter 9.1 beschrieben gewonnenen Listerien wurden in einem Wasserbad bei 62°C für eine Stunde inkubiert und dadurch abgetötet. Die Wirkung der Hitzebehandlung wurde überprüft, indem ein Aliquot der Bakterien anschließend auf Tryptikase-Soja-Agar ausgesät wurde. Nach der Hitzebehandlung wurde eine Koloniebildung nie beobachtet. Für den Einsatz der *hkLm* in den Versuchen wurden die Bakterienzahlen lebender Listerien nach einmaligem Auftauen zugrundegelegt.

9.3 *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*)

Zysten und Trophozoite von *P. carinii* aus infizierten Rattenlungen wurden nach der von Cushion & Walzer (1984) beschriebenen Methode isoliert und aufbereitet. Einer getöteten Ratte wurde steril die Lunge entnommen und gewogen. Von einem Unterlappen der Lunge

wurde ein Schmierpräparat angefertigt und mit Diff-Quik (Baxter Dade) gefärbt. Von einer Schnittstelle der Lunge wurde ein Abstrich angefertigt und zur Beurteilung der Sterilität in das mikrobiologische Labor des Robert Koch-Institutes gegeben. Die Lunge wurde mit einer Schere zerkleinert und durch ein rostfreies Sieb (440 Maschen/ cm²) gerieben. Das Homogenat wurde in PBS durch doppelt gelegte Nylongaze (Nytal, Maschenweite 125 µm) getropft und zweimal mit kaltem PBS gewaschen (Zentrifugation: 1.000 x g, 15 Minuten, 4°C). Die Erythrozyten im Sediment wurden mit ACK Puffer für fünf Minuten bei 37°C lysiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte. Nach Quantifizierung der *P. carinii* Gesamtpopulation anhand Diff-Quik -gefärbter Präparate wurden die Erreger aliquotiert und in einer Zelldichte von ca. 1×10^8 / ml Einfriermedium in flüssigem Stickstoff gelagert. Als Kontrollpräparation (ohne Erreger) für die späteren *in vitro* Versuche wurden die Lungen aus nicht infizierten Ratten auf die gleiche Weise aufgearbeitet, wie die *P. carinii* infizierten Lungen. Die Anzahl verbliebener Wirtszellen diente als Maß für einen äquivalenten Einsatz. Die Wirtszellen wurden in Diff-Quik -gefärbten Präparaten gezählt und die Lungenkontrolle ohne *P. carinii* entsprechend der Wirtszellkontamination im *P. carinii* Lungenhomogenat eingestellt.

10. Zellkultivierung

Alle Zellen wurden in liegenden Zellkulturflaschen (Falcon) oder Petrischalen (Greiner) in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 6% CO₂ und wasserdampfgesättigter Luft kultiviert.

10.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Um adhärenente Zellen vom Boden einer Kulturflasche zu lösen wurde das Medium nach einmaligem Abspülen der Zellen mit PBS durch eine PBS-EDTA Lösung ersetzt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Durch Schlagen auf den Boden der Flaschen verloren die Zellen ihre Adhärenz. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen (Zentrifugation: 250 x g, zehn Minuten, 4°C). Die Flasche wurde ebenfalls mit PBS ausgewaschen. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen in gewünschter Dichte in frischem Medium aufgenommen und in die Flasche zurückgegeben. Dieser Vorgang wurde alle zwei bis drei Tage wiederholt.

10.2 Kultivierung nicht adhärenter Zellen

Nicht adhärente Zellen konnten durch einfaches Resuspendieren geerntet werden. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage gewaschen und verdünnt in frischem Medium weiterkultiviert.

10.3 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Trypanblau

Es wurde stets die Anzahl der vitalen Zellen in einer Suspension bestimmt. Einer Zählung ging deshalb eine Vitalfärbung mit Trypanblau (Gibco) voraus. Der Farbstoff wurde mit der Zellsuspension im Verhältnis 1 : 2 gemischt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Zählkammer nach Neubauer.

MTT Test

Um die Vitalität von Zellen zu messen, wurde die Methode des Einbaus von MTT gewählt (Mosmann, 1983). Durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase wird die gelbe MTT Lösung in blaue Formazankristalle umgewandelt. Dazu wurden 10 µl der MTT Stammlösung (Kap. III, 1.7) zu 200 µl der Zellkultur gegeben und zwei bis sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 20% SDS Lösung und einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Zellen lysiert und die Farbbildung photometrisch bei 570 nm gemessen.

10.4 Einfrieren von Zellen

Die einzufrierenden Zellen wurden geerntet und die Vitalzellzahl bestimmt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und in einer Konzentration von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen/ ml in RPMI 1640 Medium mit 40% FKS aufgenommen. Anschließend wurde diese Suspension mit dem gleichen Volumen an RPMI 1640 mit 20% des Gefrierschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) vermischt, so daß eine Zelldichte von $5 - 10 \times 10^6$ / ml eingestellt war. Die Suspension wurde in Aliquots von 1 ml in Einfrierröhrchen (Nalgene) überführt. Zur gleichmäßigen Abkühlung (1°C/ Minute) wurden die Zellen in Einfriergefäßen mit Alkoholmantel (1 C Cryo Freezing Container, Nalgene) bei -80°C eingefroren. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

10.5 Auftauen von Zellen

Das Auftauen von Zellen sollte möglichst rasch erfolgen. Das Einfrierröhrchen wurde nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff im 37°C Wasserbad solange geschwenkt bis nur noch ein kleiner Teil Gefrorenes zu erkennen war. Die Zellsuspension wurde sehr langsam mit demselben Volumen an R10 durchmischt. Um das Frostschutzmittel DMSO zu entfernen, wurde einmal mit R10 gewaschen. Die Zellen wurden in dem jeweilig empfohlenen Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag wurde nochmals gewaschen, um tote Zellen und den Rest des DMSO zu entfernen und die Zellen verdünnt in Medium aufgenommen.

10.6 Mykoplasmenachweis und -behandlung

Mykoplasmen treten häufig in Zellkulturen als Kontaminanten auf und können dabei vielfältige störende Wirkungen entfalten. Im Lichtmikroskop sind sie aufgrund ihrer geringen Größe nicht sichtbar. Da Mykoplasmen im Gegensatz zu anderen Prokaryonten keine Zellwand besitzen und damit unregelmäßige Formen annehmen können, passieren sie auch Sterilfilter von 0,2 µm. Die meisten Mykoplasmenarten benötigen isotonisches Milieu. Durch destilliertes oder Millipore aufbereitetes Wasser sind daher keine Kontaminationen zu erwarten. Auch reichen die üblichen Sterilisationsmethoden für die Zerstörung von Mykoplasmen aus. Sie können jedoch durch unsteriles Arbeiten oder nicht sachgemäß sterilisierte Verbrauchsgeräte auf Zellkulturen übertragen werden. Die häufigste Infektionsquelle ist die Übertragung durch Aerosole von infizierten Kulturen. Vor dem Einfrieren von Zellen wurden die Kulturen auf Mykoplasmen getestet.

Mykoplasmenachweis durch Bisbenzimidfärbung

Von den zu untersuchenden Zellkulturen wurde ein Präparat hergestellt. Die Zellsuspension sollte für diesen Zweck ein stationäres Kulturstadium erreicht haben und $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ Zellen / 200 µl enthalten. Dieses Volumen wurde über eine Trichtervorrichtung auf einen gesäuberten und entfetteten Objektträger aufgebracht und 5 Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Nach dem Lufttrocknen des Präparates erfolgte eine 15minütige Fixierung in einem Essigsäure-Methanol- 1 : 4 –Gemisch. Das getrocknete Präparat wurde mit

Bisbenzimidlösung (0,25 µg/ ml) bedeckt. Bisbenzimid (Hoechst) ist ein Fluoreszenzfarbstoff zum Nachweis von DNA. Nach 30 Minuten wurde die Lösung mit H₂O abgespült und zweimal fünf Minuten in H₂O gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Präparat mit Glycerin eingedeckt und mit 1000facher Vergrößerung betrachtet. Für die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Axioskop mit Filtersatz 09, blau: Anregungsfilter 450-490, Sperrfilter LP 520 (Carl Zeiss) verwendet.

