

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte, Hilfsmittel

Produkt	Hersteller
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau D
Szintillationsmessgerät (BetaCounter)	LKB Wallac, Turku FIN
Dampfdruck-Autoklav	H+P, Oberschleißheim D
Eismaschine mit Eisbad	Scotsman, Bettolino I
Phasenkontrastmikroskop	Wild-Leitz, Wetzlar D
Durchflusszytometer (FACScan + Software)	BD Biosciences, San Jose USA
Durchlichtmikroskop (mit Fluoreszenzaufsatz)	Zeiss, Oberkochen D
Gefrierschrank (-18 °C)	Bosch, Stuttgart D
Kühlschrank (+4 °C)	Bosch
Mikrowellen-Gerät	Moulinex, Radolfzell D
Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim D
Universalpipette (verstellbare Volumina)	Eppendorf, Hamburg D
Mehrkanalpipette	Thermo Labsystems, Vantaa FIN
Hand-Dispenser	Eppendorf
Automatische Pipettierhilfe (für Stabpipetten)	Hirschmann, Eberstadt D
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen D
Sicherheitswerkbank	Prettl, Pfullingen D
Tiefkühlschrank (-80 °C)	GFL, Burgwedel D
Stickstoff-Tiefkühltank (-196 °C)	Consarctic, Schöllkrippen D
Vakuumpumpe	ABM, Wertheim D
Cytospin-Zentrifuge	Shandon, Pittsburgh USA
Zentrifuge (für Standardzentrifugenröhrchen)	Beckman Coulter, Miami USA
Zentrifuge (für 1,5 ml-Reaktionsgefäße)	Hettich, Tuttlingen D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Einschweißtüten für BetaCounter	Perkin Elmer, Boston USA
Filtermatten für BetaCounter	Perkin Elmer
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Roswell USA
Filtereinheit (0,22 µm, Polyvinylidendifluorid)	Millipore, Bedford USA
Filtereinheit (0,2 µm/0,45 µm, Zelluloseacetat)	Schleicher & Schuell, Dassel D
Kryo-Röhrchen (Polypropylen (PP))	Nunc, Wiesbaden D
Zellkulturplatten (96-Vertiefungen, Flachboden)	Corning, Corning USA
Zellkulturplatten (96-Vertiefungen, Rundboden)	Nunc
Objektträger (mit Deckglas)	Menzel-Gläser, Braunschweig D
Objektträger-Halterungen für Cytospin	Shandon
Parafilm	ANC, Chicago USA
Petrischalen	Greiner, Kremsmünster A
Pipettenspitzen für Universalpipette (PP)	Eppendorf
Pipettenspitzen für Mehrkanalpipette (PP)	Thermo Labsystems
Pipettenspitzen für Hand-Dispenser (PP)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (PP)	Eppendorf
Saugkompressen (10 x 20 cm)	Noba, Wetter D
Injektionsspritzen (diverse Volumina)	BD Biosciences
Stab-Pipetten (Polystyrol (PS))	BD Biosciences
Zellkulturflaschen (50 ml/260 ml)	Nunc
Standardzentrifugenröhrchen (15 ml, PS)	Nunc
Standardzentrifugenröhrchen (50 ml, PP)	Sarstedt, Nümbrecht D
Zellkulturschalen (Ø 10 cm)	Corning
Injektionskanülen (diverse Größen)	B. Braun, Melsungen D

2.1.3 Chemikalien, Supplemente, Gase

Substanz	Hersteller
BetaCounter-Szintillator (halogen-, toluidinfrei)	Perkin Elmer
Bisbenzimidazol	Hoechst, Frankfurt D
Deionisiertes Wasser (<i>A. dest.</i>)	Delta Select, Pfullingen D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg D
DNase	Sigma, Taufkirchen D
Essigsäure	Merck, Darmstadt D
Ethanol (70%, unvergällt)	Merck
Formaldehyd-Lösung (35%)	Merck
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	Gibco Invitrogen, Carlsbad USA
Glycerin	Gibco Invitrogen
Kälberserum (FCS) (hitzeinaktiviert)	Gibco Invitrogen
Kaninchenserum (hitzeinaktiviert)	Sigma
Kochsalzlösung (PBS) (pH 7,4)	Biochrom, Berlin D
Kohlendioxid (gasförmig)	Messer Griesheim, Frankfurt D
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Merck
Methanol	Baker, Deventer NL
Natriumacid (NaN_3)	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	Gibco Invitrogen
Propidiumjodid (PI)	ICN, Costa Mesa USA
Rinderserum-Albumin (BSA)	DADE Behring, Marburg D
Stickstoff (flüssig)	Messer Griesheim
[6- ³ H]-Thymidin in PBS (1 mCi/ml)	Amersham, Freiburg D
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck
Trypanblau-Lösung (0,5% in PBS)	Biochrom
Zitronensäure	Merck

2.1.4 Zytokine, Fusionsproteine, Matrixproteine

Substanz	Herkunft	Hersteller
Interleukin-2 (IL-2)	Rekombinant aus <i>E. coli</i>	Cetus, Frankfurt D
Interleukin-2-Immunglobulin-G-1 (IL-2-IgG1)	Rekombinant aus J 588	AG Notter, Berlin D
Stammzellfaktor (SCF)	Rekombinant aus <i>E. coli</i>	R&D Systems, Minneapolis USA
Stammzellfaktor-Immunglobulin-G-1 (SCF-IgG1)	rekombinant aus J 588	AG Notter
Fibronektin	nativ aus Fibroblasten	Sigma
Retronektin (Fibronektin-Fragment CH-296)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Takara Cambrex, Otsu J

