

4 Methoden

4.1 Enzymimmunoassay (EIA)

4.1.1 Bestimmung der Zytokine IFN γ , IL-4 und IL-6

Zur Bestimmung der Zytokine IFN γ , IL-4 und IL-6 wurden Tests der Firma Hölzel Diagnostica Handels GmbH, Pelikine CompactTM human IFN γ ELISA kit (Pelikine CompactTM human IL-4 ELISA kit, Pelikine CompactTM human IL-6 ELISA kit) verwendet.

4.1.1.1 Prinzip des Assays

Es handelt sich bei diesen Tests um ein „Sandwich“-Enzymimmunoassay (**Abbildung 4**).

1. An die Polystyreno­berfläche der Mikrotiterplatten bindet ein monoklonaler Antikörper gegen humanes IFN γ (IL-4, IL-6).
2. Hinzugegebenes humanes IFN γ (IL-4, IL-6) bindet an den oberflächengebundenen monoklonalen Anti-IFN γ -(IL-4, IL-6)-Antikörper. Das ungebundene Material wird durch Waschen entfernt.
3. Anschließend wird ein biotinylierter polyklonaler Antikörper gegen humanes IFN γ (IL-4, IL-6) hinzugefügt. Auf diese Weise bildet sich ein „Sandwich“ zwischen dem Zytokin und den Antikörpern aus.
4. Nach dem Herauswaschen des überschüssigen biotynilierten Antikörpers wird mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin hinzugegeben. Dieses bindet an die biotinylierte Seite des Antikörper-Zytokin-Antikörper-Komplexes.
5. Nach Entfernung des überschüssigen HRP-Konjugats und Zugabe von weiteren Substrat- und Enzymsystemen kommt es über eine in mehreren Schritten verlaufende Enzymkaskade zur
6. Farbentwicklung, deren Intensität mit der IFN γ -(IL-4, IL-6)-Konzentration korreliert.
7. Die Reaktionskinetik wird durch Schwefelsäure gestoppt und innerhalb von 30 Minuten erfolgt bei einer Wellenlänge von 450 nm die Messung der Absorptionen.

Anhand einer Standardkurve, gebildet durch die Standardabsorptionen, werden die Konzentration von IFN γ (IL-4, IL-6) bestimmt.

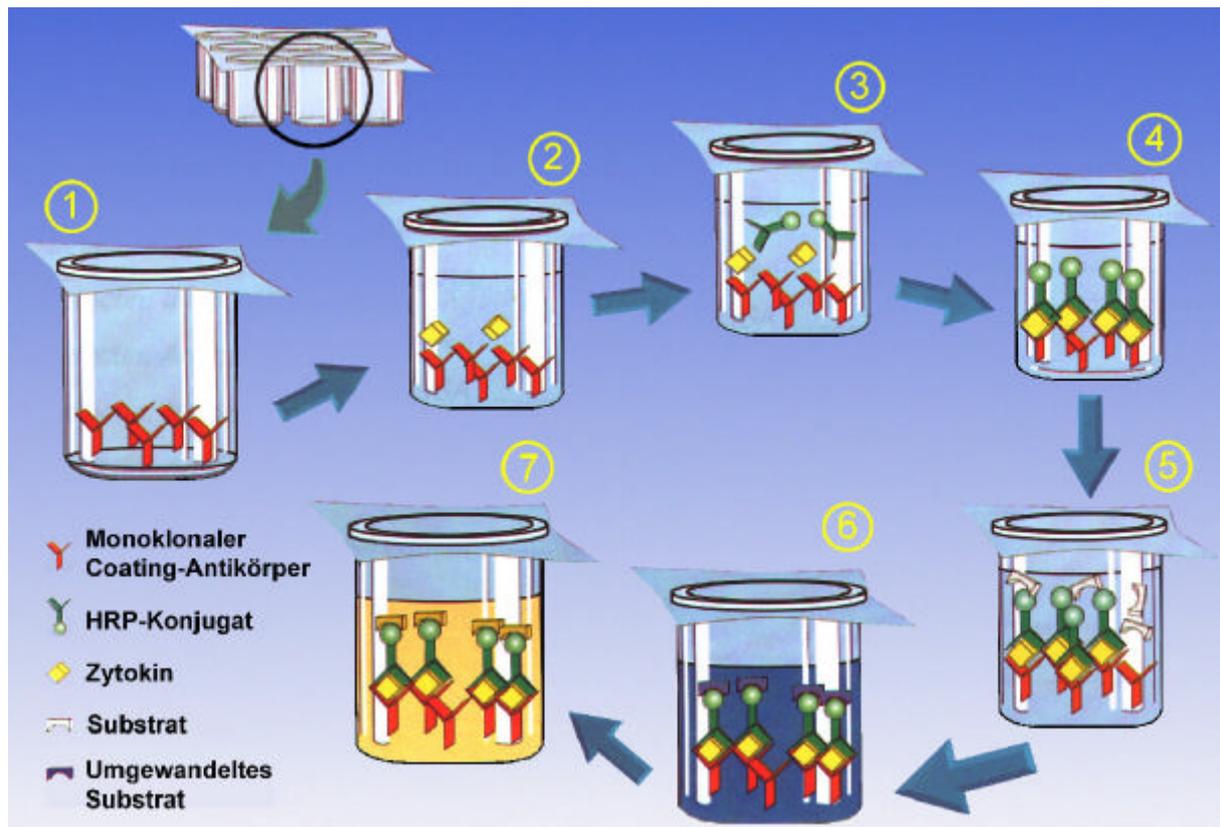


Abbildung 4: Prinzip des Enzymimmunoassay (EIA)

4.1.1.2 Assaykomponenten und Reagenzien

Die Konzentrationen der einzelnen Zusätze wurden teilweise nicht bekanntgegeben.

- ▶ **Coating-Antikörper:** 100fach konzentriert (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)
- ▶ **Block-Reagenz:** 50fach konzentriert (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)
- ▶ **IFN γ -Standard 6300 pg/ml:** Ein natürlicher humaner IFN γ -Standard kalibriert gegen die WHO-Referenz-Präparation (IFN γ 88/606; National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, U.K. 1 WHO Unit = 53 pg IFN γ), (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)

(**IL-4-Standard 5850 pg/ml:** Ein rekombinanter humaner IL-4-Standard kalibriert gegen den WHO First International Standard (IL-4 88/656; National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, U.K. 1 WHO Unit = 100 pg IL-4)), (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)

(**IL-6-Standard 3500 pg/ml:** Ein rekombinanter humaner IL-6-Standard kalibriert gegen den WHO First International Standard (IL-6 88/548; National Institute for Biological

Standards and Control, Potters Bar, Hertfordshire, U.K. 1 WHO Unit = 10 pg IL-6)), (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)