Behandlung von mykoplasmenkontaminierten Zellkulturen

Mykoplasmenkontaminierte Zellkulturen wurden mit Ciprofloxacin (Bayer), einem gyrasehemmenden Antibiotikum, behandelt. Die zu therapierenden Zellen wurden auf eine Dichte von 1×10^5 / ml eingestellt und dem Penicillin- und Streptomycin-freien Medium 10 µg Ciprofloxacin/ ml Medium zugegeben. Für die Dauer von 12 bis 14 Tagen wurde diese Behandlung alle drei Tage wiederholt. Eine weitere Bisbenzimidfärbung diente der Therapiekontrolle. Im Gegensatz zu anderen Verfahren werden Mykoplasmen durch Ciprofloxacin abgetötet. Eine sorgfältige Vorgehensweise ist aber aufgrund von häufig auftretenden Resistenzen von äußerster Wichtigkeit.

11. Gewinnung von Zellen aus SCID Mäusen

11.1 Gewinnung von Gesamtmilzzellen

Getöteten Mäusen wurde steril die Milz entnommen, die anschließend sofort in kaltes HBSS überführt wurde. Die Milzkapsel wurde an beiden Enden aufgeschnitten und die Zellen mit einer gebogenen Kanüle in 2 ml R10 herausgestrichen. Die Zellen wurden mit einer Pipette resuspendiert und einmal mit R10 gewaschen (Zentrifugation: 10 Minuten, 250 x g, 4°C). Zur Lysis der Erythrozyten wurde das Zellsediment mit 3 - 5 ml kaltem ACK Puffer vorsichtig resuspendiert. Nach fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lysis mit dem gleichen Volumen R10 gestoppt, die Zellen zweimal gewaschen, gezählt und für die jeweilige Verwendung verdünnt. Pro SCID Maus konnten so $5 - 8 \times 10^6$ Zellen gewonnen werden.

11.2 Gewinnung von murinen Knochenmarkkulturmakrophagen

Getöteten Mäusen wurden steril Tibiae und Femura entnommen und von den umliegenden Muskeln freipräpariert. Die Gelenkköpfe wurden an den Epiphysenfugen abgetrennt und das Knochenmark mit kaltem HBSS aus einer 10 ml Spritze mit 27 G-Einmalkanüle (Braun) herausgespült. Die Knochenmarkzellen wurden bei 4°C, 12 Minuten mit 250 x g zentrifugiert. Die Zellen einer Maus wurden in 120 ml RPMI 1640 Medium, das mit 10% FKS, 5% Pferdeserum und 15% L929 Fibroblasten (M-CSF)-Überstand supplementiert war, aufgenommen (Pluznik's Medium, modifiziert nach Pluznik und Sachs, 1966). Durch Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor (M-CSF) wird die selektive Proliferation und Differenzierung von Zellen der Makrophagen/ Monozytenlinie aus Knochenmarkstammzellen gefördert. Die Zellsuspension wurde auf zehn Petrischalen (Greiner) verteilt und bei 37°C, 6% CO₂ inkubiert. Es wurden Petrischalen gewählt, die nicht aus speziellem Kulturplastik bestanden, da die Makrophagen an diesem Material nur leicht adhärirten. Nach sieben Tagen wurde ein Drittel des Mediums, und damit auch die nicht adhärenen Zellen, abgenommen und durch R5 ersetzt. Dieser Schritt bewirkt eine homogene Ausdifferenzierung der Zellen. Nach weiteren drei Tagen wurden die Makrophagen geerntet. Dafür wurde das Medium ganz entfernt und durch warmes HBSS ersetzt. Nicht adhärenente Zellen wurden durch zweimaliges Spülen mit HBSS entfernt. Die Petrischalen wurden anschließend für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, wobei die niedrige Temperatur eine Abrundung der Zellen und damit eine Ablösung vom Plastik bewirkte. Die Makophagen wurden dann mit kaltem HBSS und einer 10 ml Spritze (20 G-Einmalkanüle) von den Petrischalen gespült. Pro Maus wurden ca 5 x 10⁷ Makrophagen geerntet. Diese Methode der Makrophagengewinnung ist zwar, da sie sich über zehn Tage erstreckt, langwierig, bietet dafür jedoch eine hohe Zellausbeute mit reproduzierbaren Zellmengen und Eigenschaften. Die Reinheit der Zellen wurde mit der Anfärbbarkeit des MΦ-spezifischen Antikörpers F4/80 und dem Nachweis der unspezifischen alpha-Naphthylazetat-Esterase überprüft und lag in beiden Fällen stets bei > 98%.

11.3 Gewinnung von murinen Milzmakrophagen

Nach Gewinnung von Gesamtmilzzellen, Erythrozytenlysis und Zellzählung wurde die Zellsuspension in Zellkulturpetrischalen (Falcon) ausgesät und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium und damit die nicht adhärenen Zellen entfernt und die Petrischalen zweimal mit warmem HBSS gespült. Die adhärenen Zellen wurden in

HBSS für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die niedrige Temperatur bewirkte eine Abrundung der Zellen und damit eine Ablösung vom Plastik. Danach wurden sie mit kaltem HBSS und einer 10 ml Spritze (20 G-Einmalkanüle) von den Petrischalen gespült. Es konnten pro Maus 5 bis 8×10^6 Gesamtmilzzellen gewonnen werden. Nach der Selektion wurden 1 bis 5×10^6 Milzmakrophagen geerntet. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mit der Anfärbbarkeit des murinen Makrophagen Antikörpers F4/80 und dem Nachweis der unspezifischen alpha-Naphthylazetat-Esterase überprüft und lag in beiden Fällen bei 90-95%.

11.4 Isolierung von Natürlichen Killer Zellen

Der Begriff „NK Zellen“ faßt Zellpopulationen aufgrund funktioneller Eigenschaften zusammen. Zur Bestimmung von NK Zellen müssen drei Charakteristika gleichzeitig zutreffen: 1) Die Zellen dürfen nicht adhären sein, 2) sie müssen zytotoxisch für Yac-1 Zellen, nicht aber für P815 Zellen sein, 3) sie müssen auf ihrer Oberfläche ein charakteristisches Antigen, Asialo GM1, tragen (Kasai *et al.*, 1980).

Gewinnung von nicht adhären Zellen aus SCID Gesamtmilzzellen

Eine 10 ml Einwegspritze wurde mit 0,7 g Nylonwolle (Robbins Scientific) gefüllt. Hierbei sollten Handschuhe getragen werden. Dann wurde die Wolle mit PBS gut durchfeuchtet und autoklaviert. Kurz vor dem Gebrauch wurde die Spritze mit RPMI 1640 + 20% FKS (R20) gefüllt, um das PBS zu verdrängen. Luftblasen wurden mit einer Glaspipette aus der Wolle entfernt. Mit R20 bedeckt wurde die Säule senkrecht und am unteren Ende durch einen Drei-Wege-Hahn (Vygon) verschlossen 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank äquilibriert. Nach Gewinnung von Gesamtmilzzellen, Erythrozytenlysis und Zellzählung wurden die Zellen in R20 resuspendiert und in einem Gesamtvolumen von 1 ml auf die Nylonwollensäule aufgetragen. Die maximale Zelldichte von 7×10^7 bis 1×10^8 / Säule darf nicht überschritten werden. Die Zellen wurden mit R20 in die Säule hineingespült. Die Säule wurde für 45 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Zellernte wurde eine 23 G-Einmalkanüle an den Drei-Wege-Hahn angeschlossen und die Zellen mit 10 ml warmem R20 aus der Wolle effluert. Die Zahl der Gesamtmilzzellen pro Maus betrug 5 bis 8×10^6 . Nach Passage der Nylonwollensäule konnten 2 bis 3×10^6 (ca. 40%) nicht adhären Zellen gewonnen werden. In Diff-Quik -Präparaten konnte im Effluat nur ein Zelltyp beobachtet werden, andere nicht adhären Zellpopulationen, wie beispielsweise T-Lymphozyten sind in der SCID Maus nicht nachweisbar, granulierten Zellen wurden nicht beobachtet.