2.1.5 Antikörper

CD/Antigen	Konjugation	Klon	Hersteller
Kontrolle/IgG1	Fluoresceiniso- thiocyanat (FITC)	679.1Mc7	Beckman Coulter
Kontrolle/IgG2a	Phycoerythrin (PE)	U7.27	Beckman Coulter
CD 33	FITC bzw. PE	D3HL60.251	Beckman Coulter
CD 34	FITC bzw. PE	8G12	BD Biosciences
CD 64 /Fc γ R1	FITC	32.2	Medarex, Princeton USA
CD 117/ <i>c-kit</i>	PE	95C3	Beckman Coulter
Fc (Ziege-anti- Mensch, GAH)	FITC	F(ab)	Jackson Immunoresearch, West Grove USA
Fc (GAH)	-----	polyklonal	Sigma

2.1.6 Zellkulturmedien

Als Grundlage für die unterschiedlichen Zellkulturmedien wurde RPMI 1640 der Firma Gibco Invitrogen verwendet, das sich wie folgt zusammensetzt:

Bestandteil	Konzentration	Bestandteil	Konzentration
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	100 mg/l	L-Lysin-HCl	40 mg/l
KCl	400 mg/l	L-Methionin	15 mg/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	100 mg/l	L-Phenylalanin	15 mg/l
NaCl	5.500 mg/l	L-Prolin	20 mg/l
NaHCO ₃	2.000 mg/l	L-Serin	30 mg/l
NaH ₂ PO ₄	800 mg/l	L-Threonin	20 mg/l
D-Glukose	2.000 mg/l	L-Tryptophan	5 mg/l
Glutathion (reduziert)	1 mg/l	L-Tyrosin	20 mg/l
Hydroxyethylpiperazin -ethansulfonsäure	5.958 mg/l	L-Valin	20 mg/l
Phenolrot	5 mg/l	D-Biotin	0,2 mg/l
L-Arginin-HCl	240 mg/l	D-Kalziumpanthothenat	0,25 mg/l
L-Asparagin	50 mg/l	Cholinchlorid	3 mg/l
L-Asparaginsäure	20 mg/l	Folsäure	1 mg/l
L-Cystein	50 mg/l	i-Inositol	35 mg/l
L-Glutaminsäure	20 mg/l	Nikotinamid	1 mg/l
Glycin	10 mg/l	<i>para</i> -Aminobenzoessäure	1 mg/l
L-Histidin	15 mg/l	Pyridoxal-HCl	1 mg/l
L-Hydroxyprolin	20 mg/l	Riboflavin	0,2 mg/l
L-Isoleucin	50 mg/l	Thiamin-HCl	1 mg/l
L-Leucin	50 mg/l	Vitamin B ₁₂	5 x10 ⁻³ mg/l

Für die Standardzellkultur und die Experimente wurde das Grundmedium durch Zusätze in den folgenden Endkonzentrationen ergänzt:

	Standardmedium	Serumreduziertes Medium	CTLL-16- Medium
FCS	10%	5%	10%
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM
Na-Pyruvat	1 mM	1 mM	1 mM
2-ME	-----	-----	10 mM
IL-2	-----	-----	(50 U/ml)

Zur Inaktivierung des Komplements wurden alle Seren (FCS, Kaninchenserum) vor der Verwendung über 30 min im Wasserbad bei 56 °C inkubiert.

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
CS-1	human Akute myeloische Leukämie (AML)	Erben <i>et al.</i> 2003
CTLL-16	murin zytotoxische T-Lymphozyten	Gillis und Smith 1977
U-937	human Promyelozyten-Leukämie	Sundström und Nilsson 1976

2.2 Methoden

2.2.1 Standardzellkultur

Um bei unterschiedlichen Experimenten zuverlässige und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, soll sich die Zellkultur in der logarithmischen Phase (log-Phase) des Zellvermehrungszyklus befinden, in der für alle Zellen nicht limitierte Wachstumsbedingungen vorliegen. Um dies zu erreichen, wurde bei der Zellkultur regelmäßig das verbrauchte Zellmedium durch frisches ersetzt und die Zellkonzentration entsprechend dem für die jeweilige Zelllinie spezifischen Optimum neu eingestellt [Jones 1996, Lindl 2000].

Technische Geräte, Hilfsmittel

- Begasungsbrutschrank
- Zentrifuge für Standardzentrifugenröhrchen
- Sicherheitswerkbank

Chemikalien, Reagenzien, Gase

- Kulturmedien
- Ethanol (70%)
- Kohlendioxid
- IL-2

Durchführung

Es ist beim Umgang mit Zellkulturen besonders wichtig, dass alle Arbeitsschritte unter den Kautelen des sterilen Arbeitens erfolgen. Zum Eigenschutz und um das Kontaminationsrisiko für die Zellkultur zu minimieren, wurden bei allen Arbeitsschritten keimarme Einmalhandschuhe getragen. Eine halbe Stunde vor Beginn der Arbeiten wurde das Gebläse der Sicherheitswerkbank angestellt und die Fläche mit Ethanol (70%) gründlich abgewischt. Sämtliche Pipettiervorgänge und alle anderen Arbeitsschritte mit Kontaminationsgefahr für die Zellen fanden über der Arbeitsfläche der Sicherheitswerkbank statt.

Nach Entnahme der Kulturflaschen aus dem Begasungsbrutschrank wurden diese genauer inspiziert. Dabei wurde vor allem auf makroskopisch erkennbare Verfärbungen oder Pilzbefall des Kulturmediums geachtet. Anschließend wurden die

Kulturflaschen unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet, um sich einen Überblick über die Zahl sowie den Zustand der Zellen zu verschaffen und etwaige Verunreinigungen zu erkennen. Kontaminierte Kulturen wurden verworfen.

Mit Hilfe der automatischen Pipettierhilfe und steriler Stabpipetten wurde der Inhalt der Kulturflaschen in ein steriles verschließbares Zentrifugenröhrchen überführt und das Gesamtvolumen notiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren erhielt man eine gleichmäßige Zellsuspension im Röhrchen. Nach Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, 1500 rpm), wodurch ihre korpuskulären Bestandteile vom verbrauchten Medium getrennt wurden. Letzteres wurde dekantiert und das im Zentrifugenröhrchen verbliebene Zellpellet durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Je nach berechneter Gesamtzellzahl wurden die Zellen in dem entsprechenden Volumen frischen Kulturmediums aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf neue Kulturflaschen verteilt und in den Begasungsbrutschrank (+37 °C, 5,5% CO₂) gestellt.