- ▶ **Biotinylierter IFN γ -Antikörper:** 100fach konzentriert, (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)
(Biotinylierter IL-4-Antikörper: 100fach konzentriert), (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)
(Biotinylierter IL-6-Antikörper: 100fach konzentriert), (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)
- ▶ **Streptavidin-HRP-Konjugat:** 10.000fach konzentriert (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)
- ▶ **Verdünnungspuffer:** 5fach konzentriert (Aufbewahrung bei -18°C bis -32°C)
- ▶ **Coating-Puffer:** 0,1 molarer Karbonat/Bikarbonat-Puffer pH=9,6 (Aufbewahrung bei 2°C bis 8°C)
- ▶ **PBS-Lösung:** 0,2 molares Phosphate Buffered Saline (PBS) (Aufbewahrung bei 2°C bis 8°C)
- ▶ **Waschpuffer:** PBS mit 0,005% TWEEN 20 (Aufbewahrung bei 2°C bis 8°C)
- ▶ **TMB-Substrat-Lösung:** 0,11 molares Natrium-Azetat ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 6mg/ml 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine (TMB) in DMSO, 3% H_2O_2 ; (Aufbewahrung bei 2°C bis 8°C)
- ▶ **Stopplösung:** 0,18 molare H_2SO_4 -Lösung (Aufbewahrung bei 2°C bis 8°C)
- ▶ **Polystyren-Mikrotiterplatte** mit 96 Nöpfchen und mit Deckel
- ▶ **Folienaufkleber** zum Versiegeln der Mikrotiterplatte

4.1.1.3 Geräte

8-Kanal-Multipipette (Titertek[®] Digital Multichannel Pipette 50-200 μl), Mikropipetten 1-5 μl , 5-20 μl , 10-100 μl , 20-200 μl (Gilson Pipetman[®]), Zentrifuge (Haeraeus Sepatech Megafuge 1.0R), Plattenschüttler und Vortex (IKA[®] MS1 Minishaker), Schüttler (Fa. Edmund Bühler Swip KL-2), Plattenwascher (SLT Instruments Plate Washer 812 SW1), Photometer (DPC Milenia[™] Kinetic Analyzer), Auswertungsprogramm (Softmax 2.01d).

4.1.1.4 Durchführung

Alle Reagenzien, mit Ausnahme des HRP-Konjugats, werden vor Benutzung auf Raumtemperatur gebracht und geschwenkt. Das HRP-Konjugat wird kurz vor Gebrauch mit dem entsprechenden Lösungsmittel gelöst.

Die praktische Durchführung erfolgt über zwei Tage.

1. Tag

Coating:

120 µl Coating-Antikörper werden in 12 ml Coating-Puffer verdünnt. Anschließend gibt man 100 µl dieser Lösung in jedes Nöpfchen der Mikrotiterplatte. Die Mikrotiterplatte wird mit dem verschlossenem Deckel über Nacht bei Zimmertemperatur (18-25°C) inkubiert. Hierbei erfolgt die Beschichtung der Platte mit dem monoklonalen Antikörper gegen humanes IFN γ (IL-4, IL-6). Es wird eine 1:20 Verdünnung des oben beschriebenen 0,2 molaren PBS mit destilliertem Wasser hergestellt. Vom oben beschriebenen Verdünnungspuffer wird eine 1:5-Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt. 50 ml Waschpuffer werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst.

2. Tag:

1. Waschprozedur:

Die Mikrotiterplatte wird mit dem 1:20 verdünnten PBS fünfmal durch den Wascher gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen.

Blockprozedur:

Zunächst verdünnt man 500 µl des oben beschriebenen Blockreagenzes in 25 ml des 1:20 verdünnten PBS. 200 µl dieser Lösung gibt man in jedes Nöpfchen und inkubiert die Platte auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) eine Stunde lang bei Raumtemperatur, nachdem man sie mit einem Folienaufkleber versiegelt hat.

2. Waschprozedur:

Die Platte wird fünfmal mit dem verdünnten Waschpuffer unter zu Hilfenahme des Wascher gewaschen.

1. Inkubation:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	P1	P1
B	S2	S2
C	S3	S3
D	S4	S4
E	S5	S5
F	S6	S6
G	S7	S7	P39	P39
H	S8	S8	B	B

Tabelle 6: Plattenplan (S1-S8: Standards; B: Substrat-Blank; P1-P39: Proben)

Es werden jeweils 100 µl des Standards (IFN γ , IL-4 bzw. IL-6) und 100 µl der Serumproben paarweise in die Nöpfchen gegeben. Die Substrat-Blanks werden leer gelassen. Die Platte wird anschließend mit einem Folienaufkleber versiegelt und auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert.

	IFN γ	IL-4	IL-6
Standard 1	900	450	450
Standard 2	300	150	150
Standard 3	100	50	50
Standard 4	33,3	16,7	16,7
Standard 5	11,1	5,6	5,6
Standard 6	3,7	1,9	1,9
Standard 7	1,2	0,6	0,6
Standard 8	0	0	0

Tabelle 7: Standardkonzentrationen in pg/ml

3. Waschprozedur:

Siehe 2. Waschprozedur.

2. Inkubation:

Zunächst verdünnt man 120 µl des Biotinylierter IFN γ -Antikörpers (Biotinylierter IL-4-Antikörpers, Biotinylierter IL-6-Antikörpers) in 12 ml des 1:5 verdünnten Verdünnungspuffers. 100 µl dieser Lösung gibt man in jedes Nöpfchen und inkubiert die Platte auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) eine Stunde lang bei Raumtemperatur, nachdem man sie mit einem Folienaufkleber versiegelt hat. Die Substrat-Blanks werden leer gelassen.

4. Waschprozedur:

Siehe 2. Waschprozedur.

3. Inkubation:

Zunächst verdünnt man 3 µl des Streptavidin-HRP-Konjugats in 30 ml des 1:5 verdünnten Verdünnungspuffers. 100 µl dieser Lösung gibt man in jedes Nöpfchen und inkubiert die Platte auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) eine halbe Stunde lang bei Raumtemperatur nachdem man sie mit einem Folienaufkleber versiegelt hat. Die Substrat-Blanks werden leer gelassen.

5. Waschprozedur:

Siehe 2. Waschprozedur.

4. Inkubation:

100 µl der TMB-Substrat-Lösung gibt man in jedes Nöpfchen und inkubiert die Platte mit dem Deckel verschlossen eine halbe Stunde lang auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Substrat-Blanks werden diesmal ebenfalls gefüllt.

Stopreaktion:

Zuletzt gibt man 100 µl der Stoplösung in jedes Nöpfchen (inklusive der Substrat-Blanks) und führt innerhalb einer halben Stunde mit dem an einen Computer angeschlossenen Photometer die photometrischen Messungen bei einer Wellenlänge von 450 nm durch.

4.1.1.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte automatisch im Anschluß an die photometrische Messung mit dem Programm Softmax, Version 2.01d. Dabei berechnet das Programm für jedes Nöpfchenpaar die Mittelwerte der Absorptionen. Das Programm subtrahiert den berechneten Mittelwert des

Blanks von allen anderen berechneten Mittelwerten der restlichen Nöpfchen. Im Anschluß daran werden die ermittelten Absorptionen der Standards auf die Ordinate und deren Konzentrationen auf die Abszisse einer log-linearen Koordinate aufgetragen. Anhand der daraus berechneten Standardkurve werden die Konzentrationen der untersuchten Proben bestimmt.

Laut Herstellerangaben haben die Teste folgende Sensitivitäten:

Der EIA-Test für **IFN γ** hat eine Sensitivität von 1 pg/ml (Leerwert + 3SD) und 3 pg/ml (2 x Leerwert).

Der EIA-Test für **IL-4** hat eine Sensitivität von 0,2 pg/ml (Leerwert + 3SD) und 0,5 pg/ml (2 x Leerwert).

Der EIA-Test für **IL-6** hat eine Sensitivität von 0,2 pg/ml (Leerwert + 3SD) und 0,5 pg/ml (2 x Leerwert).