Analyse der isolierten Zellen auf NK Zell Charakteristika

Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurde ein modifiziertes Nachweissystem nach Kiessling *et al.* (1975) verwendet. Die isolierten Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ ml NK Medium (s. Kap. III, 1.1), Yac-1 Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ ml NK Medium in 96 Loch Mikrotiterplatten eingesät. In einem Parallelversuch wurden beide Zelltypen in oben genannten Zelldichten gemeinsam eingesät. Das Gesamtvolumen pro Vertiefung betrug jeweils 200 μ l. Nach einer Inkubation über 24 Stunden bei 37°C wurde die Zelldichte über MTT Einbau bei 570 nm photometrisch bestimmt. In einem weiteren Ansatz wurden die isolierten Zellen und Yac-1 Zellen zunächst in oben genannten Dichten in nur 100 μ l Endvolumen inkubiert. Nach dem Einbau von MTT wurden beide Ansätze vereinigt. Die Zelldichte wurde ebenfalls photometrisch bestimmt. Der gleiche Versuchsansatz wurde auch mit P815 Zellen anstelle von Yac-1 Zellen durchgeführt. Nach diesem System werden im Durchschnitt 65% der Yac-1 Zellen durch einen zytotoxischen Effekt der isolierten Zellen getötet, wobei die weitgehend resistenten P815 Zellen noch zu 15% getötet wurden. Diese erhöhte zytotoxische Aktivität ist auf das im Medium enthaltene IL- 2 zurückzuführen. Bis zu einem gewissen Grad ist jede Zelle gegen IL-2 aktivierte NK Zellen sensitiv (Roosmond *et al.*, 1986). Da ohne den Zusatz von IL-2 jedoch die Viabilität isolierter NK Zellen eingeschränkt war, mußte in Kauf genommen werden, daß in einem Teil der vorliegenden Arbeit mit teilweise aktivierten NK Zellen gearbeitet wurde.

Die Anwesenheit NK Zell spezifischer Antigene wurde durchflußzytometrisch und immunzytochemisch bestimmt. Alle in den Versuchen eingesetzten NK Zellen waren positiv für Asialo GM1 und negativ für F4/80 und das Enzym alpha-Naphthylazetat-Esterase. Zu einem späteren Zeitpunkt während der Durchführung der Experimente zur vorliegenden Arbeit war ein weiterer NK Zell spezifischer Antikörper erhältlich. Dieser Antikörper (DX5, Pharmingen) färbte ca. 50% der isolierten Zellen, was nach Angaben des Herstellers der maximalen Anfärbbarkeit isolierter NK Zellen entsprach.

12. *In vitro* Interaktionen zwischen Makrophagen und NK Zellen der SCID Maus

12.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen

Gesamtmilzzellen wurden stets in einer Zelldichte von 1×10^6 / ml, isolierte Zellpopulationen jeweils mit 5×10^5 / ml eingesetzt. Die Zellen wurden entweder in R10 oder R10-I in 24 (Gesamtvolumen 1 ml) oder 96 (Gesamtvolumen 200 μ l) Loch Mikrotiterplatten eingesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 6% CO₂ in einem Brutschrank (Heraeus) unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Inkubationszeiten richteten sich nach den Anforderungen des Tests (im Ergebnisteil beschrieben) und den zu messenden Stoffen: Für den Nachweis von TNF- α wurden die Überstände nach 18 Stunden, für alle weiteren Faktoren nach 24 oder 48 Stunden entnommen. Makrophagen wurde vier Stunden Zeit gegeben, um an die Böden der Mikrotiterplatten zu adhären, bevor andere Zellen hinzugefügt wurden. Das Medium wurde dann entfernt und sofort durch neues, NK Zell-haltiges Medium ersetzt. Die Zugabe der Erreger erfolgte in Medium. Die Versuche wurden so geplant, daß die Zellen nach der Entnahme aus Tieren oder der Isolierung von Nylonwollensäulen möglichst schnell eingesetzt wurden. Während der Inkubation wurde mikroskopisch auf mögliche Kontaminationen geachtet. Die Überstände wurden nach ihrer Entnahme zentrifugiert (250 x g, 10 Minuten, 4°C) und in die Nachweissysteme eingesetzt. Für spätere Messungen wurden die Überstände aliquotiert und bei -20°C eingefroren, wobei darauf geachtet wurde, eingefrorene Überstände nicht mehrmals aufzutauen.

12.2 Koinkubationen von Makrophagen und NK Zellen im Zwei-Kammern-System

Koinkubationsversuche wurden in den oben genannten Zelldichten durchgeführt. Zur Trennung der Populationen wurden Multiwell Membraneinsätze mit 1×10^8 Poren und einer Porengröße von 0,45 μ m (Falcon) gewählt, die in 24-Loch Mikrotiterplatten eingehängt werden können. Diese verhinderten den direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen den verschiedenen Populationen, lösliche Faktoren konnten jedoch ungehindert permeieren.

12.3 Blockierungsexperimente

Der Einfluß von membranständigen Molekülen während der Aktivierungsphase der natürlichen Infektabwehr *in vitro* wurde mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper untersucht. Diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Aktivierung von SCID GMZ oder aufgereinigten Makrophagen und NK Zellen in das Inkubationssystem gegeben. Vor ihrer Verwendung wurde das in manchen Antikörperpräparationen vorhandene Natriumazid durch Zentrifugations-Dialyse (Centricon, Amicon) entfernt, obwohl Natriumazid bis zu einer Konzentration von 0,05% das Experimentalsystem nicht beeinflußt (gemessen am MTT Einbau).

12.4 Neutralisationsexperimente

Neutralisationsversuche gegen Interleukin 10 wurden wie unter 12.1 beschrieben durchgeführt. Vor der Inkubation wurde den Zellen jedoch zusätzlich 10 µg/ ml monoklonaler anti-IL-10 Antikörper (Klon JES5-2A5) zugegeben.

13. Methoden des Nachweises von immunologisch wirksamen Mediatoren

13.1 Nachweis aus dem Kulturüberstand

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Zytokinen stellt der ELISA dar. Zur Verwendung kamen hier ausschließlich mehrschichtige (sandwich-) ELISA. Hierbei wird das zu untersuchende Antigen von zwei Antikörpern eingerahmt: Der erste ist an eine Matrix (Mikrotiterplatte) gekoppelt, der zweite Antikörper dient als Nachweissystem. Dieser kann stöchiometrisch nur in der Menge binden, in der das Antigen vorhanden ist. Im vorliegenden Falle waren die Antikörper stets biotinyliert. Biotin geht mit Streptavidin einen spezifischen Komplex ein. An Streptavidin ist ein Enzym gekoppelt (Peroxidase), welches ein später hinzugefügtes Substrat umsetzt. Diese Umsetzung geht mit einer photometrisch meßbaren Farbänderung des Substrats einher. Die Konzentration des nachzuweisenden Antigens ist somit direkt verantwortlich für eine Änderung der Farbintensität.

Über Nacht wurde der erste Antikörper in NaHCO_3 - Puffer, pH 8,2 bei 4°C an den Boden einer 96 Loch Mikrotiterplatte (Maxisorp F16, Nunc) gebunden. Im Überschuß vorhandener und nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen entfernt. Nach Absättigung des Plattenbodens mit einer 10% FKS enthaltenden Blockierungslösung (zwei Stunden, Raumtemperatur) und zwei weiteren Waschschrritten wurde das zu untersuchende Material (hier: Zellkulturüberstand und rekombinante Proteine als Standardreihe) in einem Volumen von $100\ \mu\text{l}$ in die Vertiefung gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C . Nach viermaligem Waschen wurde der zweite Antikörper ($100\ \mu\text{l}$) in die Vertiefung gegeben. Dieser Antikörper war biotinyliert und wurde für eine Stunde inkubiert. Nach sechs Waschschrritten wurde Streptavidin-Peroxidase ($100\ \mu\text{l}$, Amersham) in einer Verdünnung von 1 : 1000 eingesetzt. Nach 45 Minuten wurde achtmal gewaschen und die Substratlösung (ABTS, Sigma) in $100\ \mu\text{l}$ / Vertiefung dazugegeben. Eine Farbbildung erschien stets innerhalb der ersten zehn Minuten und konnte bei einer Wellenlänge von $405\ \text{nm}$ (Referenzwellenlänge $490\ \text{nm}$) photometrisch gemessen werden (Microplate Reader MR 700, Dynatech). Zum Abstoppen der Farbreaktion ist es möglich $100\ \mu\text{l}$ 1 M Zitronensäure (oder 20% (w/v) SDS oder 12,5% H_2SO_4) zu verwenden. Die unteren Nachweisgrenzen für die verwendeten Zytokin ELISAs lagen bei $40\ \text{pg}$ (IL-10, IFN- γ), $80\ \text{pg}$ (IL-12, TNF- α), $160\ \text{pg}$ (IL-1 β).