Verwendete Zelllinien und spezifische Besonderheiten bei der Zellkultur

In den Kernexperimenten dieser Arbeit wurde die Wirkung verschiedener Komponenten der ECM auf die leukämische Zelllinie CS-1 untersucht. Zuvor wurde mit Hilfe der FACS-Technik die Rezeptor-Expression der CS-1-Zellen mit der Expression bei Zellen der Zelllinie U-937 verglichen. Mit Hilfe der IL-2-abhängigen Zelllinie CTLL-16 wurde die verwendete Methode der Bindung eines Fusionsproteins an eine Plastikmatrix überprüft.

CS-1

Die Zellen der Zelllinie CS-1 wurden in Standardmedium kultiviert, welches zweimal wöchentlich durch frisches Medium vollständig ersetzt wurde. Die Zellkonzentration beim Einsetzen in die Kulturflaschen betrug 5×10^5 c/ml (Zellen pro ml). Jeweils 20 ml frisch angesetzte Zellsuspension wurden in eine Zellkulturflasche eingefüllt. Anschließend wurde die Flasche stehend im Begasungsbrutschrank inkubiert. In einer gesunden und vitalen Zellkultur lagen die Zellen einzeln in Suspension vor und hafteten nicht aneinander.

U-937

Die Zellen der Zelllinie U-937 wurden in Standardmedium kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden jeweils 2 ml der Zellsuspension durch frisches Medium im Verhältnis 1:5 ergänzt. Jeweils 10 ml frisch angesetzte Zellsuspension wurden in eine Zellkulturflasche eingefüllt und die Flasche stehend im Begasungsbrutschrank inkubiert. Eine gesunde und vitale Zellkultur konnte man daran erkennen, dass die Zellen einzeln in Suspension vorlagen und nicht aneinander hafteten.

CTLL-16

Die Zellen der Zelllinie CTLL-16 wurden in CTLL-16-Medium mit 50 U/ml IL-2 kultiviert, welches dreimal wöchentlich vollständig durch frisches Medium ersetzt wurde. Die IL-2-Abhängigkeit der Zellen wurde regelmäßig überprüft, indem in einer Kulturflasche die Zellen in Medium ohne IL-2-Zusatz angesetzt wurden. Die Zellkonzentration beim Einsetzen in die Kulturflaschen betrug 1×10^4 c/ml. Jeweils 10 ml frisch angesetzte Zellsuspension wurden in eine Zellkulturflasche eingefüllt und die Flasche wurde stehend im Begasungsbrutschrank inkubiert. Eine gesunde und vitale Zellkultur konnte man daran erkennen, dass die Zellen entweder einzeln in Suspension vorlagen oder in lockeren Zellhaufen von nicht mehr als 10 Zellen aneinander hafteten.

2.2.2 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Neubauer-Zählkammer ermöglicht es, durch Auszählen einer überschaubaren Anzahl von Zellen und anschließender Umrechnung auf das Volumen der Zellsuspension die Konzentration sowie die Gesamtzahl der Zellen in einer Suspension zu berechnen. Durch Anfärbung mit Trypanblau können tote und vitale Zellen unterschieden werden. Trypanblau ist ein saurer, kolloidaler Farbstoff, der die Zellmembran toter Zellen durchdringt. Abgestorbene Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau, während lebende Zellen sich hell darstellen.

Technische Geräte, Hilfsmittel

- Zählkammer nach Neubauer (Abb. 7)
- Phasenkontrastmikroskop

Chemikalien, Reagenzien

- Trypanblau-Lösung

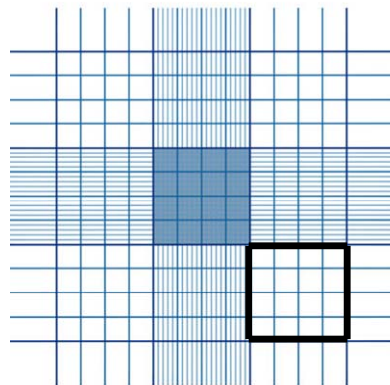


Abb. 7: Zellzählkammer nach Neubauer
Schematische Darstellung des Gitternetzes
Markierung: Großquadrat, bestehend aus 16 Kleinquadraten
[nach: Bröker und Schütt 2005]

Durchführung

Mit einer Stabpipette wurden einige Tropfen Zellsuspension in ein kleines Gefäß überführt. Dies geschah unter sterilen Bedingungen, während alle folgenden Arbeitsschritte nicht mehr über der Arbeitsfläche der Sicherheitswerkbank durchgeführt wurden. Aus dieser Zellsuspension wurden nun mit Hilfe der Präzisionspipette 50 µl aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in einem weiteren kleinen Gefäß mit dem gleichen Volumen Trypanblau-Lösung gemischt. Unter Ausnutzung der Kapillarkräfte wurde die Zell-Trypanblau-Suspension in die Neubauer-Zählkammer einpipettiert, so dass schließlich die gesamte Kammer über dem Gitterkreuz gefüllt war.

Durch Auszählen der blau gefärbten toten Zellen und der ungefärbten vitalen Zellen in den vier Großquadranten des Neubauer-Gitternetzes unter dem Mikroskop ließ sich nach folgender Formel die Vitalität berechnen:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{gefärbte + ungefärbte Zellen}} \times 100$$

Unter optimalen Kulturbedingungen war die Vitalität > 90%.