4.1.2 Bestimmung des Zytokins IL-12

Zur Bestimmung des Zytokins IL-12 wurde ein Test der Firma Genzyme Diagnostics Predicta® Human Total Interleukin-12 ELISA Kit verwendet.

4.1.2.1 Prinzip des Assays

Es handelt sich bei diesem Test ebenfalls um ein „Sandwich“-Enzymimmunoassay. Das Prinzip ist bereits unter Punkt 4.1.1.1 beschrieben.

4.1.2.2 Assaykomponenten und Reagenzien

Die Konzentrationen der einzelnen Zusätze wurden teilweise nicht bekanntgegeben.

Alle Substanzen werden bei 2-8°C gelagert.

- ▶ **Polystyren-Mikrotiterplatte** (96 Nöpfchen), die bereits mit Maus-monoklonalem Antikörper gegen humanes IL-12 beschichtet ist.
- ▶ **Waschkonzentrat**: 20fach konzentrierte Detergenzlösung mit 0,1% 2-Chloracetamide
- ▶ **Biotinylierter IL-12-Antikörper**: in einem Puffer mit Protein und 0,02% Thimerosal
- ▶ **Streptavidin-HRP-Konjugat**: in einem Puffer mit Protein und 0,02% Thimerosal
- ▶ **Verdünnungspuffer**: Gepufferte Lösung mit Protein und 0,02% Thimerosal
- ▶ **IL-12-Standard 16 ng/ml**: Ein humaner IL-12-Standard in einem Puffer mit Protein und 0,02% Thimerosal kalibriert gegen den aminosäure-analysierten mass standard. Der Predicta Total IL-12 ELISA, hat einen mass value für NIBSC/WHO human IL-12 Referenz 95/544 von 1,15 µg/ml. Diese Material ist gekennzeichnet mit einem nominal mass von näherungsweise 1,0 µg/ml. Zur Konvertierung von Predicta-IL-12-Werten zu NIBSC/WHO mass, gilt folgende Gleichung:
A = Predicta-ELISA-Wert
B = NIBSC/WHO
 $A \times 0,87 = B$
- ▶ **Substrat-Reagenz A**: H₂O₂ (0,02%) in gepufferter Lösung
- ▶ **Substrat-Reagenz B**: Tetramethylbenzidine (TMB) (<2%) in Methanol (<50%), DMSO (<2%) und Glycerol (<15%)
- ▶ **Stopplösung**: Schwefelsäure (1M)
- ▶ **Folienaufkleber** zum Versiegeln der Mikrotiterplatte

4.1.2.3 Geräte

Alle Geräte wie unter 4.1.1.3 aufgezählt und zusätzlich ein Inkubator 37°C ±2°C (Haeraeus Instruments Function Line).

4.1.2.4 Durchführung

Alle Reagenzien werden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und geschwenkt. 50 ml des Waschkonzentrats werden in 950 ml destilliertem Wasser gelöst. Maximal 15 Minuten vor Gebrauch werden die Substrat-Reagenzien A und B im Verhältnis 1:1 gemixt.

Die praktische Durchführung erfolgt an einem Tag.

1. Inkubation:

Alle Nüpfchen werden mit 50 µl Verdünnungspuffer gefüllt. Anschließend werden jeweils 50 µl des Standards und 50 µl der Serumproben paarweise in die Nüpfchen gegeben. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde im Inkubator bei 37°C ±2°C.

	IL-12
Standard 1	1600
Standard 2	800
Standard 3	400
Standard 4	100
Standard 5	50
Standard 6	25
Standard 7	0

Tabelle 8: Standardkonzentrationen in pg/ml

1. Waschprozedur:

Die Platte wird fünfmal mit dem verdünnten Waschpuffer unter Zuhilfenahme des Wascher gewaschen.

2. Inkubation:

In jedes Nüpfchen werden 100 µl des biotinylierten IL-12-Antikörpers gegeben. Die Platte wird anschließend mit einem Folienaufkleber versiegelt. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde im Inkubator bei 37°C ±2°C.

2. Waschprozedur:

Siehe 1. Waschprozedur.

3. Inkubation:

In jedes Nöpfchen werden 100 µl des Streptavidin-HRP-Konjugats gegeben. Die Platte wird anschließend mit einem Folienaufkleber versiegelt. Die Inkubation erfolgt für 15 Minuten im Inkubator bei 37°C ±2°C.

3. Waschprozedur:

Siehe 1. Waschprozedur.

4. Inkubation:

In jedes Nöpfchen werden 100 µl der TMB-Substrat-Lösung gegeben. Die Inkubation erfolgt für 20 Minuten bei Raumtemperatur.

Stopreaktion:

Zuletzt gibt man 100 µl der Stoplösung in jedes Nöpfchen und führt innerhalb einer halben Stunde mit dem an einen Computer angeschlossenen Photometer die photometrischen Messungen bei einer Wellenlänge von 450 nm durch.

4.1.2.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte automatisch im Anschluß an die photometrische Messung mit dem Programm Softmax, Version 2.01d. Dabei berechnet das Programm für jedes Nöpfchenpaar die Mittelwerte der Absorptionen. Das Programm subtrahiert den berechneten Mittelwert des Null-Standards von allen anderen berechneten Mittelwerten der restlichen Nöpfchen. Im Anschluß daran werden die ermittelten Absorptionen der Standards auf die Ordinate und deren Konzentrationen auf die Abszisse einer log-log Koordinate aufgetragen. Anhand der daraus berechneten Standardkurve werden die Konzentrationen der untersuchten Proben bestimmt.

Laut Herstellerangaben hat der EIA-Test für IL-12 eine Sensitivität von 10 pg/ml (Leerwert + 2SD).

4.1.3 Bestimmung des löslichen Oberflächenmarkers CD30

Zur Bestimmung des löslichen Oberflächenmarkers CD30 wurde der Test der Firma Dako A/S, Dako CD30 (Ki-1 Antigen) ELISA verwendet.

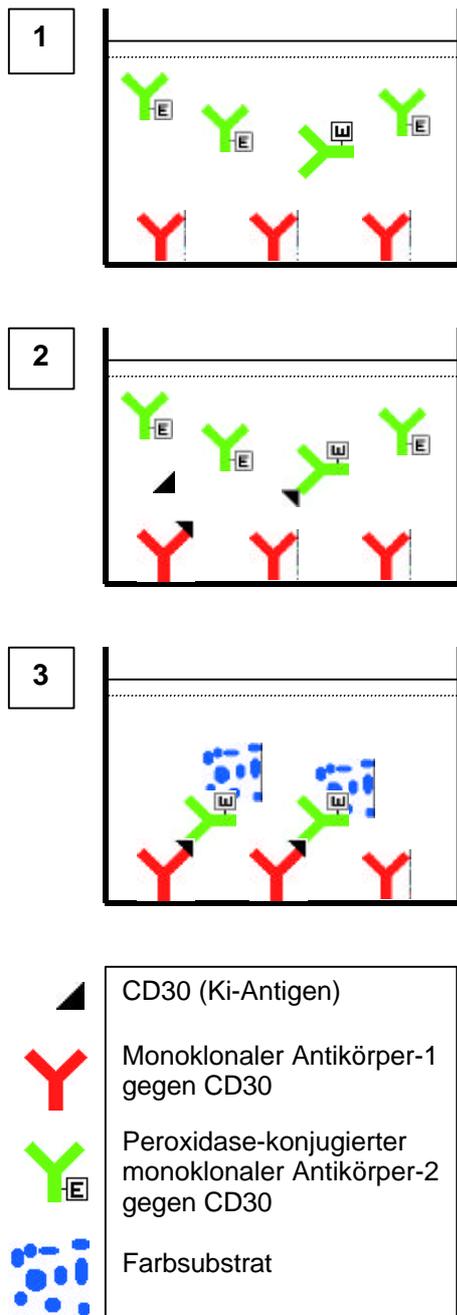


Abbildung 5: Prinzip des Assays der Firma Dako zur Bestimmung von CD30

4.1.3.1 Prinzip des Assays

Es handelt sich bei diesem Test ebenfalls um ein „Sandwich“-Enzymimmunoassay. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Tests erfolgt die Inkubation der Standards und der Proben simultan mit der Inkubation des Konjugats (**Abbildung 5**). Dies ist möglich, da der monoklonale Antikörper, der zur Beschichtung der Platte benutzt wird, mit einem anderen Epitop des CD30-Moleküls reagiert als der Antikörper, der dem Konjugat angehört. Diese beiden Antikörper sind daher zueinander nicht kompetitiv:

1. Der Peroxidase-konjugierte monoklonale Antikörper-2 gegen CD30 wird in die Näpfcchen gegeben, die bereits mit dem monoklonalen Antikörper-1 gegen CD30 beschichtet sind.
2. Zugabe der Standards und der Proben, so daß auch bei diesem Test ein Sandwich zwischen Antikörper-Antigen-Antikörper entsteht.
3. Nach der Waschprozedur wird das Farbsubstrat hinzugefügt und nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die enzymkatalysierte Reaktion durch Schwefelsäure gestoppt.

4.1.3.2 Assaykomponenten und Reagenzien

Die Konzentrationen der einzelnen Zusätze wurden teilweise nicht bekanntgegeben.

Alle Substanzen werden bei 2-8°C gelagert.

► **Weißer Mikrowellplatte** (96 Näpfcchen), zur

Vorverdünnung der Standards, der Kontrolle sowie der Proben

- ▶ **Durchsichtige Polystyren-Mikrotiterplatte** (96 Nöpfchen), die bereits mit Mausmonoklonalem Antikörper gegen humanes CD30 (Ki-1-Antigen) beschichtet ist.
- ▶ **Waschkonzentrat**: 51fach konzentriert, bestehend aus 1,25 M Tris/HCl, 2,5 M NaCl, 5% Tween 20; pH 7,2; beinhaltet 1250 mg/l Hgl₄K₂ als Konservierungsmittel
- ▶ **Probenverdünner**: Puffer mit einem Proteinstabilisator; beinhaltet 25 mg/l Hgl₄K₂ als Konservierungsmittel
- ▶ **CD30 Standards**: In Puffer, der einen Proteinstabilisator und einen Farbstoff enthält; beinhaltet 25 mg/l Hgl₄K₂ als Konservierungsmittel; Der Standard ist kalibriert gegen eine interne Referenz
- ▶ **Kurven-Kontroll-Lösung**: humane CD30-Kontroll-Lösung mit einer Konzentration zwischen 69-83 U/ml; beinhaltet 25 mg/l Hgl₄K₂ als Konservierungsmittel
- ▶ **Konjugat-Verdünner**: Puffer mit Proteinstabilisator; beinhaltet 25 mg/l Hgl₄K₂ als Konservierungsmittel
- ▶ **Peroxidase-konjugierter monoklonaler Maus-Antikörper gegen humanes CD30**: 10fach konzentriert; gepuffert in einem Proteinstabilisator; beinhaltet 25 mg/l Hgl₄K₂ als Konservierungsmittel
- ▶ **Substrat-Verdünner**: Deionisiertes Wasser
- ▶ **Substrat-Lösung I**: stabilisierte Lösung von Tetramethylbenzidine (TMB)
- ▶ **Substrat-Lösung II**: stabilisierte Lösung von H₂O₂
- ▶ **Stopplösung**: 2 M H₂SO₄
- ▶ **Folienaufkleber** zum Versiegeln der Mikrotiterplatte

4.1.3.3 Geräte

Alle Geräte wie unter 4.1.1.3 aufgezählt.

4.1.3.4 Durchführung

Alle Reagenzien werden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und geschwenkt. 20 ml des Waschkonzentrats werden in 980 ml destilliertem Wasser gelöst. Das konzentrierte Peroxidase-Konjugat wird im Verhältnis 1:10 mit dem Konjugat-Verdünner verdünnt. Maximal 15 Minuten vor Gebrauch werden die Substrat-Lösungen I und II im Verhältnis 1:1 gemixt. Die praktische Durchführung erfolgt an einem Tag.

Verdünnung der Standards, der Kontrolle sowie der Proben:

In alle Näpfchen der weißen Mikrotiterplatte werden jeweils 100 μ l des Probenverdnners mit einer 8-Kanal-Multipipette pipettiert. Anschließend werden jeweils 100 μ l des Standards, 100 μ l der Kontrollösung und 100 μ l der Serumproben paarweise in die Näpfchen gegeben. Die Platte wird anschließend mit einem Folienaufkleber versiegelt und auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) bei Raumtemperatur 3 Minuten lang geschüttelt.

1. Inkubation:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SA	SA	P2	P2
B	SB	SB
C	SC	SC
D	SD	SD
E	SE	SE
F	SF	SF
G	K	K
H	P1	P1	P41	P41

Tabelle 9: Plattenplan (SA-SF: Standards; B: Substrat-Blank; P1-P39: Proben)

Zunächst pipettiert man mit einer 8-Kanal-Multipipette 100 μ l des verdünnten Peroxidase-Konjugats in jedes Näpfchen der durchsichtigen Polystyren-Mikrotiterplatte. Anschließend werden 100 μ l des Inhalts der weißen gemixten Mikrotiterplatte in jedes Näpfchen der durchsichtigen Polystyren-Mikrotiterplatte transferiert. Danach wird die Platte mit einem Folienaufkleber versiegelt und auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) bei Raumtemperatur zwei Stunden lang inkubiert.

	CD30
Standard A	238
Standard B	101
Standard C	41
Standard D	16
Standard E	5
Standard F	0

Tabelle 10: Standardkonzentrationen in U/ml

1. Waschprozedur:

Die Platte wird fünf mal mit dem verdünnten Waschpuffer unter zu Hilfenahme des Waschers gewaschen.

2. Inkubation:

In jedes Nöpfchen werden 100 µl der zuvor im Verhältnis 1:1 gemixten Substrat-Lösungen I und II pipettiert. Die Platte wird anschließend mit einem Folienaufkleber versiegelt. Die Platte wird anschließend auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) bei Raumtemperatur eine 15 Minuten lang inkubiert.

Stopreaktion:

Zuletzt stoppt man die enzymatische Reaktion mit 100 µl der Stoplösung. Anschließend wird die Platte auf dem Schüttler (Frequenz von 300-500/min) bei Raumtemperatur 1-2 Minuten lang geschüttelt. Innerhalb einer halben Stunde führt man mit dem an einen Computer angeschlossenen Photometer die photometrischen Messungen bei einer Wellenlänge von 450 nm durch.