Bestimmung von anorganischen Stickoxiden (aNO)

Makrophagen produzieren bei Aktivierung Stickstoffradikale. Diese sind instabil und können nur indirekt über ihre oxidierten Folgeprodukte (NO_2 , NO_3) nachgewiesen werden (Green *et al.*, 1982). Durch eine konzentrationsabhängige Farbreaktion wurde der Gehalt der Endprodukte Nitrit und Nitrat in den Kulturüberständen photometrisch bestimmt. Von einer $100\ \mu\text{M}$ Natriumnitritlösung, die als Standard diente, wurden verschiedene Verdünnungen, von $100\ \mu\text{M}$ bis $2\ \mu\text{M}$, hergestellt und jeweils $100\ \mu\text{l}$ davon in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Von den zu testenden Überständen wurden ebenfalls $100\ \mu\text{l}$ vorgelegt. Die Proben beziehungsweise der Standard wurden nun mit frisch hergestelltem Griess Reagenz (Kap. III, 1.6) im Verhältnis 1 : 2 gemischt. Nach fünfminütigem Schütteln konnte der Test photometrisch bei $570\ \text{nm}$ gemessen werden. Zur Auswertung wurde von den Extinktionen der Natriumnitritverdünnungen eine Eichgerade erstellt und die aNO Werte der Proben durch Interpolation ermittelt. NO_2 ist ein stabiles Molekül und kann mit dieser biochemischen Methode reproduzierbar nachgewiesen werden. Die Nachweisbarkeitsgrenze der Methode lag bei $5\ \mu\text{M}$.

13.2 Nachweis der Genexpression

Beim Nachweis der Zytokin mRNA war das Arbeiten mit RNase/DNase-freien Chemikalien, Handschuhen und Plastikwaren sowie das strikte Arbeiten auf Eis unabdingbar. Um Kontaminationen zwischen den Proben zu vermeiden, wurde bei der gesamten Präparation nur mit RNase/DNase freien und gestopften Pipettenspitzen gearbeitet. Sämtliche Glaswaren mußten vor dem Benutzen für 4 Stunden bei 250°C erhitzt werden. Zum Ansetzen der Lösungen wurde nur RNase/DNase freies H₂O verwendet. Zur Bestimmung der Zytokin mRNA muriner, *in vitro* stimulierter Milzzellen wurde die Gesamt RNA aus den Zellen gewonnen, mittels einer reversen Transkriptase in cDNA transkribiert und nach einer PCR in einem Agarosegel sichtbar gemacht. Anhand des Vergleiches der Bandenintensität des konstitutiv exprimierten Gens für Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT) konnte die Expressionsstärke der nachzuweisenden Zytokin mRNA eingeschätzt werden.

Isolierung der Gesamt RNA aus SCID Milzzellen mit Trizol

Gesamtmilzzellen aus der SCID Maus wurden wie unter Kap. 10.1 beschrieben aufgereinigt. Für eine RNA Isolierung wurden 5×10^6 Zellen in 1 ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 13.000 x g (Raumtemperatur) pelletiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml Trizol (Gibco) aufgenommen, langsam mit einer Pipette homogenisiert und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform (15 Sekunden mischen, dann drei Minuten bei Raumtemperatur inkubieren, dann 12.000 x g, 15 Minuten, 4°C) wurde die RNA in die obere, wäßrige Phase extrahiert. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen (ca. 500 µl) Isopropanol durchmischt. Während weiterer zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur präzipitierte die RNA, die dann bei 12.000 x g (4°C, 10 Minuten) pelletiert wurde. Das Sediment wurde zweimal mit jeweils 1 ml eiskaltem 75% (v/v) Ethanol gewaschen (7.500 x g, 4°C, 5 Minuten). Das Pellet wurde an der Luft vollständig getrocknet und anschließend in 20 µl H₂O während 10 Minuten bei 58°C gelöst. Zwei µl der Präparation wurden in 98 µl H₂O aufgenommen und zur Messung des RNA-Gehaltes eingesetzt. Dieser wurde nach folgender Formel photometrisch bestimmt:

$$\text{Extinktion } 260 \text{ nm} \times \text{Verdünnung} \times 40 = \mu\text{g RNA/ ml}$$

Die Proben wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -70°C gelagert.

cDNA Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (SuperScript II, Gibco) wurde die RNA nach Angaben des Herstellers in doppelsträngige cDNA transkribiert. Dazu wurden 10 µl (1-5µg) RNA mit 1 µl (100 ng) Random Primer (Gibco) vermischt. Die Primerbindung erfolgte während 10 Minuten bei 70°C. Der Ansatz wurde dann für 10 Minuten in einem Gesamtvolumen von 20 µl (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 75 mM KCl) mit 500 µM eines jeden 2'-Deoxynucleosid 5'-Triphosphates (dNTP, Pharmacia) und 1 mM Dithiothreitol (DTT) bei Raumtemperatur inkubiert. Während zwei Minuten wurde der Ansatz auf eine Temperatur von 42°C erwärmt, um der mit 200 E/ Probe eingesetzten Reversen Transkriptase die optimale Wirktemperatur zu bieten. Es folgte eine Inkubation für 50 Minuten bei 42°C, die dann bei 70°C abgestoppt wurde.

Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Um mit Hilfe der PCR quantitative Aussagen über die Menge der in Zellen gebildeten mRNA treffen zu können, mußte die Mengen des eingesetzten Probenmaterials gleich sein. Dazu wurden anhand des aktivierungsunabhängig exprimierten Gens für HPRT die Mengen der cDNA verschiedener Proben durch densitometrische Messung der PCR Produkte (Software: WinCam, Cybertech, Berlin) und anschließende Verdünnung angeglichen. Nachdem die Einsatzmengen verschiedener Proben direkt miteinander verglichen werden konnten, wurden die Proben zusätzlich jeweils in verschiedenen Verdünnungen in die PCR eingesetzt. Schwächer exprimierte Gene wurden so eher ausverdünnt als stark exprimierte. So konnten zuerst nicht sichtbare Unterschiede der Expressionsstärke dargestellt werden.

PCR-Bedingungen:

In einem 50 µl Ansatz wurden 4 µl cDNA mit 75 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 200 µM dNTP, 2µM 3'- und 5'- Primer und 2,5 E/ Probe Taq Polymerase (Goldstar, Eurogentec) versetzt und in einem Genius Thermocycler mit Deckelheizung (Techne) unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

2 min 94°C initialer Aufbruch der Doppelstränge zu Einzelsträngen

jeweils 36 Zyklen: 1 min 94°C Aufbruch der Doppelstränge zu Einzelsträngen

1 min 61°C Primerbindung (Annealing)

3 min 72°C DNA Synthese

4 min 72°C Nachsynthese

Agarose Gelelektrophorese

Die PCR Produkte wurden in einem 1% Agarose Gel in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Horizon 11.14, Gibco) mit einer Feldstärke von 10 V/cm^2 aufgetrennt. Dazu wurden die Proben mit 1/6 Volumen eines sechsfachen Probenpuffers versetzt. Dieser enthält zwei Farbstoffe, mit deren Hilfe die Laufgeschwindigkeit der Proben im Gel eingeschätzt werden kann. Dabei wandert Bromphenolblau etwa auf gleicher Höhe wie ein 0,3 kb großes, doppelsträngiges Fragment und Xylencyanol FF wie ein 4 kb großes Fragment. Das Gel wird nach der Auftrennung für 10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad bei Raumtemperatur angefärbt und anschließend zur Reduzierung des Hintergrundleuchtens im Wasserbad für fünf Minuten wieder entfärbt. Die Fragmentgrößen wurden anhand eines 100 Basenpaar-Standards (Gibco) ermittelt.