Darüber hinaus konnte durch Auszählen der ungefärbten vitalen Zellen in vier Großquadranten des Gitternetzes nach folgender Formel die Zellkonzentration berechnet werden [c/ml]:

$$\text{Zellkonzentration [10}^6 \text{ c/ml]} = \frac{\text{Zellen in vier Großquadranten}}{4} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Hieraus ließ sich nach folgender Formel die Gesamtzahl vitaler Zellen in einem vorgegebenen Volumen berechnen:

$$\text{Gesamtzahl der Zellen [10}^6 \text{ c]} = \text{Zellkonzentration [10}^6 \text{ c/ml]} \times \text{Gesamtvolumen [ml]}$$

2.2.3 Nachweis von Mykoplasmen

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien, die aufgrund ihrer Größe (0,2 – 2 µm) nicht von den handelsüblichen Bakterienfiltern zurückgehalten werden. Sie stellen eine besondere Gefahr für eine Zellkultur dar, denn sie können über einen längeren Zeitraum relativ unbemerkt in der Kultur intra- und extrazellulär persistieren. Dabei üben sie durch die Konkurrenz um die Nährstoffe, insbesondere um das L-Arginin, und durch direkte störende Einflüsse auf den Zellstoffwechsel eine negative Wirkung auf das Wachstum in der Zellkultur aus. Um bei Versuchen mit eukaryontischen Zellen reproduzier- und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es daher wichtig, die Zellkultur regelmäßig auf Befall durch Mykoplasmen zu untersuchen.

Als schnell durchführbares und zuverlässiges Verfahren hat sich die DNA-Färbung mit DNA-interkalierenden Farbstoffen wie 4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid oder Bisbenzimidazol bewährt. Die Mykoplasmen-DNA erscheint unter dem Fluoreszenzmikroskop als kleine leuchtende Punkte bzw. als fadiges Netz im Zytoplasma. Es ist wichtig, sie von den Zellkernen und von Kerntrümmern abzugrenzen, da diese sich durch den hohen Anteil an Nukleinsäure ebenfalls hell leuchtend darstellen.

Technische Geräte, Hilfsmittel

- Cytospin-Zentrifuge
- Objektträger mit Deckglas
- Fluoreszenzmikroskop

Chemikalien, Reagenzien

- Blockierungslösung: 0,1% BSA und 0,02% NaN₃ in PBS
- Carnoy´sche Lösung: 80% Methanol
20% Essigsäure
- Färbelösung: 100 ng/ml Bisbenzimidazol in *A. dest.*
- Eindeckmedium: 50% Glycerin
22 mM Zitronensäure
58 mM Na₂HPO₄

Durchführung

Die Suspensionszellen wurden in den ersten Arbeitsschritten auf einen Objektträger gebunden. Hierzu wurde mit Hilfe der Cytospin-Zentrifuge der Objektträger mit 50 µl Blockierungslösung benetzt (1 min, 750 rpm) und anschließend auf dasselbe Glas 2×10^4 Zellen zentrifugiert (2 min, 500 rpm). Das so hergestellte Präparat wurde 30 min an der Luft getrocknet und anschließend ebenfalls für 30 min in Carnoy'scher Lösung fixiert und getrocknet. Auf das Präparat wurden nun 10 µl Färbelösung pipettiert und der Objektträger erneut für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abwaschen der ungebundenen Färbelösung wurde der Objektträger zweimal in *A. dest.* getaucht und an der Luft getrocknet. Abschließend wurden 10 µl Eindeckmedium auf das Präparat pipettiert und ein Deckglas aufgelegt. Innerhalb einer Stunde wurde das auf diese Weise hergestellte Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 365 nm bewertet. Zellkulturen mit Mykoplasmen-Befall wurden verworfen.

2.2.4 Einfrieren von Zellen

In flüssigem Stickstoff (-196 °C) ist es möglich, Zellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren (Kryopräservierung). Während des kritischen Übergangs vom Vitalzustand in den gefrorenen Zustand kann die Zelle sehr leicht geschädigt werden, weshalb hier besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden müssen.

Dem Einfriermedium wird das Schutzmittel DMSO zugesetzt, welches die Kristallisationsgeschwindigkeit ändert und hierdurch die asynchrone Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie die Dehydratation des Zytoplasmas verhindert. Da DMSO auf vitale Zellen im nicht gefrorenen Zustand als Zellgift wirkt, müssen die Zellen nach Kontakt mit DMSO möglichst rasch eingefroren werden. Das Einfrieren erfolgt in zwei Etappen, zunächst vorübergehend bei -80°C und anschließend zur endgültigen Lagerung bei -196°C.

Technische Geräte, Hilfsmittel

- Sicherheitswerkbank
- Zentrifuge für Standardzentrifugenröhrchen
- Eisbad
- Zählkammer nach Neubauer
- Tiefkühlschrank (-80 °C)
- Tiefkühl-Stickstofftank (-196 °C)

Chemikalien, Reagenzien

- FCS
- DMSO
- Einfriermedium: 80% FCS
20% DMSO

Durchführung

Im ersten Arbeitsschritt wurden die einzufrierenden Zellen in einem Standardzentrifugenröhrchen zusammenpipettiert und die Gesamtzellzahl bestimmt. Durch Zentrifugation (5 min, 1500 rpm) wurden die Zellen anschließend vom verbrauchten Medium getrennt und letzteres dekantiert. Das im Röhrchen verbleibende Zellpellet wurde mit einer Zellkonzentration von 1×10^7 c/ml in FCS resuspendiert. Das Röhrchen mit der Zellsuspension wurde in das Eisbad gestellt.

In einem zweiten Röhrchen wurde nun das gleiche Volumen Einfriermedium vorbereitet, indem man 80% FCS vorlegte und dann schnell 20% DMSO hinzupipettierte. Auch das Einfriermedium wurde auf Eis gestellt. Das eisgekühlte Einfriermedium wurde mit der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach diesem Arbeitsschritt lagen die Zellen nun in einer Konzentration von 5×10^6 c/ml in einer Einfrierlösung vor, welche sich aus 90% FCS und 10% DMSO zusammensetzte. Die Zellsuspension wurde zügig mit *Aliquots* à 2 ml in vorgekühlte Kryo-Röhrchen überführt und diese unmittelbar im Tiefkühlschrank bei -80 °C tiefgefroren. Nach frühestens 30 min wurden die Kryo-Röhrchen in einen Stickstoff-Tiefkühltank (-196 °C) überführt.