4.1.3.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte automatisch im Anschluß an die photometrische Messung mit dem Programm Softmax, Version 2.01d. Dabei berechnet das Programm für jedes Nöpfchenpaar die Mittelwerte der Absorptionen. Das Programm subtrahiert den berechneten Mittelwert des Null-Standards von allen anderen berechneten Mittelwerten der restlichen Nöpfchen. Im Anschluß daran werden die ermittelten Absorptionen der Standards auf die Ordinate und deren Konzentrationen auf die Abszisse einer log-log Koordinate. Anhand der daraus berechneten Standardkurve werden die Konzentrationen der untersuchten Proben bestimmt. Die errechnete Konzentration der Kontrollösung muß in dem angegebenen Bereich liegen.

Laut Herstellerangaben hat der Test folgende **Sensitivität:**

Der EIA-Test für **CD30** hat eine Sensitivität von 1 U/ml (Leerwert + 2SD).

4.2 Intrazelluläre Zytokinmessung

Die multiparametrische Bestimmung der intrazellulären Zytokinexpression von IFN γ und IL-4 wurde anhand des folgenden Protokolls durchgeführt, die von der Firma Becton Dickinson für ihre Produkte (FastImmune Cytokine System) empfohlen wird.

4.2.1 Prinzip der intrazellulären Zytokinmessung

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die Kombination der Durchflußzytometrie mit der Immunfluoreszenzmarkierung von antigenen Epitopen mit monoklonalen Antikörpern stellt ein diagnostisches Verfahren hoher Sensitivität und Spezifität für die Differenzierung von Leukozyten dar. Bei der Durchflußzytometrie werden die Zielzellen hydrodynamisch so fokussiert, daß sie dann seriell, d.h. Zelle für Zelle, einen Laserstrahl mit festgelegter Wellenlänge ($\lambda=488$ nm) passieren. Trifft ein Laserstrahl auf eine Zelle, so kommt es zur Streuung des Lichtes. Diese Streuung verläuft zum einen abhängig von der Größe der Zelle in Vorwärtsrichtung (FSC) und zum anderen in Abhängigkeit von der Zell-Granularität im rechten Winkel zur Flußrichtung (Seitwärtsstreuung SSC). Aus dem Verhältnis beider Streuungsmöglichkeiten entstehen typische zweidimensionale Kennfelder, die Aussagen über die einzelnen Zellpopulationen der Meßprobe erlauben.

Durch Markierung der Zellen mit Fluorochrom-Farbstoffen kann man durch Laserlicht die Emission von Fluoreszenzlichtimpulsen erreichen. Senden die Fluorochrom-Farbstoffe bei Laserbestrahlung unterschiedliche Emissionsspektren aus, so ist eine weitergehende Charakterisierung der Zellpopulationen möglich.

Eine Photomultiplermatrix zeichnet alle optischen Signale, die von jeder einzelnen bestrahlten Zelle ausgehen, auf, wobei sie durch den vorwärtsgerichteten Lichtimpuls der jeweiligen Zelle getriggert ist.

Je nach Konzeption des Durchflußzytometers können bis zu 5 Eigenschaften (2 Lichtstreuungen und 3 Fluoreszenzen FL1, FL2, FL3) einer einzelnen Zelle gemessen werden. Jeweils zwei Eigenschaften einer Zelle können dann später miteinander in Verbindung gesetzt werden.

Durch das sogenannte „Gating“ werden nur solche Zellen zur Darstellung zugelassen, die bestimmte, vorher definierte Eigenschaften aufweisen (z.B. nur CD3-positive Leukozyten). So werden in der Zweifarben-Fluoreszenzanalyse (FL1 / FL2) nur solche Zellen erfaßt, die bestimmte Streulichteigenschaften (FSC/SSC) oder Fluoreszenzeigenschaften (FL3/SSC)

aufweisen. Durch entsprechende Auswahl der Streulichteigenschaften können selektiv nur bestimmte, vorher definierte Zellen erfaßt werden.

Alle Parameter der jeweiligen Analyse werden über eine logarithmische Intensitätsskala registriert und für das quantitative Ergebnis wird dann die durchschnittliche Signalintensität entsprechend der Anzahl der analysierten Ereignisse errechnet.

Mittels einer Kontrollmessung (Kontrollantikörper= „negative Kontrolle“) werden die Bereiche der „positiven“ und „negativen“ Zellen definiert.

Das Prinzip der intrazellulären Bestimmung der Zytokinexpression besteht, wie in der **Abbildung 6** zu sehen ist, zunächst aus der Stimulierung der Leukozyten zur Zytokinproduktion. Im Anschluß daran werden die CD3-positiven Leukozyten immunologisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, um später diese Zellen für die Messung filtern zu können. Die Erythrozyten werden lysiert. Damit die Antikörper gegen IFN γ und IL-4 in die Zellen eindringen können, werden die Zellen vorher permeabilisiert. Jetzt kann die intrazelluläre Markierung von IFN γ und IL-4 erfolgen. Im Anschluß daran werden die Zellen fixiert und im Durchflußzytometer untersucht.

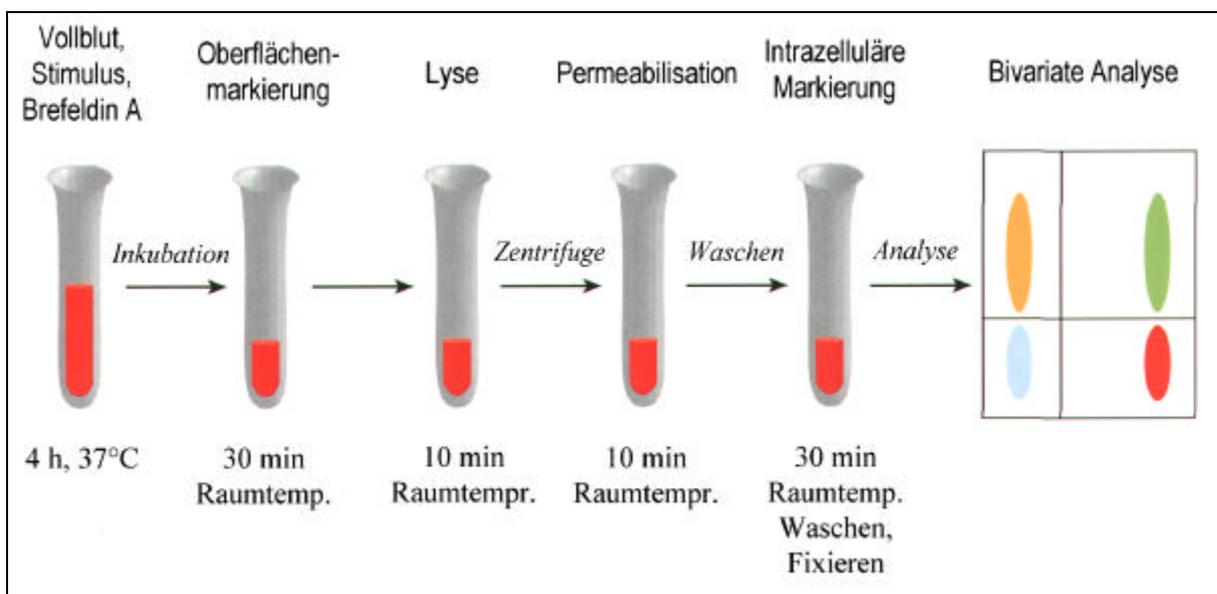


Abbildung 6: Prinzip des FastImmune Cytokine Systems der Firma Becton Dickinson zur intrazellulären Markierung von Zytokinen im Vollblut