Mittels eines UV Transilluminators wurden die angefärbten DNA Fragmente sichtbar ($\lambda = 302 \text{ nm}$) und konnten mit Hilfe eines Biometra II Kamerasystems fotografiert werden.

14. Generierung monoklonaler Antikörper

Durch wiederholte Antigen-Injektionen zu definierten Zeitpunkten während der Immunantwort der Ratte wird die Anzahl der antigenspezifischen B Lymphozyten erhöht. Die stimulierten B Zellen werden zum Zeitpunkt ihrer Proliferationsphase aus der Milz gewonnen. Da sich jedoch Immunglobulin-produzierende Lymphozyten aus der Rattenmilz in der Kultur nur sehr wenig teilen und daher langfristig nicht überlebensfähig sind, werden sie mit permanent wachsenden und teilungsaktiven Maus-Myelomen (Plasmazelltumore) fusioniert. Durch geeignete Selektionsmedien wird nach der Fusion das Überleben der nicht fusionierten Zellen verhindert. Die überlebenden Hybridome (aus Tumorzellen und Lymphozyten) sezernieren Immunglobuline, darunter auch spezifische Antikörper, die gegen das zum Immunisieren benutzte Antigen gerichtet sind. In einem für diese Antikörper entwickelten Testverfahren (Screeningsystem) werden die Kulturüberstände der erhaltenen Klone auf ihre Bedeutung für die jeweilige Fragestellung untersucht.

14.1 Immunisierung

Über Nylonwolle aufgereinigte, naive NK Zellen aus SCID Mäusen (Kap. III, 11.4) wurden zur Immunisierung 5 Monate alter Ratten (Stamm Wistar) verwendet. Für die Immunisierung

einer Ratte wurden 1×10^7 Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert. Kurz vor der Immunisierung wurden 50 μ l der Suspension mit 100 μ l Hunter's TiterMax™ (CytRx) durchmischt, bevor die restlichen 50 μ l dazugegeben wurden. Nach einer weiteren Durchmischung wurden 100 μ l der Suspension mittels einer 27G-Einmalkanüle intraperitoneal (i.p.) und jeweils 50 μ l intramuskulär (i.m.) in den linken und rechten hinteren Quadruplexmuskel injiziert. Hunter's TiterMax™ ist ein synthetisches Adjuvans, welches leichter zu handhaben und für das zu immunisierende Tier mit weniger Nebenwirkungen behaftet ist, als das sonst zu diesem Zweck verwendete Freudsche Adjuvans. In dreiwöchigen Abständen erfolgten zwei weitere Injektionen mit der gleichen Zellzahl, jedoch ohne Gabe von TiterMax™. Nach weiteren vier Wochen erfolgte die letzte Auffrischung, wiederum in PBS. Drei Tage später wurde die immunisierte Ratte getötet und die Milz für die Fusion steril entnommen.

14.2 Fusion

Zwei Wochen vor der Fusion wurde die Tumorzelllinie 653 aufgetaut und in R10 vermehrt. Dabei sollten die Zellen immer in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten werden. Am Tag der Fusion wurden die Zellen auf 5×10^7 /ml eingestellt. Die Rattenmilz wurde in eine Petrischale überführt, in 5 ml R10 in kleine Stücke geschnitten und durch ein Metallsieb passiert. Die Milzzellen wurden einmal gewaschen (Zentrifugation: 250 x g, 10 Minuten, 4°C) und ebenfalls auf 5×10^7 /ml eingestellt. Währenddessen wurde Polyethylenglykol (Sigma) bei 56°C verflüssigt, mit 5 ml RPMI gemischt und in einem 37°C Wasserbad flüssig gehalten. Milz- und Tumorzellen wurden im Verhältnis von 1 : 2 zusammengebracht und in einer auf Raumtemperatur eingestellten Zentrifuge bei 250 x g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das durch leichtes Klopfen auf den Boden des Röhrchens aufgelockerte Zellpellet wurde durch die tropfenweise Zugabe von 0,8 ml PEG resuspendiert. Danach wurde unter sachtem Schwenken während sechs Minuten mit warmem RPMI auf 10 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (100 x g, 15 Minuten, Raumtemperatur, keine Bremse). Die Zellen wurden in 120 ml Fusionsmedium aufgenommen und zu jeweils 200 μ l/ Vertiefung in 96 Loch Mikrotiterplatten eingesät.

Das Fusionsmedium enthält Aminopterin, welches die *de novo* DNA Synthese inhibiert. Die meisten Zellen verfügen jedoch über die Möglichkeit, einen alternativen Weg des Nucleinsäurestoffwechsels zu beschreiten. Dieser führt über das Enzym Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT). Da den verwendeten Tumorzellen dieses Enzym fehlt,

sterben sie in Aminopterin-haltigem Fusionsmedium. Nur fusionierte Zellen, welche sowohl das Enzym bereitstellen können, als sich auch teilen können, überleben die Inkubation in diesem Medium. Die nicht fusionierten Milzzellen sterben nach spätestens zwei Wochen, da sie nicht unbegrenzt proliferieren.

Nach zehn Tagen wurden 50% des Mediums durch frisches Fusionsmedium ersetzt.

Überlebende Klone wurden zur Expansion in 24 Loch Mikrotiterplatten und anschließend in 50 ml Kulturflaschen überführt.

14.3 Screeningsystem

Die aus den Fusionen gewonnenen Überstände wurden in funktionellen Tests auf ihre Potenz, die Erreger-abhängige IFN- γ Produktion von SCID GMZ zu inhibieren, überprüft. Dazu wurden GMZ aus SCID Mäusen wie in Kapitel 10.1 beschrieben gewonnen und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ ml in 96 Loch Mikrotiterplatten eingesät. Anschließend wurden 1×10^7 hkLm/ ml und 20 μ l der jeweiligen Hybridomüberstände dazugegeben, so daß ein Gesamtvolumen von 200 μ l resultierte. Diese Ansätze wurden 24 Stunden bei 37°C inkubiert, die Kulturüberstände durch Zentrifugation gewonnen und in einem IFN- γ spezifischen ELISA gemessen. Maximale Aktivierung ergab sich aus der Inkubation der GMZ mit hkLm allein. Als Maßstab der Inhibition diente die Inkubation der hkLm aktivierten Milzzellen mit anti-F4/80 Antikörper enthaltenden Hybridomüberständen.

15. Methoden der Aufreinigung, des Nachweises und der Charakterisierung von Antikörpern

15.1. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie ist eine Separationstechnik, bei der das zu isolierende Molekül spezifisch an einen Liganden adsorbiert wird, der an eine unlösliche Matrix gebunden ist. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Immunglobuline der Klasse G aufgereinigt. IgG Klassen aus der Ratte binden an Protein G Liganden. Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia) ist rekombinantes Protein G aus Streptokokken, das in *E. coli* produziert und an die Matrix Sepharose 4 Fast Flow gekoppelt wurde. Die Bindungskapazität der Sepharose für Ratten IgG

beträgt bis zu sieben mg/ mg. Zur Vorbereitung des Affinitätsmediums wurde die Sepharose zweimal mit Bindungspuffer (Kap. III, 1.3) gewaschen (Zentrifugation: 10 Minuten, 2.000 x g) und in eine Säule (HR 10/10 mit zwei Adaptoren, Pharmacia) pipettiert. Das Bettvolumen betrug 15 ml. Die Säule wurde an ein Flüssigkeitschromatographie (FPLC)-System (Pharmacia) angeschlossen. Nach einer Äquilibration der Säule mit Bindungspuffer wurde der entgaste antikörperhaltige Überstand über eine Probenschleife in 50 ml Portionen auf die Säule aufgetragen. Zwischen den Probenauftragungen wurde mit Bindungspuffer gespült. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte bei pH 2,7. Mit einem Sammler wurden die wieder auf neutralen pH gepufferten Fraktionen aufgefangen, die anschließend (nach einer 2 x 12 Stunden dauernden Dialyse gegen PBS) mittels einer photometrischen UV-Messung auf ihren Proteingehalt untersucht wurden.