2.2.5 Auftauen von Zellen

Beim Auftauen von Zellen sind, ebenso wie bei der Kryopräservierung, bestimmte Vorsichtsmaßnahmen zu beachten, damit die Zellen beim Übergang vom gefrorenen in den vitalen Zustand nicht geschädigt werden.

DMSO, das tiefgefrorenen Zellen als Frostschutzmittel zugefügt wird, ist ein reduzierendes Agens und damit ein potentes Zellgift [Wünsch *et al.* 1980]. Nach dem Auftauen der Zellen muss DMSO daher zügig aus der Lösung entfernt werden.

Da es beim Auftauvorgang immer auch zum Absterben von Zellen kommt und diese sterbenden Zellen durch Lyse DNA freisetzen, wird dem Auftaumedium DNase zugesetzt, um eine Verklumpung der Zellsuspension durch DNA-Stränge zu verhindern.

Technische Geräte, Hilfsmittel

- Sicherheitswerkbank
- Eisbad
- Warmwasserbad (+37 °C)
- Zählkammer nach Neubauer
- Zentrifuge für Standardzentrifugenröhrchen

Chemikalien, Reagenzien

- Kulturmedien
- Auftaumedium: Kulturmedium mit 0,1 mg/ml DNase

Durchführung

Vor dem Auftauen der Zellen wurden pro aufzutauendem Kryo-Röhrchen 20 ml Auftaumedium hergestellt und im Eisbad gekühlt. Das Kryo-Röhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurde bei +37 °C im Wasserbad angetaut, bis nur noch der Kern der Zellsuspension im Röhrchen gefroren war. Das Kryo-Röhrchen wurde geöffnet und die getaute Zellsuspension mit einer Stabpipette in ein vorgekühltes Standardzentrifugenröhrchen überführt. Alle jetzt folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zu den getauten Zellen wurden nun langsam 8 ml des Auftaumediums in das Zentrifugenröhrchen getropft und die Suspension durch

vorsichtiges Aufschütteln gemischt. In einem ersten Waschgang wurden mit Hilfe der Zentrifuge die Zellen vom DMSO-haltigen Überstand getrennt (5 min, 1.500 rpm). Letzterer wurde dekantiert und das Zellpellet in 10 ml Auftaumedium resuspendiert. In einem zweiten Waschgang wurde die Suspension erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Diesmal wurde das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium ohne DNase aufgenommen und resuspendiert. Daraus wurden Zellzahl und Vitalität bestimmt und die Zellsuspension abschließend mit der entsprechenden Menge Kulturmedium so verdünnt, dass man die für die Kultur dieser Zelllinie optimale Zellkonzentration im Kulturmedium erhielt.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist eine Methode, mit deren Hilfe sich die einzelnen Zellen einer Zellsuspension nach Antikörpermarkierung aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften näher charakterisieren lassen (Abb. 8).

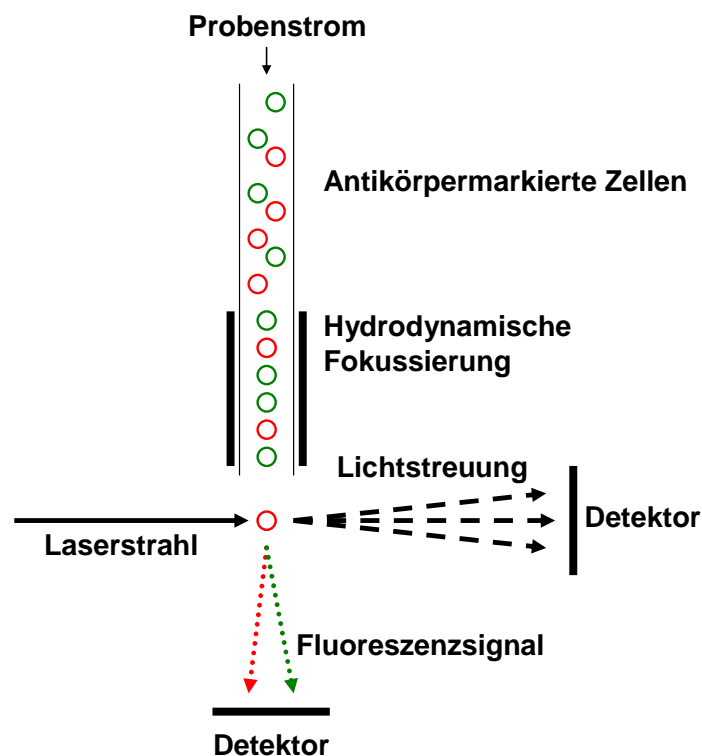


Abb. 8: Funktionsprinzip des Durchflusszytometers

Die Zellen werden durch eine Stahlkapillare aus dem Probenröhrchen in das Analysegerät aufgenommen und mit einer Durchflussrate von circa 500 Zellen pro Sekunde perlschnurartig aneinandergereiht an einer Argonlaser-Lichtquelle (Wellenlänge 488 nm) vorbeigeführt. Durch die Zellen wird der einfallende Laserstrahl abgelenkt und gestreut. Das Vorwärts-Streulicht (*Forward Scatter*) lässt dabei Rückschlüsse auf die Zellgröße und das Seitwärts-Streulicht (*Side Scatter*) auf die Granularität der Zelle zu. Zusätzlich können fluoreszenzmarkierte Antikörper an spezifische Antigen-Komplexe auf der Zelloberfläche gebunden werden. Bei Anregung durch den Laserstrahl wird vom Fluoreszenzfarbstoff Licht spezifischer Wellenlänge (FITC: 519 nm, PE: 578 nm) emittiert, welche vom Gerät registriert wird [Raffael 1995].