4.2.2 Reagenzien

- ▶ RPMI-1640 (+2 mM L-glutamine)
- ▶ PBS ohne Natriumcitrat, steril

▶ **1% Paraformaldehyd (PFA) in PBS**

a) 0,2 g PFA in 20 ml PBS lösen

Lagerung bei 4°C

▶ **DMSO (Sigma Cat. No. D-8779)**

▶ **EtOH, Gold Shield Ethyl Alcohol, 200 proof**

▶ **Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA) (Sigma Cat. No. P-8139):**

a) 10 ml DMSO mit 1 mg PMA mischen

b) In sterile 5 ml Gefäße 50 µl pro Gefäß aliquotieren

c) Bei -20°C lagern und nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren

d) Vor Gebrauch in Gefäß mit 50 µl PMA, 4950 µl steriles PBS geben, so daß eine finale Konzentration von 25 ng/ml entsteht

▶ **Ionomycin (Sigma Cat. No. I-0634):**

a) 2 ml EtOH mit 1 mg Ionomycin in eigener Flasche mischen

b) In sterile 2 ml Eppis 50 µl pro Eppi aliquotieren

c) Bei -20°C lagern und nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren

d) Vor Gebrauch in Eppi mit 50 µl Ionomycin, 450 µl (=0,45 ml) steriles PBS geben, so daß eine finale Konzentration von 1 mg/ml entsteht

▶ **Brefeldin-A (BFA) (Sigma Cat. No. B-7651):**

a) 1 ml DMSO mit 5 mg BFA in eigener Flasche mischen

b) In sterile 2 ml Eppis 50 µl pro Eppi aliquotieren

c) Bei -20°C lagern und nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren

d) Vor Gebrauch in Eppi mit 50 µl BFA, 450 µl (=0,45 ml) steriles PBS geben, so daß eine finale Konzentration von 10 mg/ml entsteht

▶ **FACS™ Permeabilisierungslösung (Becton Dickinson, Cat. No. 340457)**

▶ **FACS™ Lyse-Lösung (Becton Dickinson, Cat. No. 349202)**

▶ **FastImmune™ Control γ_{2a} FITC/ γ_1 PE (Becton Dickinson, Cat. No. 340458)**

▶ **FastImmune™ IFN- γ FITC/IL-4 PE (Becton Dickinson, Cat. No. 340456)**

▶ **CD3 PerCP (Becton Dickinson, Cat. No. 347344)**

▶ **PBS-Herstellung für den Washpuffer:**

bestehend aus:

a) KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat), (Fa. Merk, Nr. 4873) 1,084 g

b) $\text{di-Na}_2\text{HPO}_4$ (di-Natriumphosphat), (Fa. Merk, Nr. 6580) 4,510 g

c) NaCl (Natriumchlorid), (Fa. Merk, Nr. 6404) 4,510 g

d) ad 1 liter mit Aqua bidest auffüllen, pH=7,2

Lagerung mehrere Wochen im Kühlschrank bei 4°C

► Wash Buffer:

bestehend aus:

a) BSA1,25 g

b) Natriumcitratdihydrat0,2772 g

Lagerung bei 4°C

4.2.3 Geräte

Mikropipetten 1-5 µl, 5-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl (Gilson Pipetman[®]), Zentrifuge (Haeraeus Sepatech Megafuge 1.0R), Vortex (IKA[®] MS1 Minishaker), sterile Arbeitsbank (Haeraeus Instruments Function Line), Inkubator 37°C ±2°C, 5% CO₂ (Haeraeus Instruments Function Line), 12 x 75-mm Falcon[®] Polystyrenröhrchen mit Kappe (Becton Dickinson Labware Cat. No. 2058), FACScan[™] flow cytometer (Becton Dickinson) mit dem Programm Lysis II[™] Version 1.1.

4.2.4 Durchführung

4.2.4.1 Probengewinnung

Vollblut wird gesammelt in Natrium-Heparin-Röhrchen (Vacutainer tubes BD VACUTAINER, Cat. No. 36XXXX).

4.2.4.2 Stimulation (=Aktivierung)

Es werden zunächst stimulierte Proben und unstimulierte Kontrollen zubereitet. Die Zubereitung erfolgt unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Arbeitsbank (Haeraeus Instruments Function Line).

1. Zwei 12 x 75-mm Falcon® Polystyrenröhrchen (Becton Dickinson Labware Cat. No. 2058) werden mit „Aktiviert“ und „Unstimuliert“ beschriftet.
2. 500 µl RPMI-1640 (+2 mM L-glutamine) werden in jedes Röhrchen gegeben.
3. 10 µg/ml BFA (20 µl der hergestellten Lösung pro 1 ml Blut) werden in jedes Röhrchen gegeben. Die Aktivierung wird in Gegenwart von BFA durchgeführt, was den intrazellulären Transport von Proteinen verhindert, die während der Aktivierung produziert werden, so daß diese innerhalb der Zelle verbleiben. Die unstimulierte Kontrolle enthält ebenfalls BFA.
4. 1 µg/ml Ionomycin (20 µl der hergestellten Lösung pro 1 ml Blut) und 25 ng/ml PMA (25 µl der hergestellten Lösung pro 1 ml Blut) werden in das mit „Aktiviert“ beschriftete Röhrchen gegeben.
5. 500 µl des im Natrium-Heparin-Röhrchen (Vacutainer tubes BD VACUTAINER) gesammelten Blutes werden in jedes Röhrchen gegeben.
6. Zum Schluß erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und mit losen Kappen eine 4 stündige Inkubation im Inkubator (Haeraeus Instruments Function Line).

4.2.4.3 Oberflächenmarkierung

Nach der Inkubation muß man nicht mehr unter sterilen Bedingungen arbeiten.

1. Vier 12 x 75-mm Falcon® Polystyrenröhrchen (Becton Dickinson Labware Cat. No. 2058) werden mit „Aktiviert-markiert“, „Aktiviert-Isotypen-Kontrolle“, „Unstimuliert-markiert“ und „Unstimuliert-Isotypen-Kontrolle“ beschriftet.
2. 20 µl CD3 PerCP (Becton Dickinson, Cat. No. 347344) in alle Röhrchen geben.
3. Jeweils 100 µl der aktivierten Probe in die Röhrchen mit der Beschriftung „Aktiviert-markiert“ und „Aktiviert-Isotypen-Kontrolle“ geben.

4. Jeweils 100 µl der unstimulierten Probe in die Röhren mit der Beschriftung „Unstimuliert-markiert“ und „Unstimuliert-Isotypen-Kontrolle“ geben.
5. Alle vier Röhren gut mixen und im Dunkeln bei Zimmertemperatur 30 min. lang inkubieren.

4.2.4.4 Lyse

1. 2 ml FACS™ Lyse-Lösung (Becton Dickinson, Cat. No. 349202) in jedes Röhren geben, um die Erythrozyten zu lysieren.
2. Alle vier Röhren gut mixen und im Dunkeln bei Zimmertemperatur 10 min. lang inkubieren.

4.2.4.5 Permeabilisierung

1. Alle vier Röhren werden 5 min. lang bei 500x g zentrifugiert und der Überstand wird abgesaugt.
2. 500 µl FACS™ Permeabilisierungslösung (Becton Dickinson, Cat. No. 340457) in jedes Röhren geben, um die Zellen für die Antikörper durchlässig zu machen.
3. Alle vier Röhren gut mixen und im Dunkeln bei Zimmertemperatur 10 min. lang inkubieren.

4.2.4.6 Erster Waschschrift

1. 2 ml des hergestellten Waschpuffers in jedes Röhren geben
2. Alle vier Röhren werden 5 min. lang bei 500x g zentrifugiert und der Überstand wird abgesaugt.