15.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach der Methode von Laemmli (1970) können mit einer SDS-PAGE die Reinheit und das Molekulargewicht von Proteinen bestimmt werden. Es wurden Elektrophoresen mit 7,5%, 10% oder 4-20% Acrylamid im Trenngel durchgeführt. Die Proben und der Molekulargewichtsstandard (Bio-Rad) wurden zu gleichen Teilen mit Probenpuffer (Kap. III, 1.9) vermischt und durch 3-minütiges Erhitzen in kochendem Wasser denaturiert. Durch SDS werden die Proteine einheitlich negativ geladen, so daß sie während der Elektrophorese ausschließlich aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt werden. Zuerst wurde das Trenngel hergestellt, welches zwischen zwei Glasplatten gegossen wurde (Gelgrößen: 1 mm Dicke, 12 cm Länge). Das Gel wurde mit H₂O überschichtet, um ein Austrocknen zu vermeiden. Nach der Polymerisierung wurde das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet und ein Kamm in das noch flüssige Gel gesteckt, um Probenaschen zu bilden. Das fertige Gel wurde in eine vertikale Gelelektrophoresenkammer (Bio-Rad) gestellt und die Apparatur mit Laufpuffer gefüllt. Die Probenaschen wurden nach Entnahme des Kamms ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt und Luftblasen mit einer Puffer-gefüllten Spritze aus dem System entfernt. Anschließend wurden etwa 30 µl Probe (2 – 20 µg Protein) in die Taschen gefüllt und die Elektrophorese bei 100 V gestartet. Sobald die durch das Bromphenolblau im Probenpuffer sichtbar gemachten Proben das Sammelgel durchwandert hatten, wurde die Stromstärke auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde solange durchgeführt, bis die Proben das untere Ende des Trenngels erreicht hatten. Nach dem Lauf (zwei bis 2,5 Stunden) wurden die Gele

mit Coomassie R 250 gefärbt oder für Western Blots in Transferpuffer gelegt. Für schnelle Tests wurden alternativ zum Bio-Rad System Gelelektrophoresen in einem System der Firma Novex durchgeführt. Hierbei handelte es sich um vorgefertigte Gelkassetten verschiedener Acrylamidkonzentrationen. Die Laufzeit betrug ca. 1,5 Stunden bei konstanten 125 V.

15.3 Western Blot

Bei diesem Verfahren werden Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus einem Polyacrylamidgel auf Nitrozellulose transferiert und anschließend mit Antikörpern identifiziert. Nachdem die Proteine in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt worden waren, wurde eine Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell) auf das Gel gelegt. Beides wurde zwischen mehrere Schichten Filterpapier und Schwämme gebettet und anschließend in eine mit Transferpuffer gefüllte Blotkammer eingespannt. Bei 250 mA wurden über Nacht alle Proteine auf die Nitrozellulose übertragen. Die Übertragungseffizienz wurde durch kurzes Anfärben der Nitrozellulose mit Ponceau Rot und einer Coomassie Färbung des Gels überprüft. Bevor die Proteinbanden mit Antikörpern identifiziert werden konnten, wurde die Nitrozellulose in einer Schale mit Blockierungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (TBS, TBST, TBS, jeweils 5 Minuten) wurden biotinylierte Antikörper gegen Ratten Ig (Ziege-anti-Ratte, Amersham, 1 : 250 in TBST verdünnt) in die Schale gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde viermal mit TBS gewaschen und mit Streptavidin-gekoppelter Meerrettich-Peroxidase (Amersham, 1 : 1000 in TBST verdünnt) inkubiert. Nach 45 Minuten bei Raumtemperatur wurde wiederum viermal gewaschen. Als Substrat wurde 4-Chloro-1-Naphthol (Kap. III, 1.10) verwendet.

15.4. Dot Blot

Der Dot Blot ist eine schnelle Nachweismethode für Proteine (Antigene oder Antikörper). Im vorliegenden Falle wurde der Dot Blot zum Nachweis von Immunglobulinen verwendet. Jeweils 5 µl von Hybridomüberständen wurden auf eine Nitrozellulosemembran getropft. Mit einem Fön wurde die Flüssigkeit vorsichtig entfernt, bevor die Zellulose wie in Kap. III, 15.3 beschrieben blockiert und gefärbt wurde.

15.5 Immunglobulin Subtyp Bestimmung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der Ig Subtyp Bestimmung basiert auf der des Dot Blots. Zwei μg der zu testenden Hybridomüberstände wurden auf Nitrozellulosestreifen getropft. Nach dem Trocknen wurden die Streifen in Blockierungslösung gelegt und für eine Stunde inkubiert. Nachdem die Blockierungslösung mit TBS abgespült worden war, wurden in TBST verdünnte Antikörper gegen die verschiedenen Ig Ketten dazugegeben (Rat Mono AB ID/SP Kit, Zymed Laboratories, fünf Tropfen Antikörper auf 2,5 ml). Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde jeweils zweimal mit TBS und TBST im Wechsel für jeweils fünf Minuten gewaschen. Anschließend wurde Streptavidin-gekoppelte Meerrettich Peroxidase (Amersham) in TBS 1 : 500 verdünnt und zu den Nitrozellulosestreifen gegeben. Nach dem letzten Waschschrift (zweimal jeweils fünf Minuten TBS und TBST im Wechsel) wurden die Proteine mit einem Chemolumineszenz Reagenz (Renaissance , NEN Life Scientific Products) nach Herstellerangaben gefärbt. Die Belichtung erfolgte für zehn Sekunden auf einen X-Omat Blue XB-1 Film (Kodak).

16. Präparation von Fab Fragmenten

Um bei Immunglobulinen (Ig) die antigenbindenden Fragmente (Fab) vom Fc-Teil zu trennen, wurde die Methode des Ig- Verdaus mit voraktiviertem Papain gewählt.

16.1 Vorbereitung von Papain

Zum Voraktivieren von Papain wurde 1 mg Papain mit 0,05 M kristallinem L-Cystein (beides Sigma) bei 37°C im Wasserbad für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Cystein vom Papain mittels einer mit 20 ml Azetat/ EDTA Puffer äquilibrierten PD 10 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) entfernt. Der Proteingehalt der gesammelten Fraktionen wurde bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ gemessen und mit folgender Formel berechnet:

$$A_{280} : 2,5 = \text{mg präaktiviertes Papain/ ml}$$

16.2 Enzymatische Spaltung der Immunglobuline

Das gegen Azetat/ EDTA Puffer dialysierte IgG wurde für acht Stunden bei 37°C im Wasserbad mit voraktiviertem Papain inkubiert. Das eingesetzte Verhältnis war 1 mg IgG zu 0,05 mg Papain. Die Reaktion wurde mit Jodacetamid in einer Endkonzentration von 0,03 M gestoppt. Vor der Trennung des unverdauten Antikörpers von den Fab Fragmenten mittels Affinitätschromatographie (Protein G) wurde der Ansatz für 18 Stunden bei 4°C gegen PBS, pH 8,0, dialysiert. Die Fc Fragmente und die Fc Teile der unverdauten Antikörper binden an das Protein G, während die ungebundenen Fab Fragmente von der Säule effluieren können. Die Proteinkonzentration der gesammelten Fraktionen wurde photometrisch bei $\lambda = 280$ nm bestimmt ($A_{280} : 1,43 = \text{mg/ ml Protein}$). Anschließend wurden die proteinhaltigen Fraktionen bei 4°C gegen PBS, pH 8,0, dialysiert und in einem SDS Gradientengel (4 – 20%) unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen überprüft. Sowohl die Fraktionen der Fab-, als auch die der Fc Fragmente wurden für funktionelle Tests eingesetzt.

17. Transfektion der Zelllinie RAW 264.7 mit F4/80 cDNA

Das F4/80 Konstrukt zur Transfektion (McKnight *et al.*, 1996) wurde freundlicherweise von Dr. A. J. McKnight (Oxford) zur Verfügung gestellt. Die F4/80 cDNA wurde in die Vielfach Klonierungs Sequenz (multiple cloning site, mcs) des pcDNA3 Vektors (Invitrogen) zwischen den Restriktionsschnittstellen für Hind III und Xba I eingesetzt (**Abb. 3.1**). Um die Menge der F4/80-spezifischen DNA zu erhöhen, wurde das Plasmid in Bakterien transformiert. Aufgrund der Bakterienteilung nimmt die Menge der extrachromosomalen DNA zu, die dann geerntet und aufgereinigt werden kann. Bevor die DNA in großem Maßstab hergestellt wurde, wurde zuerst kontrolliert, ob das in den Bakterien exprimierte Plasmid dem Ursprungsplasmid entspricht. Dazu wurde die DNA in einem Vorversuch aufgereinigt und anschließend mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen spezifisch in Fragmente geschnitten. Die Muster der Fragmentierung der verschiedenen DNA Proben wurde dann miteinander verglichen.