Technische Geräte, Hilfsmittel

- Sicherheitswerkbank
- Zentrifuge für Standardzentrifugenröhrchen
- Eisbad
- Durchflusszytometer

Chemikalien, Reagenzien

- FACS-Puffer: 0,5% BSA mit 0,01% NaN₃ in PBS
- PI-Lösung: 0,05 mg/ml PI in PBS
- Blockierungslösung: Kaninchenserum (hitzeinaktiviert)
- Antikörperlösungen: vgl. 2.1.5

Durchführung

Waschen der Zellen

5 x 10⁵ Zellen wurden aus der Kultur in ein FACS-Röhrchen überführt. Zum Waschen wurden 2 ml FACS-Puffer hinzupipettiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (5 min, 1500 rpm) und der Überstand dekantiert. Um den FACS-Puffer möglichst vollständig vom Zellpellet zu entfernen, wurde das FACS-Röhrchen mit der Öffnung nach unten auf sauberem Zellstoff abgetropft. Abschließend wurde das Zellsediment durch vorsichtiges Aufschütteln im Restvolumen resuspendiert.

Blockierung unspezifischer Bindungen

Da die spezifischen Antikörper auch an Fc-Rezeptoren auf den Zellen binden und dadurch unspezifische Signale erzeugen können, müssen diese Rezeptoren vor der FACS-Färbung durch Präinkubation mit unspezifischen Immunglobulinen gesättigt werden. Hierfür wurde zu den gewaschenen Zellen 50 µl hitzeinaktiviertes Kaninchenserum hinzupipettiert.

Bindung direkt-konjugierter Antikörper

Nach Blockierung der unspezifischen Bindungen wurden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff direkt konjugierten monoklonalen Antikörper in dem vom Hersteller empfohlenen Volumen (5 – 20 µl) zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen zur Inkubation 30 min im Dunkeln auf Eis gestellt. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und resuspendiert.

Bindung von unkonjugierten Antikörpern

Nach Blockierung der unspezifischen Bindungen wurde der unkonjugierte humanspezifische Antikörper in dem vom Hersteller empfohlenen Volumen zu den Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und resuspendiert. In einem zweiten Arbeitsschritt wurde 1 µg eines mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Zweit-Antikörpers zu den durch den Erst-Antikörper markierten Zellen hinzupipettiert. Die Zellen wurden erneut 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert und anschließend gewaschen und resuspendiert.

Bindung von Fusionsproteinen

Das gereinigte SCF-IgG1-Fusionsprotein wurde in Standardmedium auf eine Konzentration von 5 µg/ml eingestellt. Für das IL-2-IgG1 wurde ein Zellkulturüberstand mit einer Konzentration von $1,1 \times 10^4$ U/ml verwendet. 5×10^5 Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen aufgenommen und gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml der Fusionsprotein-Verdünnung auf Eis inkubiert (SCF-IgG1: 10 min; IL-2-IgG1: 30 min). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut gewaschen. Ungesättigte Bindungen wurden durch Kaninchen-serum geblockt, die Zellen gewaschen und resuspendiert. Anschließend wurde 1 µg des FITC-konjugierten Fc-spezifischen Antikörpers zu den Zellen pipettiert und diese 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und resuspendiert.

Vitalfärbung

Zur Überprüfung der Vitalität der zu untersuchenden Zellen eignet sich die PI-Färbung. PI dringt aufgrund der Membranschädigung vornehmlich in apoptotische und nekrotische Zellen ein und führt dort zu einer Interkalierung der DNA. Nach Bindung der Antikörper wurden 100 µl PI-Lösung zu den Zellen in das FACS-Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden für 10 min im Dunkeln auf Eis inkubiert, anschließend gewaschen und für die durchflusszytometrische Messung in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.7 Vorbehandlung von Zellkulturplatten

Biologisch aktive Proteine können über Antikörper spezifisch und gerichtet an Plastikoberflächen gebunden werden (Abb. 9).

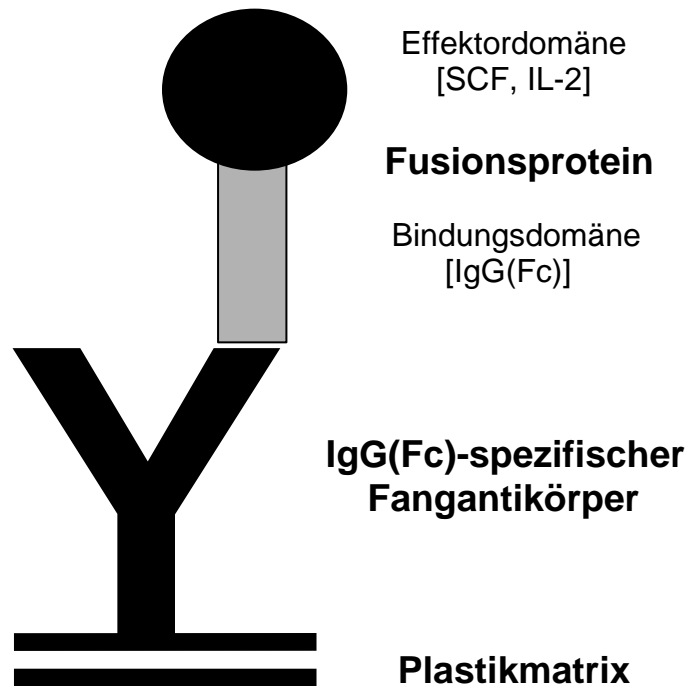


Abb. 9: Bindung von IgG(Fc)-Fusionsproteinen an eine Plastikmatrix

Die Bindung von IgG(Fc)-Fusionsproteinen erfolgt in zwei Schritten:

(1) Aufgrund der elektrischen Ladungsverhältnisse binden Proteine als geladene Moleküle an ebenfalls geladene Plastikoberflächen von Zellkulturplatten. Diese Eigenschaft wird sowohl bei der Bindung IgG(Fc)-spezifischer Fangantikörper als auch bei der Bindung weiterer Matrixkomponenten wie Retronektin und Fibronectin genutzt. Nicht besetzte Bindungsstellen werden durch ein im Versuch inertes Protein blockiert.