4.2.4.7 Intrazelluläre Markierung

Unstimulierte Kontrollen werden gebraucht, um die Höhe der residualen Zytokin-Synthese durch die Aktivierung in vivo abschätzen zu können.

Fluoreszenz-konjugierte Isotypen-Kontrollen werden gebraucht, um nicht-spezifische Bindungen des Antikörpers abschätzen zu können.

1. 20 µl FastImmune™ Control γ_{2a} FITC/ γ_1 PE (Becton Dickinson, Cat. No. 340458) werden in die Röhren mit der Beschriftung „Aktiviert-Isotypen-Kontrolle“ und „Unstimuliert-Isotypen-Kontrolle“ gegeben.
2. 20 µl FastImmune™ IFN- γ FITC/IL-4 PE (Becton Dickinson, Cat. No. 340456) werden in die Röhren mit der Beschriftung „Aktiviert-markiert“ und „Unstimuliert-markiert“ gegeben.

3. Alle vier Röhrchen gut mixen und im Dunkeln bei Zimmertemperatur 30 min. lang inkubieren.

4.2.4.8 Zweiter Waschschrift

1. 2 ml des hergestellten Waschpuffers in jedes Röhrchen geben
2. Alle vier Röhrchen werden 5 min. lang bei 500x g zentrifugiert und der Überstand wird abgesaugt.

4.2.4.9 Fixierung

500 µl 1% PFA werden in jedes Röhrchen gegeben und die Zellen resuspendiert. Bei 4°C im Dunkeln gelagert, sind die Zellen innerhalb von 24 Stunden zu messen.

4.2.5 Analyse und Auswertung

Die Analyse der Zellfluoreszenz wurde mit dem FACScan™ flow cytometer der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Es wurden dabei 20.000 Zellen gemessen. Die Daten wurden mit dem Programm Lysis™ II (Version 1.1) aquiriert. Über die CD3⁺-Zellen wurde ein Gate gelegt, so daß die Analyse der IFN γ - und IL-4-Produktion nur auf die CD3-positive Zellen beschränkt blieb.

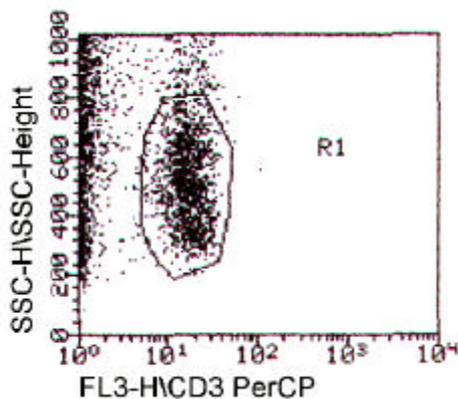


Abbildung 7: CD3⁺-Gate

Entsprechend der Isotypen-Kontrollen wurden die Quadranten gesetzt. Die Daten wurden mit dem Programm Lysis II™ (Version 1.1) ausgewertet und als bivariate Dot-Plots dargestellt. Die Prozente der Zellen in jedem Quadranten (gesetzt entsprechend der negativen Kontrollen) sind in den Diagrammen angegeben. Der linke obere Quadrant (lo Q) in jedem Diagramm zeigt die Zellen an, die nur IL-4 produzieren (Th2-Zellen). Der rechte untere Quadrant (ru Q) zeigt die Zellen an, die nur IFN γ produzieren (Th1-Zellen). Der rechte obere Quadrant (ro Q) zeigt die Zellen an, die IFN γ und IL-4 produzieren (Th0-Zellen).