17.1. Transformation

Elektroporation

5 µl der DNA wurden auf Eis in eine Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite, Bio-Rad) pipettiert und mit 40 µl einer in der logarithmischen Wachstumsphase geernteten Bakteriensuspension (*E. coli*, Stamm DH5α) gemischt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten auf Eis erfolgte die Elektroporation in einem Bio-Rad Gene Pulser bei 25 µF, 400 Ω und 2.500 V für 8 Millisekunden. Anschließend wurde die Suspension in 1 ml SOB Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37°C im Warmluftschüttler (225 rpm) inkubiert. Die Suspension wurde dann zu 25 oder 100 µl mit einem Drygalskispatel auf LB-Ampicillin Nährböden ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Das Ampicillin im Medium dient der Selektion der transfizierten Bakterien, da nur diese das im Plasmid befindliche Gen für eine Ampicillinresistenz tragen und überleben können.

1. Plasmidpräparation („Mini-Präp“)

Einzelne Bakterienkolonien wurden jeweils in Reagenzgläser mit 2 ml LB-Ampicillin Medium überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Zur Isolierung der DNA wurde der Inhalt der Reagenzgläser in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, wobei ca. 0,5 ml im Reagenzglas zurückblieben. Die Reaktionsgefäße wurden für 2 Minuten bei 13.000 x g zentrifugiert und das Medium mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl kalter Lösung I (Kap. III, 1.12) resuspendiert. Zu den Proben wurden 200 µl Lösung II gegeben und durch Schwenken gemischt. Anschließend wurden 150 µl Lösung III dazugegeben und kräftig vermischt. Nach fünf Minuten auf Eis wurde die Probe für fünf Minuten bei 13.000 x g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitierung der DNA wurde 1 ml kaltes Ethanol (absolut) zu den Proben gegeben, gemischt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde für fünf Minuten bei 13.000 x g abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Dann wurde die Probe zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und die DNA vollständig an der Luft getrocknet und anschließend in 50 µl TE Puffer aufgenommen.

Kontroll-Restriktionsverdau

Um die aufgereinigte DNA mit der ursprünglichen Probe vergleichen zu können, wurden die gewonnenen DNA Isolate und die Originalprobe mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

verdaut. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Sequenzen aus 4 bis 8 Basenpaaren und spalten in dieser Region in jedem Strang eine Phosphodiesterbindung. Die durch die Spaltung entstandenen DNA Fragmente werden anschließend im elektrischen Feld voneinander getrennt. Anzahl und Größe der Fragmente verschiedener DNA Proben lassen dann Rückschlüsse auf die Ähnlichkeit unter den Proben zu. Die Restriktionsenzyme werden in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Für die Spaltung von 1 µg DNA wird 1E des jeweiligen Enzyms verwendet. Die Reaktionsansätze werden für 1 Stunde bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert und anschließend elektrophoretisch bei konstant angelegter Spannung (100 V) voneinander getrennt.

2. Plasmidpräparation („Midi-Präp“)

Nachdem sichergestellt war, daß die gewonnene DNA der Ursprungs DNA entsprach, wurden die nicht für den Mini-Präp verwendeten Bakterien expandiert und mit Hilfe eines Kits von Qiagen (Plasmid Midi Kit) aufgereinigt. In 100 ml LB-Ampicillin Medium wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei 6.000 x g, 4°C (Rotor: Sorvall GSA) für 15 Minuten pelletiert und nach Herstellerangaben lysiert, die DNA präzipitiert, aufgereinigt, gewaschen und gelöst. Die Aufreinigung ergab eine durchschnittliche Ausbeute von 0,5 mg/ ml DNA.

17.2. Transfektion

Zwei Wochen vor Beginn der Transfektion wurde die MΦ Zelllinie RAW 264.7 in R10 expandiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen (Zentrifugation: 250 x g, 10 Minuten, 4°C). Für die Transfektion wurden die Zellen auf $1,5 \times 10^7$ / ml Cytomix eingestellt. Die Bestandteile von Cytomix (Kap. III, 1.12) ähneln der Ionenzusammensetzung des intrazellulären Milieus. Elektroporierte Zellen sind in diesem Medium keinem osmotischen Streß ausgesetzt. Die DNA wurde durch einen Restriktionsverdau mit *Bgl*III linearisiert. Das Enzym wurde durch Fällung mit Phenol entfernt. Dazu wurde der Ansatz mit der gleichen Menge Phenol versetzt und der nach einer Zentrifugation (13.000 x g, 5 Minuten) erhaltene Überstand mit der gleichen Menge Chloroform: Isoamylalkohol (24 : 1) überschichtet. Nach einer kurzen Zentrifugation (1 Minute) wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/10 Volumen Natriumazetat und dem 2,5 fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgt über Nacht bei -20°C. Nach Lufttrocknung wird die DNA in TE

Puffer aufgenommen und die Linearisierung mit einem Agarosegel überprüft. Für einen Transfektionsansatz wurden 270 µl der Zellsuspension mit 30 µl DNA (= 20 µg) gemischt und in einer Elektroporationsküvette mit 4 mm Spaltbreite bei 300 V (960 µF) gepulst. Die Zellen wurden anschließend in 12 ml warmem R10 aufgenommen und in jeweils 500 µl in einer 24 Loch Mikrotiterplatte für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur nachfolgenden Selektion der transfizierten Zellen wurde dem Medium Geneticin G418 in einer Konzentration von 500 µg/ ml hinzugefügt. Geneticin G418 ist ein Aminoglykosid, welches die Proteinsynthese von eukaryonten Zellen durch Interaktion mit den Ribosomen inhibiert. Vorversuche zeigten, daß RAW Zellen ohne das durch Transfektion nachträglich eingeschleuste Resistenzgen ab einer Konzentration von 250 µg/ ml G418 starben, transfizierte RAW Zellen jedoch mindestens bis zu einer Konzentration von 1 mg/ ml G418 eine normale Vitalität zeigten. Das Medium wurde alle drei Tage durch frisches G418-haltiges Medium ersetzt. Die Expression von F4/80 auf den RAW Zellen wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. In **Abb 3.2** ist die Expression des mit F4/80 cDNA transfizierten Klonen C3L.1 im Vergleich zum RAW Wildtyp dargestellt.

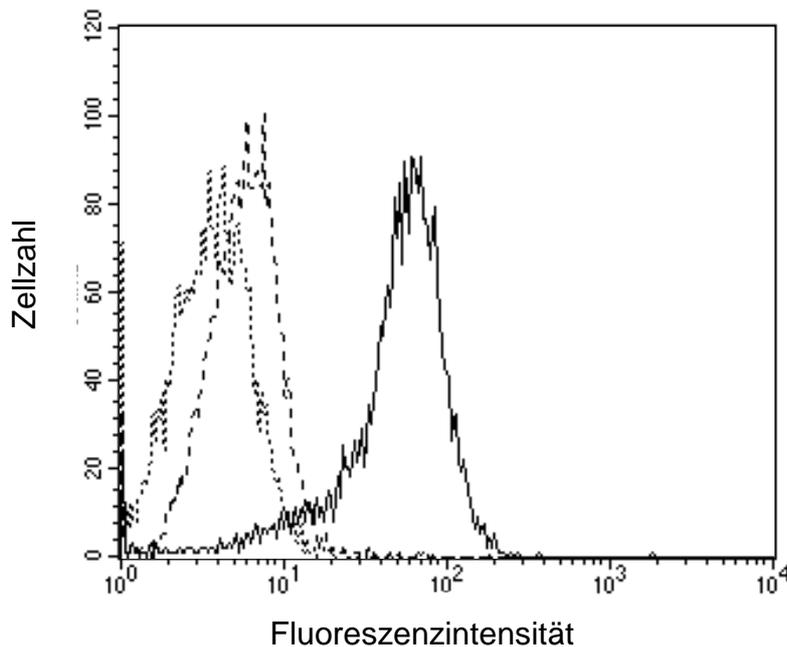


Abbildung 3.2: Durchflußzytometrische Überprüfung der Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit F4/80 cDNA. Die Makrophagen Zelllinie RAW 264.7 wurde bei 300 V mit 20 µg linearisierter DNA durch Elektroporation transfiziert. Die Expression wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie durch Anfärbung mit anti-F4/80 mAk überprüft (—). Die Expression von F4/80 auf untransfizierten Zellen (— —) und nicht markierte Zellen (·····) wurden zum Vergleich der Expressionsstärke herangezogen.