(2) Ein IgG(Fc)-Fusionsprotein wird aufgrund der spezifischen Antigen-Antikörper-Wechselwirkung über die Bindungsdomäne gerichtet an die Fangantikörper auf der Innenseite der Zellkulturgefäße gebunden.

Technische Geräte, Hilfsmittel

- Sicherheitswerkbank
- Begasungsbrutschrank
- Kühlschrank (+4 °C)

Chemikalien, Reagenzien

- Antikörperlösungen:

Nr.	Puffer	IgG(Fc) polyklonal	Retronektin	Fibronektin
1	TrisHCl (pH 9,5)	10 µg/ml	---	---
2	PBS (pH 7,4)	10 µg/ml	---	---
3	PBS (pH 7,4)	10 µg/ml	0,5 – 5 µg/ml	---
4	PBS (pH 7,4)	10 µg/ml	---	0,5 – 5 µg/ml

- Blockierungspuffer: 0,1% BSA in PBS
- Zytokin-/Fusionsprotein-Lösung
- Serumreduziertes Medium

Durchführung

Bei allen Pipettierschritten musste darauf geachtet werden, dass die proteinarmen Lösungen nicht mit Polystyrol (PS) in Kontakt kommen, da dieser Kunststoff eine große Menge Proteine binden und die Versuchsergebnisse verfälschen könnte.

Bindung des Fangantikörpers und Blockierung unspezifischer Bindungen

In jede Vertiefung der Zellkulturplatte mit flachem Boden wurden mit einem Hand-Dispenser jeweils 100 µl Antikörperlösung oder Puffer pipettiert und die Platte für 2 h bei +37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellkulturplatte auf einer sterilen Saugkompressen ausgeblasen. Mit der Mehrkanalpipette wurden in jede Vertiefung 200 µl Blockierungspuffer pipettiert und die Platte entweder erneut 2 h bei +37 °C oder 12 h im Kühlschrank bei +4 °C inkubiert. Anschließend wurden in zwei Waschschrritten nicht anhaftende Proteine aus den Vertiefungen ausgespült. Dazu wurde die Platte auf einer sterilen Saugkompressen ausgeblasen und anschließend mit einer Mehrkanalpipette in jede Vertiefung 200 µl serumreduziertes Medium pipettiert.

Bindung von IgG1-Fusionsproteinen

Die Fusionsproteinlösungen wurden in einer Rundboden-Zellkulturplatte titriert (externe Titration). In die Reihen (B-H) dieser Platte wurden 120 µl serumreduziertes Medium und in die oberste Reihe (A) 240 µl der Fusionsproteinlösung mit der Ausgangskonzentration vorgelegt. Jeweils 120 µl dieser Lösung wurden mit einer Mehrkanalpipette in die nachfolgende Reihe (B) übertragen und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Die Wiederholung dieses Schrittes (120 µl aus B nach C, 120 µl aus C nach D, usw.) führte zu einer Titration in logarithmisch absteigenden Konzentrationen (Abb. 10).

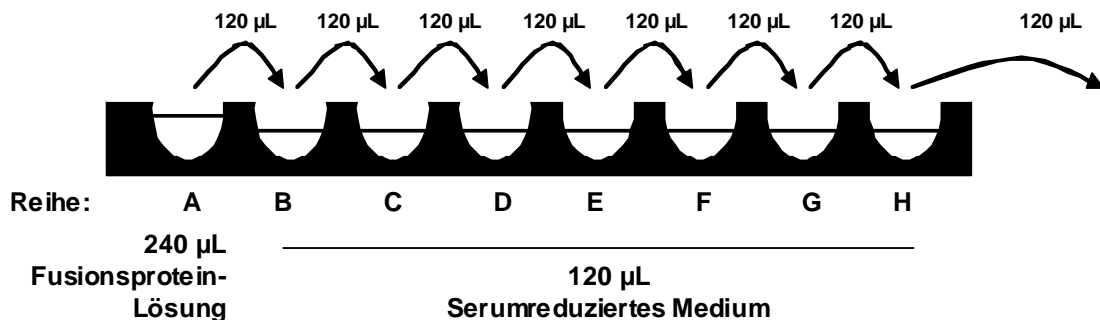


Abb. 10: Herstellung einer externen Verdünnungsreihe

Die vorbehandelte Flachboden-Zellkulturplatte mit den gebundenen Fangantikörpern wurde nach dem letzten Waschschrift ausgeglichen. In jede Vertiefung dieser Platte wurden mit einer Mehrkanalpipette 100 µl aus der entsprechenden Vertiefung der Rundboden-Platte (externen Titration) übertragen. Die Flachboden-Platte wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur mit der Fusionsproteinlösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde nicht gebundenes Protein in zwei Waschschriften wie oben beschrieben herausgewaschen. In jede Vertiefung wurden nun 100 µl des serumreduzierten Kulturmediums vorgelegt.

Zellkultur in vorbehandelten Zellkulturplatten

3×10^6 CTLL-16-Zellen oder $1,2 \times 10^7$ CS-1-Zellen aus der laufenden Zellkultur wurden in ein Standardzentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Das verbrauchte Medium wurde dekantiert und das Zellpellet in 30 ml serumreduziertem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und in 20 ml serumreduziertem Medium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension mit dem entsprechenden Volumen an serumreduziertem Medium so weit verdünnt, bis eine für die entsprechenden Zellen optimale Zellkonzentration erreicht wurde (CTLL-16: 1×10^5 c/ml; CS-1: 4×10^5 c/ml). Jeweils 100 μ l dieser Zellsuspension wurden in jede Vertiefung der vorbereiteten Flachboden-Zellkulturplatten bzw. in Zellkulturplatten mit Titrationsreihen gelöster Zytokine und Fusionsproteine überführt. Die Zellkulturplatten wurden im Be-gasungsbrutschrank bei 37 °C und 5,5% CO₂ insgesamt 24 h (CTLL-16) bzw. 72 h (CS-1) inkubiert und die Proliferation durch [³H]-Thymidin-Einbau bestimmt.