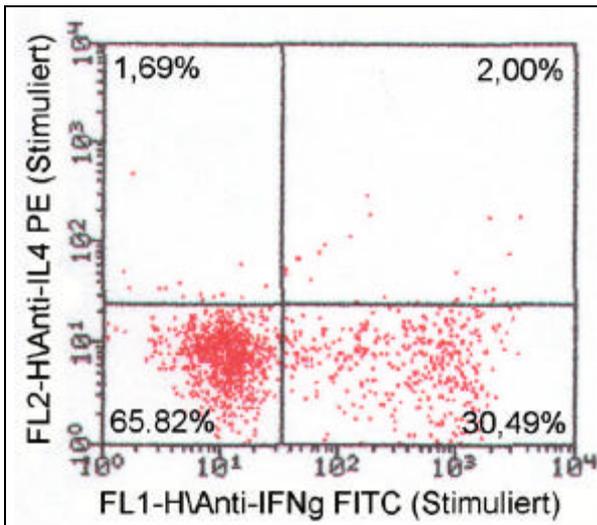


Abbildung 8: Stimuliert und mit Anti-IFN γ FITC und Anti-IL-4 PE markiert

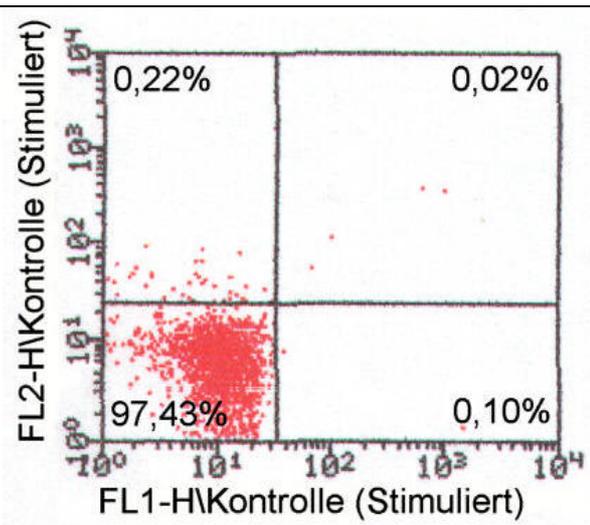


Abbildung 9: Stimulierte Kontrolle

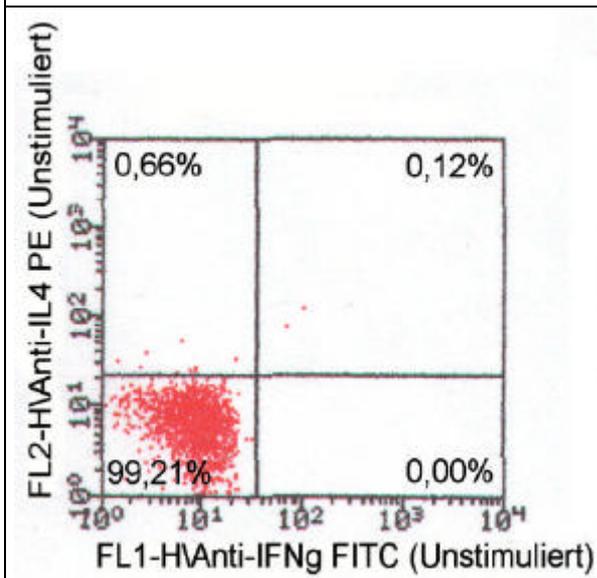


Abbildung 10: Nicht stimuliert und mit Anti-IFN γ FITC und Anti-IL-4 PE markiert

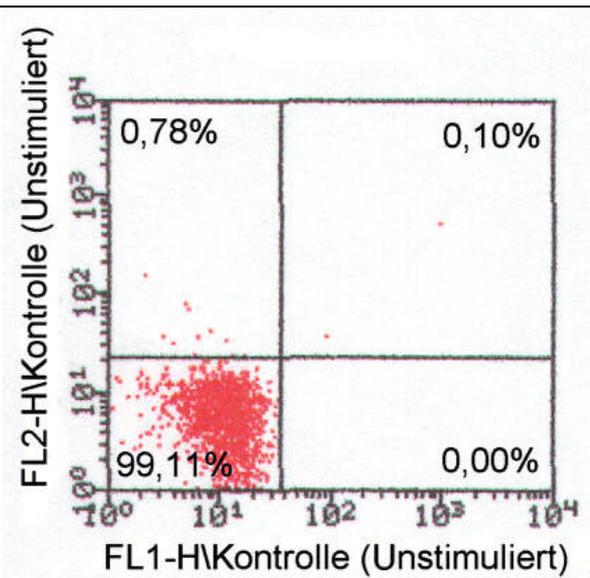


Abbildung 11: Nicht stimulierte Kontrolle

Wie die folgende Formel zeigt

Formel $(A - B) - (C - D)$

wobei

A = Stimuliert und mit Anti-IFN γ FITC und Anti-IL-4 PE markiert

B = Stimulierte Kontrolle

C = Nicht stimuliert und mit Anti-IFN γ FITC und Anti-IL-4 PE markiert

D = Nicht stimulierte Kontrolle

wurden die spezifischen Antworten der Zellen durch Substraktion der Prozente der positiven Ereignisse in den Isotypen-Kontrollen von den Prozenten der positiven Ereignisse in den Anti-IFN γ FITC und Anti-IL-4 PE markierten Proben ermittelt. Anschließend wurden die isotypen-korrigierten Antworten der nicht stimulierten Proben von den die isotypen-korrigierten Antworten der stimulierten Proben abgezogen.

		<i>lo Q</i> =Th2	<i>ro Q</i> =Th0	<i>ru Q</i> =Th1
A	IFN γ /IL-4 (stimuliert)	1,69 %	2,00 %	30,49 %
B	Kontrolle (stimuliert)	0,22 %	0,02 %	0,10 %
C	IFN γ /IL-4 (nicht stimuliert)	0,66 %	0,12 %	0,00 %
D	Kontrolle (nicht stimuliert)	0,78 %	0,10 %	0,00 %
	Ergebnis = (A - B) - (C - D)	1,59 %	1,96 %	30,39 %

Tabelle 11: Rechenbeispiel zur intrazellulären Messung

Dieses Gesamtergebnis für Th1, Th2 und Th0 wird in Bezug auf 100% gesetzt, wie es im unteren Diagramm verdeutlicht ist.

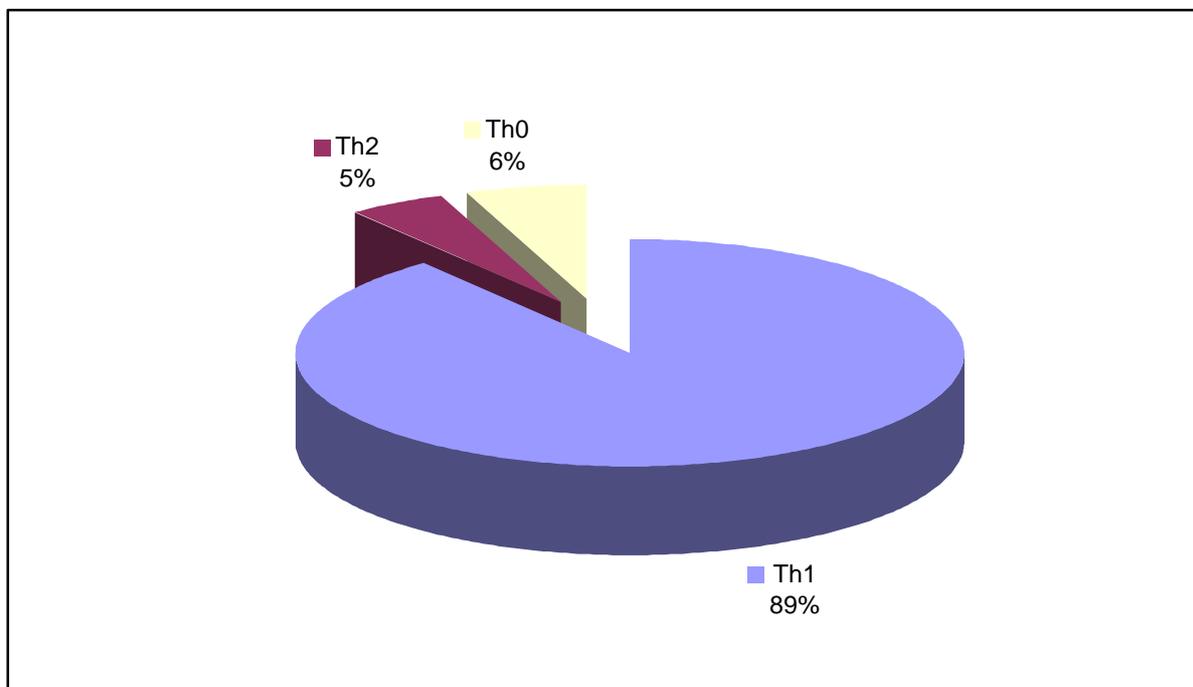


Diagramm 1: Beispiel-Diagramm zur Darstellung des Th-Musters; in diesem Fall wären 98% der CD3⁺-Zellen Th1-Zellen, 5% Th2-Zellen und 6% Th0-Zellen, somit hätte man ein Th1-ähnliches Muster.

4.3 Statistik

Alle gewonnenen Daten wurden zunächst einer beschreibenden statistischen Berechnung unterzogen. Mediane, Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten wurden bestimmt.

Statistische Signifikanz wurde bei nicht gegebener Normalverteilung (Überprüfung durch Lilliefors-Test auf Normalverteilung für Fallzahlen über 50, Shapiro-Wilks-Test für Fallzahlen ≤ 50 ; die Annahme auf Normalverteilung ist widerlegt wenn $p < 0,05$) für gepaarte Werte mit dem parameterfreien Wilcoxon-Test und für nicht gepaarte Werte mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei gegebener Normalverteilung wurde zur Signifikanzbestimmung der Student's T-Test benutzt. Qualitative Daten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Stetige Größen wurden mittels linearer Regression und Bestimmung des Pearson's-Korrelationskoeffizienten untersucht. Bei nicht normalverteilten Werten wurden Box-Whiskers-Plots zur Darstellung der Verteilung benutzt. Der Kasten (Box) stellt den Interquartilsbereich IQR (genauer: Tukey's Hinges) dar, der dicke Strich darin den Median. Die Werte, die maximal $1,5 \times \text{IQR}$ über oder unter der Box liegen, bilden die Linien (Whiskers), der Querstrich steht für den größten bzw. kleinsten tatsächlich vorhandenen innerhalb dieses Bereichs. Werte außerhalb von $1,5 \times \text{IQR}$, aber noch innerhalb von $3 \times \text{IQR}$, gelten als Ausreißer und sind mit einem Kreis eingezeichnet. Extremwerte liegen mehr als $3 \times \text{IQR}$ von der Box entfernt und werden durch Sterne markiert. Bei normalverteilten Werten wurden Balkendiagramme zur Darstellung des Mittelwertes und der zweifachen Standardabweichung benutzt.

Die Berechnung erfolgte unter Verwendung des Statistikprogramms SPSS Version 8.0.