18. Durchflußzytometrie

Die Methode der Durchflußzytometrie erlaubt die schnelle Charakterisierung von Zellsuspensionen. Dabei wird jede Zelle einzeln in einem Flüssigkeitsstrom durch eine feine Kapillare gedrückt und an einem Meßpunkt mit einem Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) bestrahlt. Diese Bestrahlung (Anregung) wird zum einen von der Zelle gestreut, zum anderen emittiert und von verschiedenen Photodetektoren aufgefangen und in elektrische Energie umgewandelt. Die Stärke der Streuung ist abhängig von der Größe und der Granularität der Zelle. Fluoreszenzfarbstoffe, die über spezifische Antikörper an die Zelle gebunden werden können, werden durch das Licht des Lasers angeregt und emittieren das Licht in einer für jeden

Farbstoff charakteristischen Wellenlänge. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten in der vorliegenden Arbeit Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Emissionswellenlänge 530 nm) und Phycoerythrin (PE, 580 nm). Mit Hilfe dieser Technik kann jede Zelle einzeln aufgrund ihrer Morphologie und des Bindungsverhaltens gegenüber verschiedenen Antikörpern detektiert werden.

18.1. Probenvorbereitung

Die zu messenden Zellen wurden gewaschen und in FACS Puffer in einer Dichte von $1 - 5 \times 10^5$ Zellen/ Vertiefung in 96 Loch Mikrotiterplatten (konischer Boden, Roth) eingesät. Die Zellen wurden bei $250 \times g$ sedimentiert, der Überstand durch einmaliges Ausschütten entfernt. Normalserum aus der Maus (1 : 10 verdünnt) diente der Reduzierung unspezifischer Antikörperbindungen auf der Zelloberfläche. Hierfür wurden die Zellen im Serum resuspendiert und für 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschrinen in FACS Puffer wurden die direkt fluoreszenzgekoppelten Antikörper in einem Gesamtvolumen von $50 \mu\text{l}$ zu den Zellen gegeben und für 45 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrinen wurden die Zellen in $400 \mu\text{l}$ FACS Puffer oder CellFix aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C dunkel gelagert.

18.2 Geräteeinstellungen

Es wurden stets mindestens 10.000 Ereignisse pro Probe detektiert und für die Auswertung verwendet. Die nachfolgend für die jeweilige Anwendung aufgeführten Geräteeinstellungen sind Richtwerte. Während der Messung wurden, abhängig von den Fluoreszenzintensitäten der verwendeten Antikörper, geringfügige Änderungen der Einstellungen am Meßgerät vorgenommen.

Messung von Gesamtmilzzellen (Doppelfärbung)

forward scatter:	Detektor 1 V (Photozelle), Verstärkung 1,00 A (linear), Schwellenwert 80
side scatter:	Detektor ca. 410 V (Photomultiplier), Verstärkung 2,00 A (linear) Schwellenwert 0
Fluoreszenz 1:	Detektor ca. 610 V (Photomultiplier), Datenmodus logarithmisch

Fluoreszenz 2: Detektor ca. 520 V (Photomultiplier), Datenmodus logarithmisch
Kompensation: Fluoreszenz 1 – 1 % von Fluoreszenz 2
Fluoreszenz 2 – 20 % von Fluoreszenz 1

Messung von RAW Zellen (Einfachfärbung)

forward scatter: Detektor 1 V (Photozelle), Verstärkung 1,00 A (linear),
Schwellenwert 50
side scatter: Detektor ca. 370 V (Photomultiplier), Verstärkung 2,00A (linear)
Schwellenwert 50
Fluoreszenz 1: Detektor ca. 600 V (Photomultiplier), Datenmodus logarithmisch

18.3 Probenmessung

Die Messung erfolgte an einem FACS-Calibur (Becton Dickinson) Durchflußzytometer. Die graphische Darstellung und Analyse der Daten wurde mit der Cell-Quest Software (Becton Dickinson) durchgeführt. Zur Eichung des Zytometers wurden Calibrite Beads (Becton Dickinson) verwendet.

19. Statistik

Alle *in vitro* und *in vivo* Versuche wurden in mehrfachen Parallelansätzen durchgeführt (die jeweilige Anzahl ist den Abbildungslegenden im Ergebnisteil aufgeführt) und, wie jeweils angegeben, mehrfach wiederholt. Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittelwerte (bei Ungleichverteilungen als Mediane) mit Standardabweichungen dargestellt. Der Nachweis von signifikanten Unterschieden wurde mit dem t-Test nach Student durchgeführt. Die statistischen Berechnungen wurden mit den Softwareprogrammen Excel 5.0 oder Excel 97 für Windows NT durchgeführt.

20. Antigenverzeichnis

Tabelle 3.7: In der vorliegenden Arbeit behandelte Zelloberflächenantigene

Antigen	alternative Bezeichnung	Liganden	Expressionsmuster	Funktion
CD3	T Zell Rezeptor Komplex, T3		T ^c	Signaltransduktion
CD4	L3T4	MHC-II	DC ^a , T ^{ab} , MΦ ^b	Signaltransduktion
CD8	Ly-2, Lyt-2	MHC-I	DC ^a , T ^{ab}	Signaltransduktion
CD11a	Ly-15, Ly-21, Integrin α _L -Kette	CD54, CD102	B, DC, NK, PMN, T, MΦ ^b	Adhäsion
CD11b	Ly-40, Integrin α _M -Kette	CD54, iC3b, Fibronectin	B ^a , DC ^{ac} , NK ^a , PMN ^b , T ^c , MΦ ^b	Adhäsion
CD16	FcγRIII, Ly-17	IgG	NK, PMN ^b , MΦ ^b	ADCC
CD19	B4		B	Signaltransduktion
CD32	FcγRII, Ly-17, Lym-20	IgG	B, PMN, T ^b , MΦ	ADCC, Phagozytose
CD45	Ly-5, T200, LCA		B, DC, NK, PMN, T, MΦ, Thrombozyten, Erythrozyten	Signaltransduktion
CD54	ICAM-1, Ly-47, MALA-2	CD11a, CD11b, CD43	B ^c , DC ^c , PMN ^c , T ^c , MΦ ^c , Endothel ^c	Adhäsion
CD69	VEA		B ^c , NK ^c , PMN ^c , T ^c	Kostimulation
CD80	B7/BB1, B7-1, Ly-53	CD28, CD152	B ^{ac} , DC ^c , MΦ ^c	T-, B-Zell-Interaktion, Kostimulation
CD86	B7-2, B70, Ly-58	CD28, CD152	B ^{ac} , DC ^c , T ^{ac} , MΦ ^c	T-, B-Zell-Interaktion, Kostimulation
CD119	IFN-γ Rezeptor-α-Kette	IFN-γ	B, DC, NK, PMN, T, MΦ, Endothel, Thrombozyten	Immunregulation
F4/80	EMR1 (human)	?	MΦ ^b	?
MHC-II	I-A / I-E	TCR	B, DC, MΦ, Endothel ^a	Signaltransduktion

^a nur auf Subpopulationen exprimiert ^b Expression abhängig vom Reifeszustand der Zelle

^c Expression abhängig vom Aktivierungszustand der Zelle ? unbekannt

(zusammengestellt aus: Barclay AN, Brown MH, Law SKA, McKnight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA (1997). The Leukocyte Antigen Facts Book 2nd ed., Academic Press, San Diego, CA und Pharmingen „Mouse CD Chart“)