2.2.8 [³H]-Thymidin-Proliferationsassay

Während der Synthese-Phase (S-Phase) des Zellzyklus wird die DNA repliziert. Für diesen Replikationsvorgang benötigt die Zelle die vier Nucleoside Adenosin, Guanosin, Cytidin und Thymidin, aus denen sich der genetische Code der DNA zusammensetzt. Wenn man einer Zellkultur während eines Zeitraums von mindestens 4 und maximal 18 Stunden radioaktiv markiertes [³H]-Thymidin zur Verfügung stellt, wird dieses mit in die DNA eingebaut. Anschließend kann die radioaktiv markierte DNA auf einen Glasfaserfilter mit hoher Bindungskapazität für Nucleinsäuren gebunden werden. Durch eine Szintillator-Lösung wird die durch den radioaktiven Zerfall des markierten [³H]-Thymidins freigesetzte β -Strahlung in sichtbares Licht umgewandelt. Die Menge der emittierten β -Strahlung wird im Szintillationsmessgerät als Zählereignisse pro Minute (*counts per minute*, cpm) registriert und dient als ein Maß für die Zellproliferation. Auf diese Weise lässt sich die Proliferationsfähigkeit von Zellkulturen zuverlässig vergleichen.

Technische Geräte, Hilfsmittel

- Sicherheitswerkbank (zum Arbeiten mit radioaktiven Substanzen)
- Begasungsbrutschrank
- Tiefkühlschrank (-80 °C)
- Mikrowelle
- Szintillationsmessgerät (BetaCounter)
- BetaCounter-Zubehör (Ansaugvorrichtung, Vakuumpumpe, Folienschweißgerät, Lampe, Filtermatten, Einschweißtüten)

Chemikalien, Reagenzien

- [³H]-Thymidin-Lösung (25 μ Ci/ml in PBS)
- PBS
- BetaCounter-Szintillator
- *A. dest.*

Sicherheitshinweise

Die Arbeit mit radioaktiven Materialien darf nur an eigens dafür ausgewiesenen Plätzen mit ausdrücklich dafür vorgesehenen Hilfsmitteln und unter Berücksichtigung besonderer Sicherheitshinweise erfolgen. Da [³H] als β-Strahler nur eine Reichweite von wenigen Zentimetern in Luft besitzt, besteht eine Gefährdung für den Anwender vornehmlich durch Inkorporation, da das radioaktiv markierte Thymidin auch in menschliche Zellen eingebaut werden könnte. Das [³H] besitzt eine Halbwertszeit von 12,3 Jahren und muss daher als radioaktiver Sondermüll entsorgt werden.

Durchführung

Die Zellkulturplatten sowie das [³H]-Thymidin wurden in einer für radioaktive Arbeiten vorgesehenen Sicherheitswerkbank bereitgestellt. Mit einem Hand-Dispenser und sterilen Pipettenspitzen wurden in jede Vertiefung 10 µl [³H]-Thymidin-Lösung einpipettiert. Die Zellkulturplatten wurden für weitere vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mindestens für eine Stunde in einem Gefrierschrank bei – 80 °C tiefgefroren. Die Kulturplatten wurden bei 37 °C wieder aufgetaut. In der Ansaugvorrichtung wurden die eingespannten Filtermatten zunächst durch destilliertes Wasser benetzt. Anschließend wurde mit Hilfe der Ansaugvorrichtung und der Vakuumpumpe die Lösung aus den Kulturplatten aufgesaugt und auf die Filtermatten übertragen. Die einzelnen Vertiefungen der Zellkulturplatte wurden in drei vollautomatischen Spülgängen abschließend mit *A. dest.* ausgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls durch die Filtermatte gefiltert. Durch Markierungen auf der Filtermatte war auch nach dieser Prozedur eine eindeutige Zuordnung zu den Positionen der einzelnen Vertiefungen der Zellkulturplatte möglich. Die Filtermatten wurden im Mikrowellen-Gerät getrocknet (20 min, 150 W), mit 12 ml Szintillatorlösung vollständig benetzt, in transparente Tüten eingeschweißt und mit speziellen Halterungen in das Szintillationsmessgerät (BetaCounter) eingestellt. Durch die Szintillatorlösung wurde die emittierte β-Strahlung in Lichtszintillationen umgewandelt, welche vom Gerät für jedes Feld auf der Filtermatte und damit für jede Mikrokultur jeweils eine Minute lang registriert wurden. Die Aktivität dieser Szintillationen war ein Maß der von den Zellen in die DNA eingebauten [³H]-Thymidin-Menge und damit der Proliferation der Zellen.

2.3 Statistische Auswertung

Die Standardabweichung ($SD = \sigma_{n-1}$) vom Mittelwert (\bar{x}) wurde bei drei bis sechs Proben eines experimentellen Ansatzes nach der folgenden Formel geschätzt:

$$SD = \sigma_{n-1} = +\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

(n = Anzahl der Proben; x_i = Einzelmesswert)

Die statistische Auswertung aller Versuche erfolgte durch ANOVA-Varianzanalyse [<http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>] und anschließend durch multiplen t-Test mit adjustierten Signifikanzschwellen nach Bonferroni [<http://www.graphpad.com/quickcalcs/posttest1.cfm>]. Der Vergleich zweier unterschiedlicher experimenteller Ansätze erfolgte mit Hilfe des Rangsummentests nach Wilcoxon für zwei unverbundene Stichproben [Lentner 1980].